

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 45, NR 3, 1999

Geny intronowe	158
Białka IAP w regulacji apoptozy i przeżycia komórek	167
Aneksyna VI jako białko G?	177
Niedobór mięśniowej deaminazy AMP	182
Lekkie łańcuchy i skurcz mięśni . .	185
Endoteliny	193
Kinaza białkowa A	202
Synapsyny — receptory ATP	211
Receptor leptyny	218

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland
tel/fax 658-20-99
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl
Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03

REDAKTORZY

Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
LILIANA KONARSKA
tel. 659-85-71 w. 352
bezp. 658-20-99
wtorki 15—18
ANNA SZAKIEL
tel. 823-20-46
IWONA FIJAŁKOWSKA
tel. 659-70-72 w. 1123
ADAM SZEWCZYK
tel. 659-85-71 w. 269
HANNA LASKOWSKA
pn. i czw. 14—16
tel. 659-85-71 w. 441

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
ANNA FILIPEK (Warszawa)
ZBIGNIEW GACIŃSKI (Warszawa)
LUCYNA GRĘBECKA (Warszawa)
TERESA JAKUBOWICZ (Lublin)
LESZEK KACZMAREK (Warszawa)
BOŻENA KAMIŃSKA (Warszawa)
ANDRZEJ KASPRZAK (Warszawa)
MARIA MALICKA-
-BŁASZKIEWICZ (Wrocław)
ANNA MOCZARSKA (Warszawa)
EWA SIKORA (Warszawa)
MAŁGORZATA SKUP (Warszawa)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel. (22) 659-85-71 w. 441
poniedziałki, czwartki 14—16
fax (22) 658-20-99
e-mail — postepy@nencki.gov.pl

Kwartalnik „Postępy Biochemii” wydawany z
pomocą finansową Komitetu Badań Nauko-
wych oraz Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Indeksowany w Medline i Agrolibrex

SPIS TREŚCI CONTENTS

- Geny intronowe**
Intronic genes
MARCIN SCHMIDT 158
- Udział wirusowych i komórkowych białek IAP w regu-
lacji apoptozy i przeżycia komórek**
Participation of IAP proteins in the regulation of apop-
tosis and cell survival
BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT 167
- Czy aneksyna VI, białko wiążące wapń i fosfolipidy,
jest białkiem G?**
Is annexin VI, calcium- and phospholipid-binding pro-
tein, a G protein?
MAŁGORZATA DANIELUK, JOANNA BANDOROWICZ- PIKUŁA 177
- Czy mutacja genu AMPD1, kodującego izoenzym
mięśniowej deaminazy AMP u człowieka, może być
markerem prognostycznym pierwotnej kardiomiopatii
rozstrzeniowej?**
Can mutation of AMPD1 gene encoding human AMP
deaminase muscle isozyme be a prognostic marker of
primary dilated cardiomyopathy?
KRYSZTOF KALETHA, ZYGMUNT CHODOROWSKI, GABRIELA
NAGIEL-STARCZYŃSKA, MAGDALENA GAZDA, EWA
SŁOMIŃSKA 182
- Rola lekkich łańcuchów miozyny w regulacji skurczu
mięśnia sercowego**
The role of the myosin light chains in the regulation of
cardiac muscle contraction
ANNA MOCZARSKA 185
- Endoteliny — w dekadę po ich odkryciu**
Endothelins — one decade after discovery
KRYSZTOF KALETHA, ZYGMUNT CHODOROWSKI, PAWEŁ
DUTKA, GABRIELA NAGIEL-STARCZYŃSKA 193
- Różne efekty działania kinazy białkowej A**
Various effects of protein kinase A action
ANNA OSTROWSKA 202
- Synapsyny — wewnątrzkomórkowe receptory ATP w
procesach wydzielania przekazywaczy nerwowych**
Synapsins as intracellular receptors for ATP in neuro-
transmitter release
RENATA BUŚ, SŁAWOMIR PIKUŁA 211
- Zaburzenia budowy i funkcji receptora leptyny — jed-
na z przyczyn otyłości?**
Disorders of the leptin receptor structure and function
— one of the causes for obesity?
ARETA PANKIEWICZ, JULIAN ŚWIĘRCZYŃSKI 218

Geny intronowe

Intronic genes

MARCIN SCHMIDT*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Organizacja genomowa układu „genu w genie”
 - II-1. Charakterystyka poznanych struktur genomowych
 - II-1.1. Geny *Gart/LCP*
 - II-1.2. Geny *l(2)not/l(2)tid, l(2)rot*
 - II-1.3. Geny *dunce/Pig, Sgs, indnc*
 - II-1.4. Geny *Rh4/sina*
 - II-1.5. Geny *NF1/EVI2A, EVI2B, OMGP, ΨAK3*
 - II-1.6. Geny *GnRH/SH; CF VIII/F8A, F8B* oraz *ear-1/ear-7*
- III. Transkrypcja „genu w genie”
 - III-1. Interakcje typu *cis*
 - III-2. Regulacja transkrypcji genów intronowych poprzez antysensowne oligonukleotydy
- IV. Ewolucyjne przesłanki mogące potwierdzać powiązanie pomiędzy genem gospodarzem a intronowym genem
- V. Pochodzenie „zagnieżdżonych” genów
- VI. Uwagi końcowe.

Wykaz stosowanych skrótów: pz — par zasad, kpz — tysięcy par zasad, nt — nukleotydów, knt — tysięcy nukleotydów, AIRS — syntetaza rybonukleotydu aminoimidazolowego (EC 6.3.3.1), GARS — syntetaza rybonukleotydu glicynamidowego (EC 6.3.4.13), GART — transferaza rybonukleotydu glicynamidowego (EC 2.1.2.2)

I. Wstęp

W roku 1909 J o h a n n s e n wprowadził termin „gen” w miejsce Mendlowskiego „czynnika dziedziczności”. Było to jednak abstrakcyjne pojęcie, gdyż nie przypisywano wtedy genowi określonej struktury. Dopiero cztery lata później S t u r t e v a n t

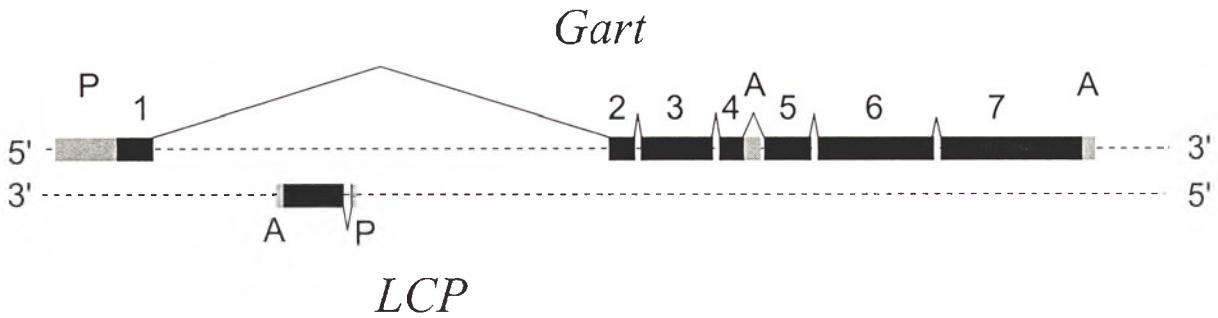
*Mgr; Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, mschmidt@amu.edu.pl

Contents:

- I. Introduction
- II. Genomic organisation of a gene within a gene
 - II-1. Characteristics of known genomic structures
 - II-1.1. *Gart/LCP* genes
 - II-1.2. *l(2)not/l(2)tid, l(2)rot* genes
 - II-1.3. *dunce/Pig, Sgs, indnc* genes
 - II-1.4. *Rh4/sina* genes
 - II-1.5. *NF1/EVI2A, EVI2B, OMGP ΨAK3* genes
 - II-1.6. *GnRH/SH; CF VIII/F8A, F8B* and *ear-1/ear-7* genes
- III. Transcription regulation of a gene within a gene
 - III-1. *Cis*-interactions
 - III-2. Antisens interactions
- IV. Evolutional circumstances of possible connection between a host gene and its intronic gene
- V. Origin of intronic genes
- VI. Final remarks

na podstawie badań nad *Drosophila melanogaster* stworzył definicję genu, która nieustannie podlega weryfikacji. Odkrycie intronów było niewątpliwie jednym z ważniejszych wydarzeń w dziejach ewolucji pojęcia genu. Ostatnie badania ujawniły kolejne fakty naruszające klasyczny model liniowej organizacji genów. Zidentyfikowano układy genów, w którym jeden (lub więcej genów) znajduje się w intronie innego genu tzw. genu gospodarza. W większości poznanych przypadków geny te zlokalizowane są na obu niciach DNA i transkrybowane w odwrotnym kierunku, a w skrajnych przypadkach ich sekwencje kodujące nakładają się.

Artykuł ten stanowi próbę analizy układu genu w genie pod względem komplikacji jakie taka aranżacja może wnosić do regulacji aktywności tych genów, a także przedstawia niektóre hipotezy dotyczące genyzy tego układu.



Rys. 1. Genomowa organizacja locus *Gart/LCP* u *Drosophila melanogaster*. Czarne pola oznaczają eksony (1 do 7 kolejne eksony genu *Gart*), a szare — poznane regiony regulatorowe (P — promotor, A — sygnał poliadenylacji); [zmienione wg 8].

II. Organizacja genomowa układu „genu w genie”

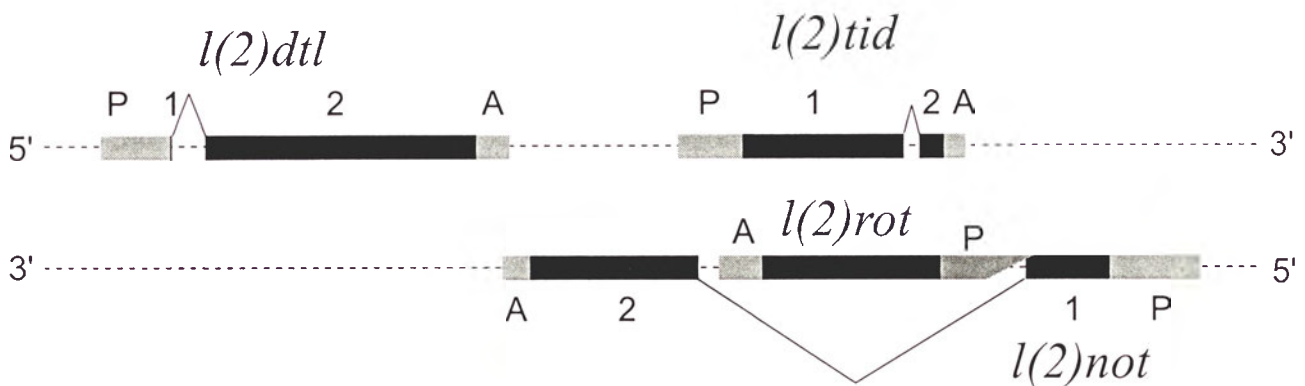
Większość genów jądrowych, jak i organellowych zawiera sekwencje intronowe. Na podstawie analizy mechanizmów składania RNA (z ang. *splicing*) wyróżniono kilka grup intronów oraz stworzono teorię ich filogenezy. Zakłada ona odrębność pochodzenia intronów w genach jądrowych i organellowych eukariota [1]. Otwarte ramki odczytu występujące w niektórych intronach klasy I i II genów organelli komórkowych kodują białka biorące udział m.in. w procesach insercji intronów [2-6]. W tych przypadkach regulą zdaje się być, iż owa intronowa otwarta ramka odczytu jest zawsze na tej samej nici DNA, co jej gen-gospodarz, i jest kotranskrybowana. Natomiast geny obecne w intronach genomu jądrowego zlokalizowane są na nici DNA kodującej gen-gospodarz, jak i komplementarnej, i mogą być transkrybowane niezależnie. Lokalizacja genów intronowych oraz

sposób ich transkrypcji wskazuje na ich prawdopodobną rolę w regulacji ekspresji genu gospodarza.

II-1. Charakterystyka poznanych struktur genomowych

II-1.1. Geny *Gart/LCP*

Geny *Gart* i *LCP* (*PCP*; z ang. *larval/pupal cuticle protein*) mają podobną organizację i strukturę w genomach *Drosophila melanogaster* i *Drosophila pseudoobscura*. W intronie genu *Gart* (pomiędzy eksonami 1 i 2) na nici przeciwnej znajduje się gen *LCP* zawierający także intron (patrz rys. 1). Produktami transkrypcji genu *Gart* są dwa rodzaje cząsteczek mRNA (4,7 i 1,7 knt u *Drosophila melanogaster* oraz 4,7 i 2,3 knt *Drosophila pseudoobscura*), które są matrycami w syntezie dwóch polipeptydów. Jeden z nich wykazuje trzy aktywności enzymatyczne szlaku syntezy puryn *de novo* (GARS, AIRS,



Rys. 2. Genomowa organizacja genów *l(2)not*, *l(2)tid*, *l(2)rot* i *l(2)dtl* u *Drosophila melanogaster*. Czarne pola oznaczają eksony, szare regiony regulatorowe (P — promotor, A — sygnał poliadenylacji); [zmienione według 10-11].

GART), drugi – krótszy – ma jedynie aktywność GARS. Gen *LCP* ulega transkrypcji w odwrotnym, względem *Gart* kierunku i koduje białko larwalnej kutikuli [7-8].

II-1.2. Geny *l(2)not / l(2)tid, l(2)rot*

Złożony układ genów: *lethal(2)tumorous imaginal discs (l(2)tid)*, *lethal(2)neighbour of tid (l(2)not)*, *lethal(2)relative of tid (l(2)rot)*, *lethal(2)denticleless (l(2)dtl)* został zlokalizowany w regionie prążka 59F4 drugiego chromosomu *Drosophila melanogaster*. Gen *l(2)not* obejmuje około 6,1 kpz genomowego DNA, a jego region kodujący (1530 pz) jest podzielony intronem o długości 2645 pz na dwa eksony. Produkt genu (białko *Not⁵⁶*) jest prawdopodobnie supresorem transformacji nowotworowej. W intronie tego genu występuje gen *l(2)rot* (patrz rys. 2) [9]. Natomiast na przeciwnej nici w tym regionie wykryto dwa kolejne geny *l(2)tid* i *l(2)dtl*. Gen *l(2)tid* ulokowany jest w regionie intronu genu *l(2)not* i w dużej części pokrywa się z genem *l(2)rot* (patrz rys. 2). W zależności od stadium rozwojowego owada jest on transkrybowany do mRNA o wielkości 0,82 knt (specyficznego dla stadium larwalnego) i 1,4 knt (specyficznego dla formy dorosłej). Białkowy produkt genu *l(2)tid* (*Tid⁵⁶*; 56 kDa) jest supresorem transformacji nowotworowej. N-końcowy rejon tego białka wykazuje znaczną homologię do białka opiekuńczego (z ang. *chaperone*) *DnaJ* z *Escherichia coli* [71]. Powyżej jest zlokalizowany gen *l(2)dtl* genu mający dwa eksony [10].

Ekspresja opisanych genów może być wzajemnie regulowana, ponieważ ich regiony regulatorowe nakładają się. Region promotorowy genu *l(2)tid* i nie podlegający translacji 3'-region genu *l(2)rot* oraz region promotorowy genu *l(2)rot* i nie podlegający translacji 3'-region genu *l(2)tid* mają wspólne sekwencje. Ponadto region promotorowy genu *l(2)rot* nakłada się na ekson I genu *l(2)not*, natomiast geny *l(2)not* i *l(2)rot* mają prawdopodobnie wspólny promotor [11].

Geny *l(2)not* i *l(2)tid* w genomie *Drosophila virilis* są tak samo zlokalizowane jak w genomie *Drosophila melanogaster* [12-13].

II-1.3. Geny *dunce / Pig, Sgs, Indnc*

Jednym z genów odpowiedzialnych m.in. za procesy uczenia się i pamięci [14-17] *Drosophila melanogaster* jest gen *dunce* (*dnc*) kodujący fosfodiesterazę cAMP. Gen ten składa się z nie mniej niż 17 eksonów obejmujących co najmniej pięć prążków politeniczych na chromosomic (3C11-3D4; ponad 148

kpz) [15, 17]. Skomplikowana i nietypowa organizacja genu *dunce* odpowiedzialna jest za powstawanie szeregu (8-10) transkryptów (od 4,2 do 9,6 knt). Ich wspólną cechą jest obecność w cząsteczce sekwencji odpowiadających eksonom 3 i 5-13 [15]. Heterogenność RNA jest wynikiem jego alternatywnego składowania oraz występowania w obszarze tego genu minimum trzech miejsc inicjacji transkrypcji i co najmniej sześciu miejsc sygnalizujących poliadenylację [15, 17]. Rodzaj powstającego transkryptu zależy od stadium rozwojowego *Drosophila* [18]. W intronach genu *dunce* stwierdzono obecność przynajmniej sześciu genów (patrz tabela 1): *Sgs-4* (z ang. *salivary gland secreted protein gene-4*), *Pig-1* (z

Tabela 1.

Lokalizacja poznanych genów intronowych genu *dunce*, oraz kierunek ich transkrypcji [15, 17].

Geny zlokalizowane w intronach genu <i>dunce</i>	Lokalizacja względem genu <i>dunce</i> (5'ekson/3'ekson)	Niść DNA (względem kodującej genu <i>dunce</i>)
<i>Pig-2</i>	0.9/1.0	?
<i>Pig-3</i>	0.9/1.0	?
<i>Sgs-4</i>	0.9/1.0	?
<i>Pig-1</i>	2.0/2.3	komplementarna
<i>Sgs-4</i>	2.0/2.3	kodująca
<i>Indnc</i>	2.8/3.0	kodująca
geny <i>sam</i>	2.8/-13	?

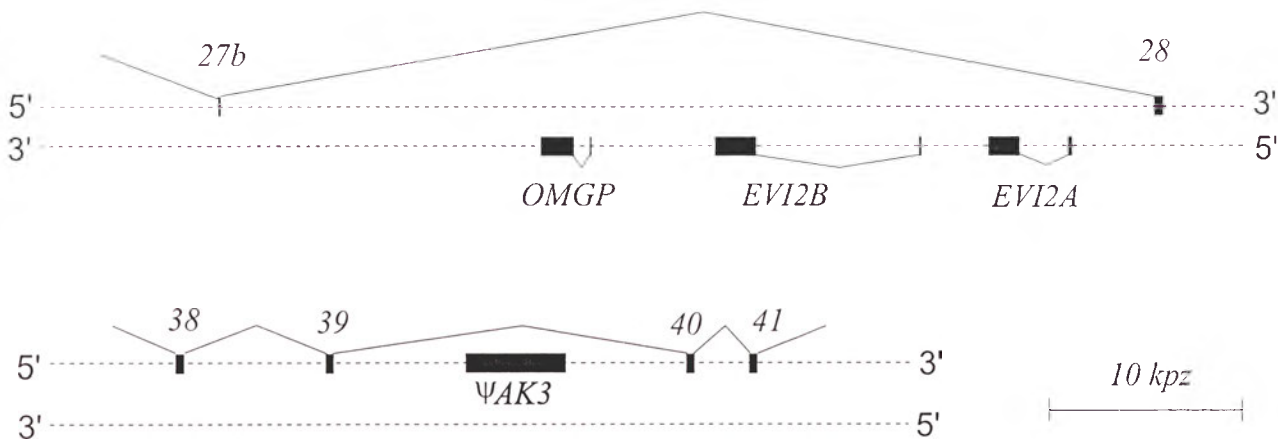
ang. *preintermolt gene-1*), *Indnc*, kolejny gen z rodziny *Sgs* i przynajmniej jeszcze dwa geny *Pig* [15, 17]. Podejrzewa się, że *locus dunce* kryje w sobie jeszcze inne geny, m.in. należące do grupy komplektacji zwanej *sam* (z ang. *sperm-amolite*) [14-15].

II-1.4. Geny *Rh4 / sina*

U *Drosophila melanogaster* w regionie intronu (9 kpz) genu *Rh4* na komplementarnej nici DNA zlokalizowano gen *sina* (*seven in absentia*), który także zawiera intron [19]. Produktem genu *sina* jest prawdopodobnie czynnik transkrypcyjny biorący udział w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacji różnicowania [20].

II-1.5. Geny *NF1/EVI2A, EVI2B, OMGR, ΨAK3*

Gen *NF1* (z ang. *Neurofibromatosis type 1*) obejmuje około 350 kpz [21-23] chromosomu 17q człowieka i składa się z 59 eksonów [22-24]. W in-



Rys. 3. Genomowa organizacja fragmentów genu *NFI* (eksony 27b, 28, 38, 39, 40, 41) człowieka z genami intronowymi (*OMGP*, *EVI2B*, *EVI2A*, Ψ *AK3*); zmienne wg 22-23.

tronic 27b (około 50 kbp) ułożone są trzy przeciwnie zorientowane geny mające intron (patrz rys. 3): *EVI2A* (*EVI2*; z ang. *ecotropic viral integration site*), *EVI2B* (*RC1*) [26] i *OMGP* (z ang. *oligodendrocyte-myelin glycoprotein*) [21-22, 24-25], a w intronie 39 znajduje się pseudogen kinazy adenylanowej 3 — Ψ *AK3* (1,7 kbp) o tej samej orientacji co gen *NFI* [22, 26-27].

II-1.6. Geny *GnRH*/*SH*; *CF VIII*/*F8A*, *F8B* oraz *ear-1*/*ear-7*

Znane są także inne przykłady aranżacji genów, o charakterze „*genu w genie*” występujące w genomach ssaków. Jednym z nich jest gen *GnRH* (z ang. *gonadotropin-releasing hormone*) występujący w genomie szczura w pojedynczej kopii. Składa się on z czterech eksonów. Pomiędzy eksonami 1 i 2, na komplementarnej nici DNA znajduje się gen *SH* o nieznannej funkcji. Analiza transkryptów obu genów wykazała, że ich eksony częściowo nakładają się na siebie, a ich ekspresja ma charakter tkankowo-specyficzny. *GnRH* ulega ekspresji w centralnym układzie nerwowym, podczas gdy transkrypty genu *SH* obecne są w tkankach serea [28].

W genomie ludzkim na chromosomie Xq28, odnalezione zostały dwa geny *F8A* i *F8B* zlokalizowane w regionie intronu 22 genu VIII czynnika koagulacji — *CF VIII* (z ang. *coagulation factor VIII*). Geny te znajdują się na nici komplementarnej względem nici DNA kodującej *CF VIII* [29-30]. Na chromosomie 17q21, na przeciwnych niciach DNA zlokalizowane są dwa geny będące homologami genu *erba* (*ear-1* i *ear-7*). Sekwencje kodujące tych genów częściowo nakładają się na siebie [31].

III. Transkrypcja „*genu w genie*”

Sprzężenie genów na chromosomie sugeruje ich funkcjonalne powiązanie lub/i wspólne pochodzenie ewolucyjne [32]. Zachowawcze i strukturalnie bliskie sąsiedztwo genów oznacza, że mogły one po-

powiązane funkcjonalnie nie wykazując jednak homologii sekwencji ani homologii struktury białka [38-41]. Po duplikacji genu lub/i przypadkowym zgrupowaniu niezależnych funkcjonalnie genów, mogły one pozostać w takim układzie ze względu na wiążące je interakcje typu *cis* (z ang. *cis-interactions*) w obrębie danego regionu chromosomu lub gdy regulacja ich ekspresji podlega kontroli jednego czynnika (tak jak zachodzi to w przypadku genów globin [42]). Relację pomiędzy układem genów a ich ekspresją można także zaobserwować w przypadku genów desmoglein [43] i homeotycznych [36-37]. Geny homeotyczne są znakomitą ilustracją układu sprzężeń genów w kompleksy, które dzięki funkcjonalnemu uzależnieniu zostały utrzymane w toku ewolucji. Wskazuje na to wysoka homologia sekwencji oraz zachowanie ich genomowej organizacji od czasu rozejścia się dróg ewolucyjnych stawonogów i kręgowców [36-37, 44-45].

Zastanawiające jest, czy układ „*genu w genie*” jest tylko jednym z równoznacznych, alternatywnych typów organizacji genów, czy ma dodatkowo jakieś znaczenie funkcjonalne. Od fizycznej organizacji genów może zależeć zarówno pozytywna jak i negatywna regulacja ich ekspresji. We wzajemnej regulacji aktywności genów zlokalizowanych blisko siebie

mogą brać udział interakcje typu *cis* jak również oddziaływania na zasadzie antysensu.

III-1. Interakcje typu *cis*

Do elementów regulatorowych oddziaływujących na drodze interakcji typu *cis* zaliczamy: kasetę TATA, kodon inicjujący, powtórzenia CG (z ang. *CpG islands*), elementy proksymalne względem promotora, oraz elementy wzmacniające (z ang. *enhancer*) lub osłabiające (z ang. *silencer*) siłę promotora [46]. Ze względu na względną bliskość genów pozostających w opisywanym układzie należy rozważyć możliwość korzystania przez nie ze wspólnych regionów regulatorowych [47].

Powyższą tezę potwierdzać mogą badania nad retrotranspozonomami, tym bardziej, że niektóre z intronowych genów wykazują cechy transpozonów [14-16, 27]. Przeprowadzone badania dowiodły, że insercja retrotranspozonu może prowadzić do zmiany aktywności genu poprzez dodanie lub przerwanie specyficznych elementów regulatorowych w genomie [48].

Analizując profile aktywności genów *sina* i *Rh4* możemy przypuszczać, że za ich ekspresję odpowiedzialny jest wspólny dla obu genów element regulatorowy, z którym wiążą się różne specyficzne tkankowo czynniki transkrypcyjne syntetyzowane w komórce w zależności od stadium rozwojowego owada. Gen *sina* jest współodpowiedzialny za prawidłowy rozwój komórek fotoreceptorowych R7 omatoidiów *Drosophila melanogaster*, natomiast gen *Rh4* koduje opsynę specyficzną dla tych komórek. Aktywność genu *sina* jest potrzebna w momencie różnicowania prekursorowej komórki fotoreceptorowej w typ R7. Produkt tego genu jest odpowiedzialny za przetwarzanie sygnałów pozycyjnych prawdopodobnie na zasadzie czynnika regulującego ekspresję innych genów. Produktem genu *sina* jest białko jądrowe [19-20], którego brak w prekursorowej komórce fotoreceptorowej powoduje, że przekształca się ona w komórkę soczewkową (z ang. *cone cell*) zamiast w R7 [19]. Osobliwością tego układu jest fakt, iż ekspresja obu genów zachodzi w komórkach tego samego typu. Fizyczne zgrupowanie tych genów w odniesieniu do ich funkcjonalnego powiązania jest intrygujące, aczkolwiek znaczenie tego układu jest niejasne. Podczas gdy aktywność genu *sina* determinuje los komórek R7, gen *Rh4* ulega ekspresji wyłącznie w tych komórkach. Do transkrypcji genu *Rh4* dochodzi tylko w komórkach R7 w późnym stadium ich różnicowania [49], natomiast ekspresja genu *sina* za-

chodzi wcześniej i w większej liczbie typów komórek [19, 50].

Regiony regulatorowe otaczające gen *LCP*, a znajdujące się wewnątrz intronu genu *Gart*, prawdopodobnie mają także wpływ na aktywność genu „gospodarza” na zasadzie oddziaływań typu *cis* [8]. Znanne są przypadki występowania w intronach sekwencji wzmacniających transkrypcję [51-53]. Część z nich może odpowiadać tkankowo-specyficznym elementom regulującym poziom ekspresji w innych poznanych genach *Drosophila* [54-58]. W przeciwieństwie do genu *LCP*, gen *Gart* wykazuje konstytutywną ekspresję niezależnie od stanu rozwojowego *Drosophila*. Ponadto stwierdzono, że ekspresja intronowego genu *LCP* jest nie tylko specyficzna dla stadium rozwojowego, ale również specyficzna tkankowo. Aktywacji ekspresji genu *LCP* towarzyszy wzrost stężenia mRNA będącego transkryptem genu kodującego enzymy syntezy puryn. Jego poziom szczególnie wzrasta podczas trzeciego stadium larwalnego i formowania poczwarki [7-8]. Może to świadczyć o obecności wspólnej sekwencji wzmacniającej (z ang. *bidirectionally active enhancer*) transkrypcję obu genów [8, 59].

Intronowe geny i/lub ich elementy regulatorowe mogą także być odpowiedzialne za podtrzymywanie transkrypcji genu, w którego intronie są ulokowane [22, 51-53]. Bardzo prawdopodobnym zdaje się to być w przypadku genu *dunce*. Należy on do grupy największych genów [60] — jego eksony rozłożone są na obszarze ponad 148 kpz [17]. Nie wiadomo jaki wpływ ma rozmiar genu na jego ekspresję. Mało prawdopodobnym wydaje się jednak, że polimeraza RNA jest w stanie syntetyzować tak długi pierwotny transkrypt [15].

Geny *Sgs-4* i *Pig-1* są transkrybowane w tym samym czasie. Ich bliskie położenie nasuwa przypuszczenie, że podlegają temu samemu regionowi regulatorowemu. Po obu stronach genu *Sgs-4* — zlokalizowane są sekwencje odpowiedzialne za wysoki poziom ekspresji oraz jej ograniczenie do niektórych tkanek i danego stadium rozwojowego (z ang. *spatial and temporal specificity*) [14].

Mutacje występujące w obszarze genu *NF1* uważa się za przyczynę występowania jednostki chorobowej zwanej nerwiakowłóknikowatością (z ang. *neurofibromatosis*; choroba Recklinghausena). Charakteryzuje się ona m.in. obniżoną zdolnością uczenia się, nadeiśnieniem nerkopochodnym (z ang. *renal hypertension*) i podatnością na nowotworzenie (z ang. *malignancies*) [61-62]. Niektóre z tych objawów mogą być pośrednim dowodem na powiązanie

ekspresji genu *NF1* z aktywnością jego genów intronowych. Gen *NF1* koduje cytoplazmatyczne białko należące do rodziny białek GAP (z ang. *GTPase activating protein*). Bierze ono, prawdopodobnie, udział w kontroli wzrostu komórki poprzez interakcje z białkami typu Ras [21] — co wyjaśniać może częstsze transformacje nowotworowe w przypadku mutacji tego genu. Inne objawy chorobowe można korelować z wystąpieniem delecji w regionie genu *NF1* powodującej inaktywację (lub usunięcie) jednego lub więcej genów zlokalizowanych w intronach. Szczególnie intrygująca jest potencjalna możliwość przypisania trudności w uczeniu się zmianom w regulacji ekspresji genu *OMGP*. Gen ten bierze udział w różnicowaniu komórek podczas rozwoju mózgu. Natomiast zmiany w ekspresji *EVI2A* lub *EVI2B* mogą okazać się odpowiedzialne za występowanie przewlekłej białaczki szpikowej typu dziecięcego (z ang. *juvenile chronic myelogenous leukemia*). Badania nad ekspresją tych genów wykazały ich tkankową specyficzność. Zaobserwowano obecność transkryptów: *NF1* w mózgu i krwi obwodowej, *OMGP* tylko w oligodendrocytach centralnego układu nerwowego, *EVI2A* w mózgu, krwi obwodowej i szpiku kostnym, a *EVI2B* we krwi obwodowej i szpiku kostnym (ale nie w mózgu) [21, 24-25, 63]. Istnieje także możliwość, że brak aktywności genu *NF1* (np. w wyniku częściowej delecji) prowadzi do nadekspresji intronowych genów genu *NF1*, odpowiedzialnych w ten sposób za niektóre objawy chorobowe nerwiakowłóknikowości [64]. Jednak prawdopodobna obecność enhancera (podobnego do enhancera genu kodującego łańcuch κ immunoglobulin) w genie

OMGP wskazywać może na jego udział w regulacji aktywności *NF1*, a nie odwrotnie [25].

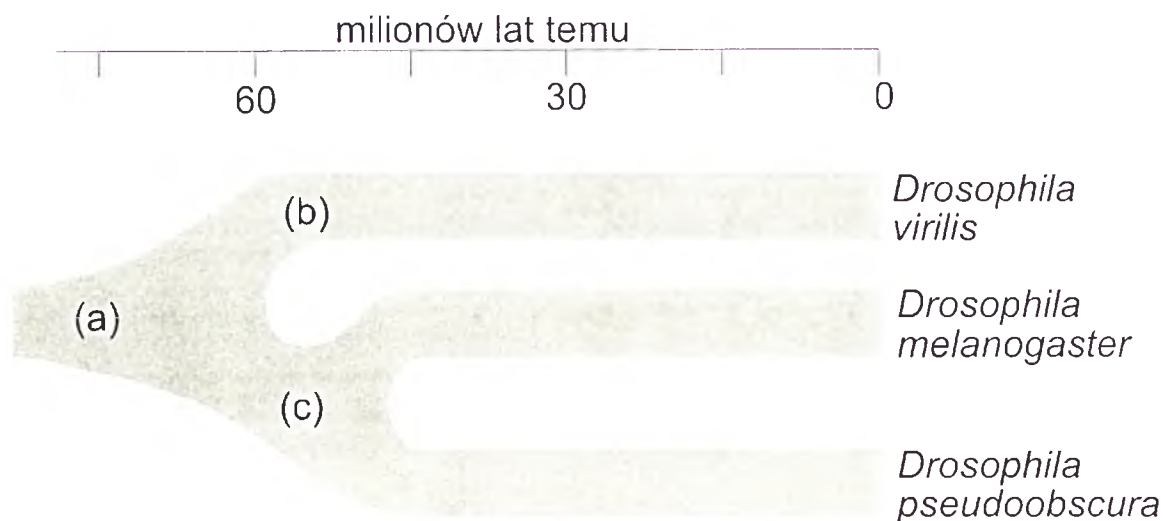
Do potencjalnych mechanizmów mogących brać udział w regulacji aktywności układu „genu w genie” należy blokada aktywności promotora (z ang. *promoter occlusion*) [47].

III-2. Regulacja transkrypcji genów intronowych poprzez antysensowne oligonukleotydy

Transkrypty genów pozostających w tak bliskim usytuowaniu mogą wpływać na ekspresję sąsiednich genów na zasadzie oddziaływań antysensu — jak ma to miejsce u Prokaryota [65]. Podczas równoległej transkrypcji genów leżących na przeciwnych niciach tego samego *loci* może dochodzić do formowania się dwuniciowych RNA, które następnie podlegałyby degradacji [47, 64, 66]. Bardzo prawdopodobna jest regulacja ekspresji genu *l(2)tid* przez gen *l(2)rot* na zasadzie antysensownego RNA. Potwierdziły to wstępne badania wykazujące, że transkrypt *l(2)rot* nie podlega translacji [11]. Natomiast badania na liniach komórkowych nad aktywnością genów *Gart* i *LCP* zdają się nie potwierdzać istnienia takiego typu regulacji w ich przypadku [7].

IV. Ewolucyjne przesłanki potwierdzające powiązanie pomiędzy genem gospodarzem a jego genem intronowym

Jednym z dowodów mogących potwierdzić funkcjonalne znaczenie układu „genu w genie” byłoby ewolucyjne utrwalenie ich fizycznej organizacji.



Rys. 4. Uproszczone drzewo ewolucyjne wybranych gatunków z rodzaju *Drosophila* (a), obrazujące rozejście się dróg ewolucyjnych tworzących podrodzaje *Drosophila* (b) i *Sophophora* (c) w czasie [uproszczone wg 67].

Drosophila melanogaster i *Drosophila virilis* wyewoluowały od wspólnego przodka około 60 do 80 milionów lat temu (patrz rys. 4). Jest to czas przyjęty za wystarczający aby upewnić się czy dany układ genów był ewolucyjnie faworyzowany [67-68]. Przeprowadzone badania wykazały, że pomimo dużego ewolucyjnego utrwalenia sekwencji genów *sina* i *Rh4* u tych dwóch gatunków ich chromosomowy układ jest inny. Geny *sina* i *Rh4* u *Drosophila virilis* nie tworzą układu „genu w genie” i są one zlokalizowane w innych miejscach chromosomu [68]. Zdaje się to zaprzeczać tezie, że ich aranżacja mogłaby mieć znaczenie funkcjonalne (np. regulatorowe). Chociaż przykład lokalizacji genów *Gart/LCP* oraz *l(2)not/l(2)tid* zdaje się tezę tę potwierdzać. Linie rozwojowe *Drosophila melanogaster* i *Drosophila pseudoobscura* rozeszły się co najmniej 40-50 milionów lat temu. Pomimo ewolucji, która od czasu ich wspólnego przodka dokonała zmian w ich genomie, układ genów *Gart/LCP* pozostał utrzymany. U *Drosophila melanogaster* każdy kodujący region posiada homologiczny odpowiednik u *Drosophila pseudoobscura*, zarówno w genie syntezy puryn jak i syntezy białka kutikuli. Dużą zachowawczość sekwencji zaobserwowano także pomiędzy niekodującymi regionami tego locus. Przejawia się ona w postaci szeregu segmentów (11-119 pz) o homologii dochodzącej do 100% -większej niż ta dotycząca regionów kodujących. Wszystkie segmenty ułożone są dokładnie w tej samej kolejności u obu gatunków, aczkolwiek poprzedzielane są odcinkami o różnej długości i sekwencji. Niekodujące segmenty mogą brać udział w regulacji obu genów na zasadzie cis-oddziaływań, a część z nich jest na pewno regionami regulatorowymi genu *LCP* [8]. Mocniejszym argumentem (ze względu na przestrzeń czasową dzielącą *D. melanogaster* i *D. virilis* od ich wspólnego przodka) opowiadającym się za ewolucyjnym utrwaleniem struktury genu w genie wynikłego z ich funkcjonalnego powiązania [70] jest genomowa organizacja *l(2)not/l(2)tid*. Zarówno u *Drosophila melanogaster* jak i *Drosophila virilis* geny te zachowały niezmienny układ, pomimo zmian w sekwencjach kodujących i faktu posiadania przez *l(2)not* *Drosophila virilis* „dodatkowego” (względem *Drosophila melanogaster*) krótkiego intronu rozdzielającego sekwencję homologiczną do eksonu 1 *l(2)not* *Drosophila melanogaster* [12-13, 69].

V. Pochodzenie „zagnieżdżonych” genów

Pochodzenie „zagnieżdżonych” genów można tłumaczyć trzema hipotezami:

a) insercja samego genu do intronu genu gospodarza,

b) insercja genu wraz z otaczającymi go sekwencjami niekodującymi — co należałoby rozumieć jako insercję „intronu”, który posiadał już pierwotnie gen — do genu gospodarza,

c) rozrost genu pociągający za sobą pochłanianie innych genów.

Pierwsza hipoteza zdaje się być bardzo prawdopodobną biorąc pod uwagę proces retrotranspozycji, lecz odnosić się ona może jedynie do intronowych genów o strukturze jednoeksonowej. Ostatnia natomiast dotyczyć mogłaby rozległych genów o kilku alternatywnych miejscach inicjacji lub/i terminacji transkrypcji, tak jak np. *dunce* i *NF1*.

Różnice w rozmieszczeniu genów *sina* i *Rh4* w chromosomach *Drosophila melanogaster* i *Drosophila virilis* wskazują, że po rozejściu się ich dróg ewolucyjnych jeden z tych genów uległ translokacji do innego regionu chromosomu. Gdyby jeden z genów uległ translokacji, a drugi pozostał w swej pierwotnej pozycji, wtedy układ genów otaczających przeniesiony gen powinien być inny u obu gatunków. Natomiast otoczenie stabilnego genu prawdopodobnie byłoby ewolucyjnie zachowane. Na podstawie tego założenia wykazano, iż — najprawdopodobniej to właśnie — gen *Rh4* zmienił swoją lokalizację na chromosomie w jednej z tych dwu linii ewolucyjnych, a *sina* pozostał w swojej pierwotnej lokalizacji. Gen *Rh4* mógł zostać przeniesiony zarówno z regionu *Rh4/sina* w linii ewolucyjnej *Drosophila virilis*, lub do regionu *sina* w linii *Drosophila melanogaster*. Układ genów otaczających region *Rh4/sina* u *Drosophila melanogaster* jest wysoce zbliżony do otoczenia genu *sina* u *Drosophila virilis*, natomiast nie znaleziono podobieństwa do regionu genu *Rh4* *Drosophila virilis* [68]. Takie przeniesienie genu do innego miejsca na chromosomie nie mogło naruszać funkcjonowania innych genów. Jednym z mechanizmów translokacji biorących udział w takim przeniesieniu mogła być retrotranspozycja — integracja do chromosomu odcinka DNA będącego kopią transkryptu (mRNA). W takich przypadkach geny pochodzenia retrotranspozycyjnego, z reguły, pozabawione są intronów (występujących w genach prekursorowych), często posiadają 3' region o charakterze poliadenylowanego końca i region integracji oskrzydłony sekwencjami powtórzonymi [68, 72-73]. Te trzy cechy spełnia gen *Rh4* u *Drosophila virilis*: (i) nie posiada intronu (w odróżnieniu od *Rh4* *Drosophila melanogaster*), (ii) występuje ciąg 18 dezoksyadenozyn na 3' końcu tego genu, za którym (iii) występuje sekwencja CAAAT poprzedzająca dwukrotnie

5' region tego genu. Ta pięcionukleotydomowa sekwencja może reprezentować powtórzenie tworzące się podczas transpozycji. Z tych danych wynika, że pierwotnym układem była formacja *Rh4/sina* występująca u *Drosophila melanogaster*, a transpozycja zaszła w linii ewolucyjnej prowadzącej do *Drosophila virilis*. Zakładając, że w linii ewolucyjnej *Drosophila virilis* doszło do transpozycji wydarzenie to musiało nastąpić na tyle wcześnie, aby sekwencja oryginalnego *Rh4* mogła się zmienić w stopniu uniemożliwiającym jej terażniejsze wykrycie [68]. Innymi zagnieżdżonymi genami pozbawionymi intronów, co wskazywać mogłoby na ich pochodzenie poprzez retrotranspozycję, są oba *Sgs*, *Pig-1* i *Indnc* ułożone w *locus* genu *dunce* [14-16] oraz $\Psi AK3$ z intronu *NF1* [27]. Wspomniane powyżej geny *Sgs* są jedynymi nie posiadającymi intronów przedstawicielami swojej rodziny [14]. Opierając się na założeniu, że genomowa struktura genów kinazy adenylanowej (*AK*) u ssaków jest bardzo konserwatywna [74], należy przypuszczać, że funkcjonalny gen *AK3* u człowieka składałby się z co najmniej pięciu eksonów obejmujących ponad 30 kpz [27].

Rozpatruje się także inną możliwą drogę wejścia genów *Sgs* i *Pig* w obszar *dunce* — na zasadzie „pochłonięcia” ich przez gen *dunce* w trakcie jego ewolucyjnego rozwoju. Powiązać z tym można jedną z bardziej atrakcyjnych hipotez wyjaśniających powstawanie wielu typów transkryptów tego genu, będących wynikiem bardzo skomplikowanej i rozległej jego struktury, jako rzekome reprezentowanie przez nie tkankowo-specyficznych izoform fosfodiesterazy cAMP. Gen *dunce* rozrastając się wcielałby w swój *locus* sąsiadujące geny zyskując przez to kolejne promotory [15].

Jakkolwiek retrotranspozycja jest bardzo prawdopodobną drogą prowadzącą do powstania „zagnieżdżonych” genów, nie tłumaczy ona pochodzenia genów zawierających intron w intronie genu gospodarza. Można jedynie domniemywać udziału duplikacji i insercji w tym procesie. Insercyjny model przeniesienia genu intronowego wraz z otaczającymi go sekwencjami niekodującymi do genu gospodarza zdaje się być potwierdzony przez badania nad organizacją *locus Gart* wśród przedstawicieli z rzędu *Diptera*. *Locus ten* u *Chironomus tentans* (którego wspólny z *Drosophila melanogaster* przodek istniał 135-65 milionów lat temu) wykazuje znaczne podobieństwo w strukturze i organizacji do opisanego u *Drosophila melanogaster* [75].

Jak dotąd nie opisano organizacji, w której dwa geny — oba posiadające introny — wzajemnie zawierałyby w nich swoje kolejne eksony. Taka konfi-

guracja byłaby prawdopodobna gdyby mechanizmem powstawania opisywanej struktury byłoby taśmowanie eksonów. Wszystkie przytoczone powyżej przykłady opisują geny intronowe, które w całości znajdują się w intronie genu gospodarza — co jednoznacznie przemawia za teorią insercyjną.

VI. Uwagi końcowe

Pomimo, że funkcjonalne powiązanie genów pozostających w opisanym powyżej zależności strukturalnej nie zostało jeszcze jednoznacznie udokumentowane należy założyć, że jest ono bardzo prawdopodobne. Istnienie takich układów świadczy o wysokiej złożoności struktur genomu oraz elastyczności mechanizmów ekspresji.

Kolejnym interesującym elementem strukturalnym zaangażowanym w organizację informacji genetycznej są twintrony — introny zlokalizowane wewnątrz intronów. Zostały one pierwotnie odkryte w genomie chloplastowym *Euglena gracilis* [76]. Zarówno intronowe geny jak i twintrony zostały stosunkowo niedawno odkryte. Nie poznano jeszcze ich prawdziwej roli w mechanizmach regulacji ekspresji, która zachodzić może zarówno na poziomie transkrypcji jak i obróbki RNA.

Podziękowanie

Artykuł został napisany w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez KBN.

Artykuł otrzymano 22 maja 1997 r.

Zaakceptowano do druku 15 kwietnia 1999 r.

Literatura

1. Cavalier-Smith T (1991) *Trends in Genet* 7: 145-148
2. Jacq C, Lazowska J, Slonimski PP (1980) *CR Acad Sc Paris*, ser. D, 290: 89-92
3. Colleaux L, d'Auriol L, Betermier M, Cottarel G, Jacquier A, Galibert F, Dujon B (1986) *Cell* 44: 521-533
4. Zinn AR, Butow RA (1985) *Cell* 40: 887-893
5. Kotylak Z, Lazowska J, Hawthorne DC, Slonimski PP (1985) *Achievements and perspectives in mitochondrial research* 2: 1-20
6. Michel F, Lang BF (1985) *Nature* 316: 641-643
7. Henikoff S, Keene MA, Fechtel K, Fristrom JW (1986) *Cell* 44: 33-42
8. Henikoff S, Eghtedarzadeh MK (1987) *Genetics* 117: 711-725
9. Kurzik-Dumke U, Zengerle A (1996) *Biochim Biophys Acta* 1308: 177-181
10. Kurzik-Dumke U, Neubauer M, Debes A (1996) *Gene* 171: 163-170
11. Kurzik-Dumke U (1996) W: Hengstler JG, Oesch F (red) *Control Mechanisms of Carcinogenesis*, Springer Verlag, Berlin, str. 215-235

12. Kaymer M, Debes A, Kress H, Kurzik-Dumke U (1997) *Gene* **204**: 91-103
13. Kurzik-Dumke U, Kaymer M., Gundacker D, Debes A, Labitzke K (1997) *Gene* **200**: 45-58
14. Chen Ch-N, Malone, Beckendorf SK, Davis RL (1987) *Nature* **329**: 721-724
15. Davis RL, Dauwalder B (1991) *Trends in Genet* **7**: 224-229
16. Furia M, Digilio FA, Artiaco D, Giordano E, Polito L (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 5837-5841
17. Qiu Y, Chen Ch-N, Malone T, Richter L, Beckendorf SK, Davis RL (1991) *J Mol Biol* **222**: 553-565
18. Davis RL, Davidson N (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 1464-1470
19. Carthew RW, Rubin GM (1990) *Cell* **63**: 561-577
20. Moses K (1991) *Trends in Genet* **7**: 250-255
21. Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, Weiss R (1990) *Cell* **62**: 599-608
22. Li Y, O'Connell P, Huntsman-Breidenbach H, Cawthon R, Stevens J, Xu G, Neil S, Robertson M, White R, Viskochil D (1995) *Genomics* **25**: 9-18
23. Weiss R (1995) *GenBank L05367*
24. Cawthon RM, Weiss R, Xu G, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, White R (1990) *Cell* **62**: 193-201
25. Viskochil D, Cawthon R, O'Connell P, Xu G, Stevens J, Culver M, Carey J, White R (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 906-912
26. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, White R, O'Connell P (1990) *Cell* **62**: 187-192
27. Xu G, O'Connell P, Stevens J, White R (1992) *Genomics* **13**: 537-542
28. Adelman JP, Bond CT, Douglass J, Herbert E (1987) *Science* **235**: 1514-1517
29. Levison B, Kenwick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J (1990) *Genomics* **7**: 1-11
30. Naylor JA, Buck D, Green PM, Williamson II, Bentley D, Giannelli F (1995) *Hum Mol Genet* **4**: 1217-1224
31. Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushige S, Matsubara K, Toyoshima K, Yamamoto T (1989) *Cell* **57**: 31-39
32. Colombo P, Yon J, Garson K, Fried M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6358-6362
33. Goodman M, Czelusniak J, Koop BF, Tagle DA, Slightom JL (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**: 875-890
34. Steinmetz M, Winoto A, Minard K, Hood L (1982) *Cell* **28**: 489-498
35. Hanson I, Ragoussis J, Trowsdale J (1991) *Int J Cancer Suppl* **6**: 18-19
36. Kessel M, Gruss P (1990) *Science* **249**: 374-379
37. Akam M (1989) *Cell* **57**: 347-349
38. Sturm RA, Dalton S, Wells JR (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 8571-8586
39. Albig W, Kardalidou E, Drabent B, Zimmer A, Doenecke D (1991) *Genomics* **10**: 940-948
40. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D (1990) *Science* **248**: 1517-1523
41. Carlson LM, Oettinger MA, Schatz DG, Masteller EL, Hurley EA, McCormack WT, Baltimore D, Thompson CB (1991) *Cell* **64**: 201-208
42. Grosveid F, van Assendelft GB, Graves DR, Kollias G (1987) *Cell* **51**: 975-985
43. Simrak D, Cowley CME, Buxton RS, Arnemann J (1995) *Genomics* **25**: 591-594
44. Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R (1989) *Cell* **57**: 367-378
45. Duboule D, Dolle P (1989) *EMBO J* **8**: 1497-1505
46. Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1996) *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York, NY, str. 435-442
47. Huxley C, Fried M (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 605-614
48. Bronner G, Taubert H, Jackle H (1995) *Chromosoma* **103**: 669-675
49. Montell C, Jones K, Zuker C, Rubin G (1987) *J Neurosci* **7**: 1558-1566
50. Pollock JA, Benzer S (1988) *Nature* **333**: 779-782
51. Banerji J, Olsen L, Schaffner W (1983) *Cell* **33**: 729-740
52. Gillies S, Morrison S, Or V, Tonegawa S (1983) *Cell* **33**: 717-728
53. Slater EP, Rabenau O, Karin M, Baxter JD, Beato M (1985) *Mol Cell Biol* **5**: 2984-2992
54. Bourouis M, Richards G (1985) *Cell* **40**: 349-357
55. Lewis R, Hazelrigg T, Rubin GM (1985) *EMBO J* **4**: 3489-3499
56. Pirrotta V, Steller H, Bozzetti MP (1985) *EMBO J* **4**: 3501-3508
57. Hiromi Y, Kuroiwa A, Gehring WJ (1985) *Cell* **43**: 603-613
58. Fisher JA, Maniatis T (1986) *EMBO J* **5**: 1275-1289
59. Lennard AC, Fried M (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 1281-1294
60. Lewin B (1994) *Genes*, Oxford Univ. Press, Oxford, str. 682-687
61. Riccardi MV, Eichner JE (1986) *Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis*, Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, MD
62. Crowe FW, Schull WT, Neel JF (1956) *A Clinical, Pathological, and Genetic Study of Multiple Neurofibromatosis*, Thomas, Springfield, IL
63. Cawthon R, O'Connell P, Buchberg A, Viskochil D, Weiss R, Culver M, Stevens J, Jenkins N, Copeland N, White R (1990) *Genomics* **7**: 555-565
64. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Leitcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, Brownstein BH, Collins FS (1990) *Science* **249**: 181-186
65. Inouye M (1988) *Gene* **72**: 25-29
66. Williams T, Fried M (1986) *Nature* **322**: 275-279
67. Beverley SM, Wilson AC (1984) *J Mol Evol* **21**: 1-13
68. Neufeld TP, Carthew RW, Rubin GM (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10203-10207
69. Kaymer M, Kurzik-Dumke U (1997) *GenBank Y10074*
70. Throckmorton LH (1975) W: King RC (red) *Handbook of Genetics*, Plenum, New York str. 421-469
71. Kurzik-Dumke U, Gundacker D, Rentrop M, Gatteff E (1995) *Dev Genet* **16**: 64-76
72. Baltimore D (1985) *Cell* **40**: 481-482
73. Vanin EF (1985) *Ann Rev Genet* **19**: 253-272
74. Nakazawa A, Yamada M, Tanaka H, Shahjahan M, Tanabe T (1990) W: Ogita Z-I, Markert CL (red) *Gene structure of three vertebrate adenylate kinase isozymes. W: Isozymes: Structure, Function and Use in Biology and Medicine*, Wiley-Liss, New York, str. 495-514
75. Clark DV, Henikoff S (1992) *J Mol Evol* **35**: 51-59
76. Copertino DW, Hallick RB (1993) *Trends in Biochem Sci* **18**: 467-471

Udział wirusowych i komórkowych białek IAP w regulacji apoptozy i przeżycia komórek

Participation of IAP proteins in the regulation of apoptosis and cell survival

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Ogólna charakterystyka białek IAP
- III. Mechanizmy działania białek IAP
 - III-1. Interakcja białek IAP z czynnikami TRAF
 - III-1.1. Charakterystyka czynników TRAF i ich funkcje w komórce
 - III-1.2. Współdziałanie białek IAP i czynników TRAF w przekazywaniu sygnałów
 - III-2. Interakcja białek IAP z induktorami apoptozy z tkanek owadów
 - III-2.1. Charakterystyka i działanie owadzych induktorów apoptozy
 - III-2.2. Udział białek IAP w modulowaniu działania owadzych induktorów apoptozy
 - III-3. Białka IAP jako inhibitory kaspaz
- IV. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. General characteristics of IAP proteins
- III. Mechanism of actions of IAP proteins
 - III-1. Interaction of IAP proteins with TRAF factors
 - III-1.1. Characteristics of TRAF factors and their cellular functions
 - III-1.2. Interactions of IAP proteins and TRAF factors in signal transduction
 - III-2. Interaction of IAP proteins with insect inducers of apoptosis
 - III-2.1. Characteristics and action of insect inducers of apoptosis
 - III-2.2. Participation of IAP proteins in modulation of action of insect inducers of apoptosis
 - III-3. IAP proteins as caspase inhibitors
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: Apaf-1 — *Apoptosis associated factor 1*; BIR — domena aminokwasowa w białkach IAP bakulowirusów (*baculovirus IAP-like repeat*); BRUCE — enzym (*BIR repeat containing ubiquitin conjugating enzyme*); CARD — domena białkowa uczestnicząca w wiązaniu kaspaz (*caspase recruitment domain*); CD30, CD40 — błonowe receptory z nadrodziny receptorów TNF; CRADD — białko adaptorowe z DD wiążące kinazę RIP i kaspazy (*caspase and RIP adaptor with death domain*); CrmA — wirusowy inhibitor kaspaz, tzw. serpina (*cytokine response modifier*); DD — domena śmierci (*death domain*); drICE — kaspaza z *Drosophila melanogaster*; FADD — białko adaptorowe z domeną śmierci wiążące się z receptorem FAS (*FAS associating protein with death domain*); IAP — inhibitor apoptozy (*inhibitor of apoptosis*); FAS — antygen powierzchniowy, jeden z receptorów z nadrodziny TNF; IκB — inhibitor czynnika transkrypcyjnego NFκB; α,β IKK — kinazy fosforylujące IκB (*NIK interacting protein kinases*); JNK — kinazy fosforylujące N-koniec białka Jun (*JUN-N-terminal kinases*); MAPK — kinaza aktywowana

przez mitogen (*mitogen activated protein kinase*); NAIP — białko IAP z neuronów (*neuronal apoptosis inhibitory protein*); NFκB, p50 i p65 — czynnik transkrypcyjny i jego podjednostki; NIK — kinaza indukująca NFκB (*NFκB inducing kinase*); p35 — wirusowy inhibitor kaspaz; vREL — wirusowy homolog NFκB; RIP — kinaza ser/thr, białko oddziałujące z receptorem (*receptor interacting protein*); SAPK — kinazy aktywowane w wyniku stresu (*stress activated protein kinases*); TNF — czynnik martwicy nowotworu (*tumour necrosis factor*); TNF-R1/R2 — błonowe receptory TNF (*receptors TNF-R1/R2*); TRADD — białko adaptorowe z domeną śmierci wiążące się z receptorem TNF-R1 (*TNF-R1 associated death domain protein*); TRAF — czynnik białkowy wiążący się z receptorami TNF (*TNF-receptor associated factor*); TRANCE — cytokina pokrewna TNF.

I. Wstęp

Apoptoza w dużej mierze odpowiada za tkankową i narządową homeostazę organizmów. Wiele stanów patologicznych, przede wszystkim liczne choroby neurodegeneracyjne, wynika, jak się sądzi, ze zbyt intensywnej apoptozy komórek. Z upośledzeniem zaś apoptozy wiąże się przede wszystkim rozwój

*Prof. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; e-mail: bgs@nencki.gov.pl

wielu nowotworów i ich oporność na chemioterapię oraz oporność komórek na infekcje wirusowe, a także liczne zaburzenia autoimmunologiczne [1-4].

Cechą charakterystyczną komórek ulegających apoptozie, niezależnie od rodzaju wywołującego ten proces czynnika, jest uruchomienie w nich ewolucyjnie utrwalonej kaskady procesów proteolitycznych i nukleolitycznych. Głównymi efektorami tych procesów są proteazy cysteinowe, tzw. kaspazy, [5-10] oraz kilka endonukleaz, z których największe zainteresowanie wzbudza zidentyfikowana w 1998 r endonukleaza CAD (*caspase-activated- deoxyribonuclease*) [11, 12]. W efekcie działania wymienionych enzymów w komórce ulega degradacji wiele cytoplazmatycznych i jądrowych białek oraz DNA, następuje destrukcja elementów strukturalnych, tworzenie tzw. ciałek apoptotycznych i dezintegracja komórki.

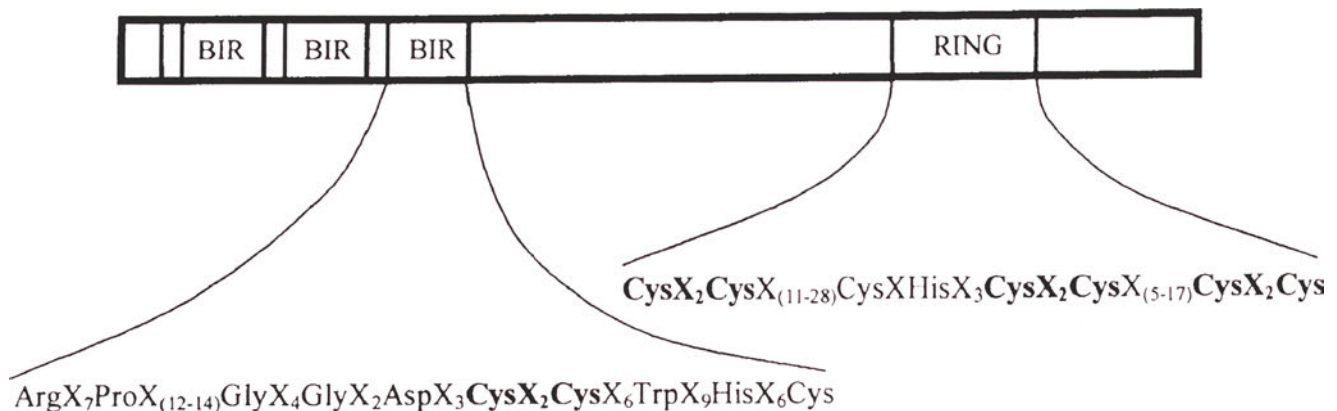
Przebieg apoptozy kontrolują liczne białka, które promują lub przeciwdziałają śmierci apoptotycznej. Najwcześniej poznanymi regulatorami apoptozy są błonowe białka z rodziny Bcl-2 [12-18]. Są nimi zarówno białka hamujące apoptozę (np. Bcl-2, Bcl_xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-2L1, Bfl-1) jak i promujące jej przebieg (np. Bax, Bad, Bak, Bik). W cząsteczce białka Bcl-2 i jego homologów nie występują elementy strukturalne, które mogłyby sugerować jakie są biochemiczne mechanizmy ich działania. Sądzi się natomiast, że lokalizacja wewnątrzkomórkowa białka Bcl-2 i jego homologów determinuje ich działanie. Występowanie Bcl-2 i prawie wszystkich jego homologów (z wyjątkiem BAD) w powiązaniu z błonami — zewnętrzną błoną mitochondrialną, błoną jądrową i siateczką śródplazmatyczną sugeruje udział tych białek w funkcjonowaniu mitochondriów, przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu oraz regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia [19-21]. Szereg danych wskazuje także na istotny

udział białek z rodziny Bcl-2 w regulacji aktywności kaspaz [22, 23], zwłaszcza w aktywacji prokaspazy 9 [24-30].

Na początku lat 90-tych zidentyfikowano szereg innych białek niż należące do rodziny Bcl-2, które przejawiają zdolność do hamowania apoptozy i określono je jako białka IAP (*inhibitory apoptosis proteins*). Po raz pierwszy wykryto je w wirusach owadzych, tzw. bakulowirusach wywołujących poliedrozę jądrową [31-34], w których wykazano już wcześniej obecność antyapoptotycznego białka p35. Następnie białka IAP znaleziono w komórkach owadów [np. 35, 36], gryzoni [37], ptaków [38], ssaków [39-42], a także w 1998 roku w komórkach drożdży [43]. Powszechność występowania tych antyapoptotycznych białek, regulowana ekspresja, przynajmniej niektórych z nich, podczas rozwoju i różnicowania organizmów [44], a także obecność pewnych z nich w komórkach wielu nowotworów [45] sprawia, że są one przedmiotem bardzo intensywnych badań.

II. Ogólna charakterystyka białek IAP

Białka IAP są polipeptydami o różnej długości (~ od 150 do 1500 AA), w których wykazano między innymi obecność dwu charakterystycznych domen: w N-końcu domeny BIR (*baculovirus IAP-like repeats*) oraz przy C-końcu domeny RING [46] (Ryc. 1). Domena BIR to około 65 aminokwasów, wśród których występują sekwencje CysX₂Cys i CysX₆His, co wskazuje, że białka te mogą wiązać jony Zn. Poszczególne białka IAP charakteryzują się obecnością najczęściej kilku ułożonych tandemowo domen BIR (Tabela 1), znane są jednak białka tylko z jedną domeną BIR, i to zarówno białka wirusów, nicieni czy też komórek ludzkich. Białek z domeną BIR nie wykryto, jak dotąd, w roślinach i bakteriach [47]. Suge-



Ryc. 1. Schemat budowy białek IAP, na przykładzie ludzkiego białka X-IAP [wg. 46]. Wytłuszczono sekwencje aminokwasowe biorące udział w wiązaniu jonów Zn.

rując się ostatnio, by białkom IAP nadać nazwę białek BIR, właśnie ze względu na powszechność występowania w ich cząsteczkach tej sekwencji aminokwasowej [43]. Nie wszystkie domeny BIR są "równocenne". Wprawdzie większość białek zawierających te domeny hamuje apoptozę, jednak znane są pewne białka wirusowe, jak np AcNPV-IAP [48] nie przejawiające tej właściwości. Poprzez domeny BIR białka IAP wiążą się z różnymi białkami promującymi apoptozę (patrz rozdz. III).

Ostatnio ukazała się praca donosząca o występowaniu domeny BIR, również w cząsteczce enzymu z różnych tkanek gryzoni, który uczestniczy w wiązaniu ubikwityny z białkami mającymi ulec degradacji proteolitycznej w proteasomie tzw. *ubiquitin conjugating enzyme* [49]. Enzym ten, występujący w aparacie Golgiego i nazwany BRUCE (*BIR repeat containing ubiquitin conjugating enzyme*) stanowi pierwszy przykład białka IAP o znanej aktywności enzymatycznej. Jak dotąd nie wiadomo o białkowych substratach BRUCE. Wysuwa się przypuszczenie, że może on uczestniczyć w nieznanych jeszcze powiązaniach szlaków antyapoptotycznych ze szlakiem zależnej od proteasomu proteolizy białek. Można spekulować, czy aktywność enzymu BRUCE może regulować białka wiążące się z domeną BIR, albo też czy BRUCE może skierowywać kaspazy na

drogę degradacji. Proteolityczna inaktywacja kaspaz mogłaby w efekcie nieodwracalnie wyłączać specyficzne szlaki prowadzące do śmierci komórek.

Drugą typową domeną w białkach IAP jest domena RING o strukturze palca cynkowego występująca w C-końcu cząsteczki (Ryc. 1) [34, 46]. Należy zaznaczyć, że domenę RING znaleziono w kilkudziesięciu białkach, które występując w cytoplazmie lub jądrze komórkowym uczestniczą między innymi w regulacji transkrypcji, w naprawie i rekombinacji DNA, oraz w procesach apoptozy i różnicowania [50, 51]. Domena RING występuje w większości poznanych dotychczas białek IAP (Tabela 1). Wydaje się, że jej obecność nie jest konieczna, aby białko IAP mogło hamować apoptozę. Co więcej, usunięcie tego fragmentu cząsteczki z białka D-IAP-1 muszki owocowej zwiększa nawet jego antyapoptotyczne właściwości. Domena RING nie występuje też w ludzkich białkach NAIP i surwiwinie, które są bardzo aktywnymi inhibitorami apoptozy komórek nerwowych [NAIP;40] oraz licznych komórek nowotworowych [44, 45].

Domeny BIR i RING rozdzielone są tzw. łącznikiem o różnej długości, krótszym w wirusowych białkach IAP, dłuższym zaś w białkach z komórek ssaków. Jego funkcja nie jest jeszcze znana, podobnie jak funkcja domeny CARD obecnej w ludzkich

Tabela 1.

Przykłady białek IAP (dane i nomenklatura wg 43, 47)

Organizm	Białko IAP	Liczba domen BIR	Obecność domeny RING	Hamowanie apoptozy
Bakulowirusy	cV-IAP	1	+	+
	OpNV-IAP	2	+	+
	GPGV-IAP	2	+	+
	AcNPV-IAP	2	+	-
	BmNPV-IAP	2	+	-
<i>Saccharomyces pombe</i>	Sp-BIR1	2	-	?
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc-BIR2	2	-	?
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ce-BIR2	1	-	?
	Ce-BIR1	2	-	?
<i>Drosophila melanogaster</i>	D-IAP1	2	+	+
	D-IAP2	3	+	+
<i>Mus musculus</i>	mMIIA	3	+	+
<i>Homo sapiens</i>	X-IAP	3	+	+
	cIAP-1/MIIIB*	3	+	+
	cIAP-2/MIIIC*	3	+	+
	NAIP	3	-	+
	surwiwina	1	-	+

* w białkach cIAP-1 i cIAP-2 występuje również domena CARD

białkach cIAP-1 i cIAP-2. Dotychczas wiadomo było, że domena CARD (*caspase recruitment domain*) stanowi ten fragment cząsteczki tzw. białek adaptorowych typu CRADD i Apaf-1, poprzez który wiążą się one z prodomenami kaspaz 8 i 2 [52]. Białka cIAP-1 cIAP-2 wiążą się jednak z aktywnymi kaspazami poprzez domenę BIR a nie CARD [53].

III. Mechanizmy działania białek IAP

W jaki sposób białka IAP hamują apoptozę jeszcze nie wyjaśniono. Fakt blokowania przez nie apoptozy — wywoływanej przez tak różne induktory jak czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), ligand receptora FAS (FAS-L), niektóre chemioterapeutyki (np. cisplatyna, etopozyd, aktynomycyna D), kaspazy [36, 37, 54, 55], a także białkowe induktory apoptozy typu Reaper, Grim, Hid i Doom z tkanek owadów (patrz rozdz. III.2) — sugeruje, że miejscem działania białek IAP muszą być kluczowe etapy tego procesu. Szereg nowych danych wskazuje, że u podstaw działania białek IAP leży zakłócenie przez nie przekazywania sygnału do apoptozy lub przeżycia komórek, w wyniku tworzenia heterokompleksów z białkami uczestniczącymi w tych procesach, a także bezpośrednie ich oddziaływanie z efektorowymi kaspazami.

III-1. Interakcja białek IAP z czynnikami TRAF

III-1.1. Charakterystyka czynników TRAF i ich funkcji w komórce

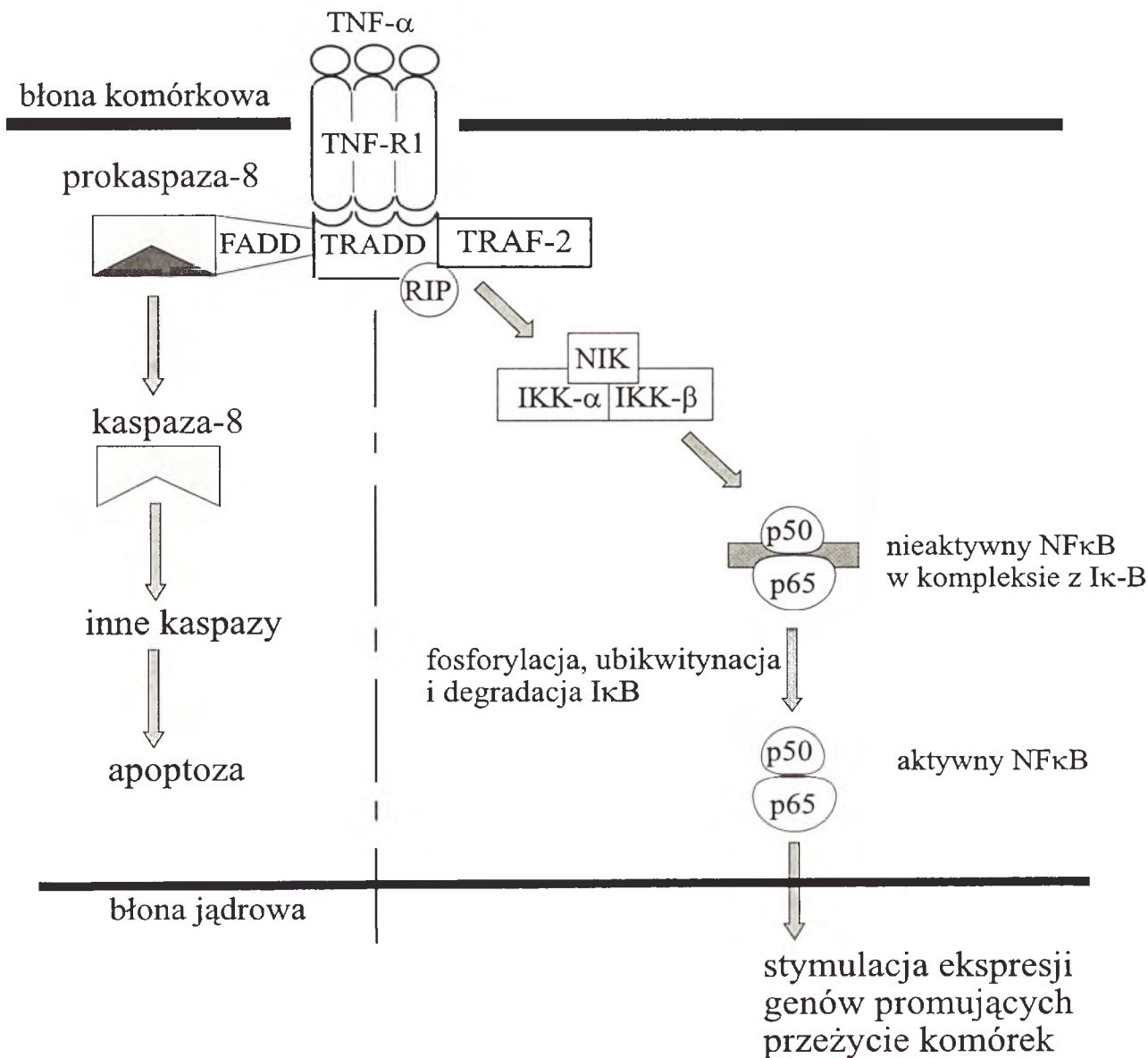
Czynniki TRAF (*TNF-receptor-associated factors*) stanowią liczną grupę cytoplazmatycznych białek, które pośredniczą w przekazywaniu sygnałów powstających po aktywacji przez cytokiny wielu błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R [10, 56-58]. Sygnały te prowadzą do plejotropowej odpowiedzi komórek, w tym między innymi do apoptozy czy też stymulacji procesów zapalnych, a także do promowania przeżycia komórek mimo obecności czynników uszkadzających.

W 1994 roku doniesiono po raz pierwszy o obecności czynników TRAF-1 i TRAF-2 w kompleksie z podbłonowym fragmentem receptora TNF-R2, którego rola w przekazywaniu sygnału wywoływanego przez TNF- α polega nie na promocji apoptozy, lecz na ich udziale w promowaniu przeżycia komórek [59]. W następnych latach okazało się, że białka TRAF-1 i TRAF-2, jak również inne białka TRAF (TRAF 1-6) wiążą się też z receptorem TNF-R1, uczestniczącym w generowaniu sygnałów i do apoptozy i do przeżycia komórek [60-62], a także, między

innymi, z receptorami CD30 [63, 64] i CD40 [65] czynnymi w aktywacji limfocytów T i B. Wiązanie czynników TRAF z cytoplazmatycznymi, podbłonowymi fragmentami receptorów może następować bezpośrednio, co stwierdzono w przypadku wiązania z receptorem TNF-R2 [59], CD30 [64] i CD40 [65] lub też za pośrednictwem białka adaptorowego TRADD. Białko to zawiera tzw. domenę śmierci i jest istotnym składnikiem kompleksu inicjującego apoptozę komórek po aktywacji przez TNF- α receptora TNF-R1 [61, 62] (Ryc. 2A). W powiązaniach TRAF z receptorami błonowymi uczestniczy C-końcowy fragment jego cząsteczki (tzw. domena TRAF, 230 AA), biorący także udział w interakcjach prowadzących do powstania homodimerów i heterodimerów czynnika TRAF [66].

Podstawową funkcją czynnika TRAF-2 w komórkach wydaje się być, przynajmniej dotychczas, jego udział w aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B [67, 68]. Jego aktywacja pojawia się jako jedna z odpowiedzi komórek na działanie TNF- α [60, 62] (Ryc. 2B), czy też np. specyficznych ligandów wiążących się z występującymi w błonach receptorem D30 [63], receptorem CD40 [60] oraz receptorem cytokiny TRANCE [69]. TRAF-2 pośredniczy w przekazywaniu sygnału z podbłonowego kompleksu złożonego poza nim z części cytoplazmatycznej receptora TNF-R1, białka TRADD, kinazy białkowej RIP do kilku kinaz białkowych (NIK, IKK α , IKK β). Kinazy te fosforylują inhibitor I κ B znajdujący się w kompleksie z czynnikiem transkrypcyjnym NF κ B, który następnie ulega ubikwitynacji i degradacji w proteasomie, a aktywny NF κ B przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego i reguluje ekspresję wielu genów promujących przeżycie komórek [68, 70] (Ryc. 2B).

Drugą istotną funkcją czynników TRAF jest też niewątpliwie ich wpływ na aktywację kinaz JNK/SAPK [70-73] i/lub kinazy p38 MAPK [74], które biorą udział również w aktywacji innych, niż NF κ B, czynników transkrypcyjnych (np. ATF-2, c-Jun, AP-1, p300/CBP2). Do takich oddziaływań czynników TRAF niezbędny jest N-końcowy fragment ich cząsteczki, zawierający kilka sekwencji aminokwasowych typu palca cynkowego [71, 72, 76]. Kluczowe znaczenie TRAF-2 w aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B i szlaku kinaz potwierdzają obserwacje myszy transgenicznych pozbawionych genu kodującego TRAF-2. Myszy te charakteryzuje między innymi podwyższona śmiertelność we wczesnych etapach rozwoju, atrofia grasicy i śledziony, zwiększona wrażliwość ich komórek na apoptotyczne działanie TNF- α [75].



Ryc. 2. Proapoptotyczna i antyapoptotyczna odpowiedź komórek na działanie TNF- α . Kluczowa rola różnych kompleksów białka adaptorowego TRADD w promocji apoptozy (A) lub przeżycia komórek (B). Objaśnienia symboli w spisie skrótów. Zakresowany obszar w cząsteczce prokaspazy 8 oznacza fragment usuwany podczas aktywacji.

Poziom czynników TRAF w komórce regulowany jest poprzez transkrypcję (patrz III-1.2), proteolityczny rozkład przeprowadzany prawdopodobnie przez kalpainy i być może inne proteazy [64], a także dzięki kompleksowaniu z endogennymi inhibitorami typu I-TRAF [76]. Sugeruje się, że inhibitor ten zdolny jest do utrzymywania TRAF-2 w postaci nieaktywnej i blokowania dzięki temu dróg sygnałowych, w których uczestniczy. Nasuwa się pytanie, czy w ten sam sposób działają kompleksujące z czynnikiem TRAF-2 białka IAP.

III-1.2. Współdziałanie białek IAP i czynników TRAF w przekazywaniu sygnałów

Dwa białka IAP wyizolowane z komórek ssaków, cIAP-1 i cIAP-2, zdolne są do hamowania apoptozy indukowanej przez TNF- α . Mogą one bowiem wy-

stępować w podbłonowych kompleksach z receptorem TNF-R1 [37, 41, 42, 62] i receptorem TNF-R2 [42, 76]. W niektórych komórkach wykrywa się także cytoplazmatyczne kompleksy białek IAP z czynnikami TRAF1 i TRAF2 [42]. Obserwacje te zasugerowały udział białek IAP w procesach, w których uczestniczą czynniki TRAF.

Ostatnie lata przyniosły, przynajmniej częściowe, zrozumienie współdziałania białek cIAP-1 i cIAP-2 w regulacji szlaków indukowanych przez TNF- α i prowadzących do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B jak i apoptozy. W badaniach udziału cIAP-2 w ochronie komórek limfocytarnych Jurkat przed działaniem TNF- α wykazano bowiem, że cIAP-2 hamuje apoptozę tylko wówczas, gdy w komórkach występuje aktywny NF κ B. Co więcej wykazano, że w wyniku nadekspresji cIAP-2 dochodzi

w komórkach do aktywacji NFκB, prawdopodobnie wskutek zwiększenia proteolitycznej degradacji jego inhibitora [77]. Zmutowana, niezawierająca domeny RING, forma cIAP-2, w przeciwieństwie do formy prawidłowej, hamuje aktywację NFκB przez TNF-α, w której jak już dyskutowano (r.III-1.1) pośredniczą czynniki TRAF. Mechanizm tego działania, być może polegający na tworzeniu niefunkcjonalnych kompleksów czynników TRAF ze zmutowanym białkiem cIAP, pozostaje do wyjaśnienia [77].

Czynnik transkrypcyjny NFκB, "podejrzewany" od dawna o regulację ekspresji genów, których białkowe produkty sprzyjają proliferacji i przeżywaniu komórek, stymuluje, jak wykazano ostatnio, ekspresję zarówno genów kodujących czynniki TRAF-1 i TRAF-2 [78], jak i białka cIAP-1 i cIAP-2 [77, 78], w ludzkich limfocytach linii Jurkat oraz w komórkach fibrosarkomy. Jego wirusowy homolog, czynnik v-Rel, stymuluje zaś syntezę IAP-1 w komórkach ptaków [38]. Jednoczesne podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu białek cIAP 1/2 i czynników TRAF 1/2 jest niezbędne do wywołania antyapoptycznego działania NFκB. Przejawia się ono w traktowanych TNF-α komórkach fibrosarkomy jako hamowanie uwalniania z mitochondriów cytochromu c, hamowanie aktywności kaspaz, a także hamowanie procesów prowadzących do aktywacji kaspazy 8 [78]. Przypuszcza się, że efekty te mogą być spowodowane dołączeniem białek cIAP do kompleksu inicjującego apoptozę. Białka cIAP wiążą się z cytoplazmatycznym fragmentem TNF-R1 za pośrednictwem białka adaptorowego TRADD oraz czynnika TRAF-2 [61]. Jest prawdopodobne, że wywołują w ten sposób zmianę jego konformacji, a dzięki temu zakłócają przekazanie sygnału do aktywacji kaspaz. Białka cIAP wiążą się też z receptorem TNF-R2 przy udziale tylko czynników TRAF-1 i TRAF-2 [61]. Nie wiadomo jeszcze jak w tym przypadku związanie białek IAP moduluje aktywność tego receptora.

III-2. Interakcja białek IAP z induktorami apoptozy z tkanek owadów

III-2.1. Charakterystyka i przypuszczalne mechanizmy działania owadzych induktorów apoptozy

Białka Reaper [79], Grim [80], Hid [81] i Doom [82] indukują apoptozę w tkankach owadów podczas embriogenezy. Zdolne są także do wywoływania tego procesu w komórkach ssaków po ich transfekcji kodującymi te induktory genami [83-85]. Powyższe białka są różnej wielkości (Reaper 65 AA; HID 410 AA; Grim 138 AA; Doom 514 AA) i nie wykazują

zasadniczo podobieństwa strukturalnego. Wyjątek stanowi 14 AA fragment przy N-końcu w cząsteczkach Reaper, Grim i Hid [80] o podobnej sekwencji aminokwasowej i biorący udział, jak udowodniono ostatnio [84], w wiązaniu inhibitorowych białek IAP. Podobna sekwencja AA nie występuje w induktorze Doom, a w jego interakcji z białkami IAP uczestniczy 111 AA domena w C-końcu cząsteczki, tzw. domena DSD [82]. Owadzie induktory apoptozy są białkami cytoplazmatycznymi, niemniej jednak białko HID może występować w powiązaniu z błonami mitochondrialnymi [85]. Jak dotąd nie znaleziono w komórkach ssaków białek homologicznych z białkami Reaper, Grim i Hid. Początkowo uważano, że można się dopatrzeć pewnej homologii strukturalnej białka Reaper z tymi białkami z komórek ssaków (np typu TRADD czy FADD), w których występuje tzw. domena śmierci [87]. Ostatnie badania przemawiają jednak za tym, że nie można mówić o występowaniu DD w owadzie induktorach apoptozy [87, 88].

Sądzi się, że w tkankach owadów induktory Reaper, Grim, Hid i Doom uczestniczą w równoległych szlakach prowadzących do apoptozy, ponieważ każde z tych białek może niezależnie wywołać śmierć komórek w nieobecności pozostałych. Niekiedy mogą one również działać synergistycznie, jak np. Reaper i Hid podczas apoptozy zachodzącej w komórkach układu nerwowego *Drosophila* [89]. Mechanizmy działania owadzie induktorów apoptozy nie są jeszcze wystarczająco wyjaśnione. Jednakże fakt, że wirusowe białko p35, inhibitor kaspaz [90], oraz syntetyczne inhibitory kaspaz hamują efektywnie apoptozę wywołaną powyższymi induktorami przemawia za tym, że ich działanie związane jest z uruchomieniem w komórkach kaskady kaspaz [84, 91-93]. Przypuszczenie to potwierdza aktywacja prokaspazy drICE (jednej z trzech kaspaz występujących w komórkach *Drosophila*) pojawiająca się w wyniku nadekspresji białka Reaper w owadzie komórkach S2 [94].

Nadekspresja Reaper lub Grim w komórkach ssaków (ludzkie komórki raka piersi) prowadzi do aktywacji kaspazy 7, induktory te nie aktywują jednak kaspaz "uruchamianych" poprzez błonowe receptory [84]. Pierwszym etapem działania w komórkach induktora Reaper jest uwalnianie z mitochondriów cytochromu c przy udziale wykrytego ostatnio białka regulatorowego tzw. Scythe [95]. Brak białka Scythe w ekstraktach komórkowych uniemożliwia rozpoczęcia apoptozy indukowanej przez białko Reaper. Wysunięto ostatnio przypuszczenie, że Reaper, Grim

i Hid mogą także trwale inaktywować zależne od potencjału kanały potasowe [96]. W efekcie następowalaby depolaryzacja błon i wzrost poziomu jonów Ca w cytosolu, co prowadziłoby do aktywacji kaspaz. Są też doniesienia o indukcji przez Reaper syntezy ceramidu [91, 97] pośredniczącego w przekazywaniu sygnału do apoptozy.

III-2.2. Rola białek IAP w modulacji działania owadzych induktorów apoptozy

Białka IAP, podobnie jak białko p35 i syntetyczne inhibitory kaspaz, hamują apoptozę wywołaną induktorami Reaper, Grim, Hid i Doom. Tworzą one kompleksy z tymi induktorami, przy czym w ich tworzeniu bierze udział wyłącznie domena BIR 2 inhibitora (np. Op-IAP; D-IAP; X-IAP) [98] i N-końcowy fragment cząsteczki Reaper, Grim lub Hid [84, 99] lub domena DSD induktora Doom [82]. Należy podkreślić, że domena BIR-2 z ssaczyc cIAP-1 i cIAP-2 (odpowiednio AA 207-222 i 192-207) jest w znacznym stopniu homologiczna z N-końcem białek Reaper i Grim [84]. W wyniku dołączenia IAP do induktorów zmienia się ich wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie i kompleksy Hid, Reaper i Grim z IAP przemieszczają się w pobliże jądra komórkowego [92, 99], mogą też występować w jądrze komórkowym (kompleks Doom/IAP) [82]. Czy ta zmiana wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia induktorów zachodząca pod wpływem IAP może mieć związek z zahamowaniem w tych warunkach aktywacji kaspaz i apoptozy pozostaje do wyjaśnienia. Niewątpliwie jest jednak, że skompleksowanie białek IAP z owadzimi induktorami apoptozy powoduje, że nie są one już zdolne do wywołania aktywacji kaspaz, zwłaszcza kaspazy 7 [84].

III-3. Białka IAP jako inhibitory kaspaz

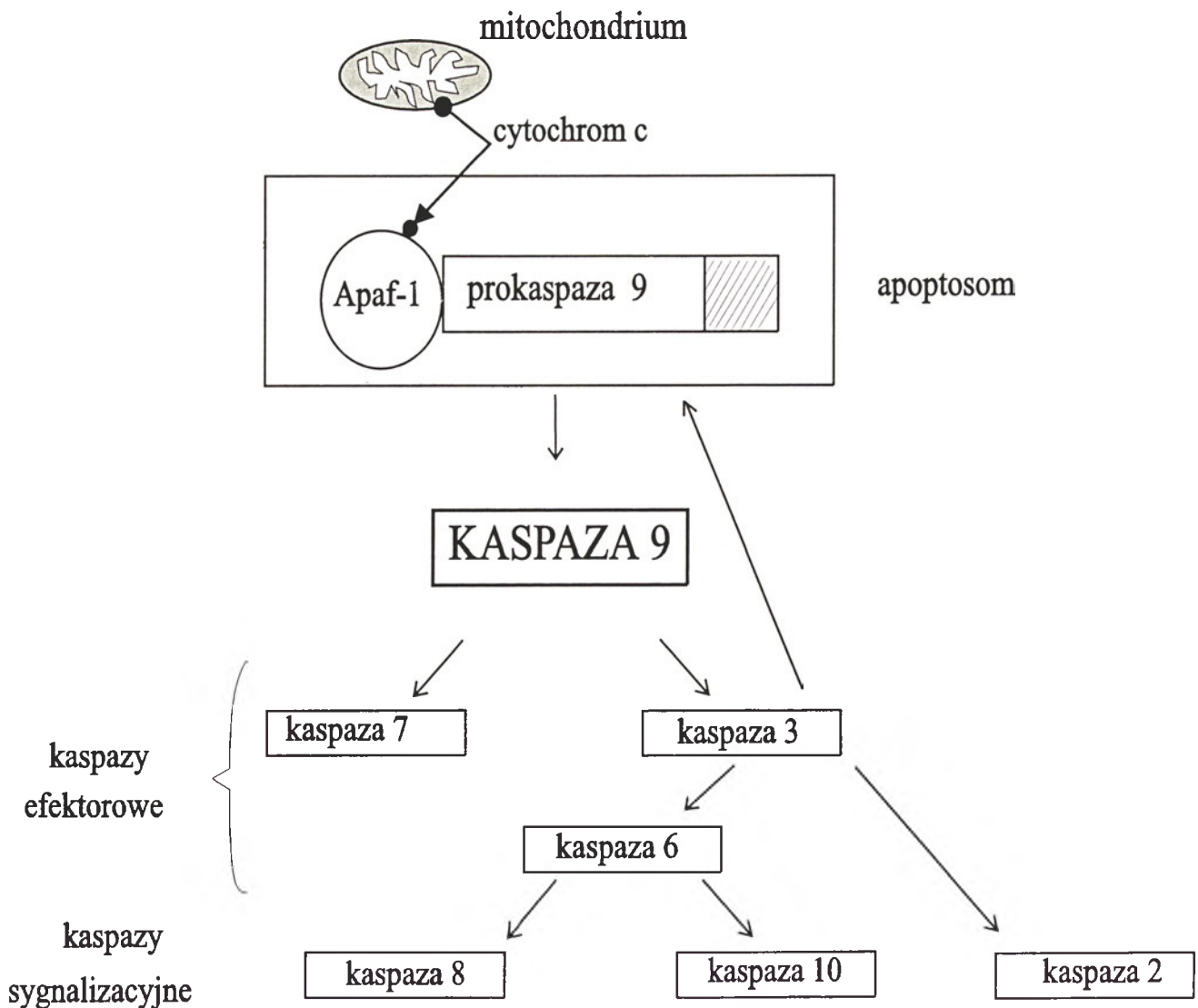
Przedstawione w poprzednich rozdziałach informacje wyraźnie wskazują, że białka IAP mogą być negatywnymi regulatorami apoptozy dzięki modulowaniu działania kaspaz — głównych proteolitycznych egzekutorów apoptozy. Modulacja ta polega, jak się okazało, na bezpośrednim hamowaniu aktywności funkcjonalnych kaspaz, bądź też na blokowaniu przeprowadzania nieaktywnych enzymatycznie prokaspaz w formy aktywne. Szczegółowe badania czterech białek IAP komórek ludzkich wykazały, że tylko trzy z nich, c-IAP-1, c-IAP-2 i X-IAP (lecz nie NAIP) hamują w znacznym stopniu aktywność niektórych kaspaz — kaspazy 3 i kaspazy 7, nie wywierają natomiast takiego działania na kaspazy 8, 1, 6 i 10 [53, 100, 102]. Hamowanie aktywności kaspaz

przez białka IAP jest hamowaniem kompetycyjnym, a oznaczone wartości stałej hamowania K_i są znacznie poniżej 0.1 μ M. Najsilniejszym inhibitorem okazało się być białko X-IAP ($K_i \sim 0.2-0.7$ nM) [101], które działa kilkusetkrotnie efektywniej niż znany wirusowy inhibitor kaspaz, CrmA ($K_i \sim 500$ nM) [102]. Tylko białka zawierające domenę BIR-2 zdolne są do hamowania aktywności kaspaz 3 i 7 [53, 103], mutanty posiadające tylko domeny BIR-1 i BIR-3 nie przejawiały tej właściwości. Jest interesujące, że surwiwina, białko IAP tylko z jedną domeną BIR, również wiąże się i hamuje aktywność kaspazy 3 i 7 [104]. Należy zaznaczyć, że właśnie poprzez domenę BIR-2 białka IAP wiążą się bezpośrednio z aktywnymi kaspazami 3 i 7, lecz nie z ich nieaktywnymi zymogenami [53]. Nie są one jednak substratami kaspaz, z którymi się łączą. Mechanizm ich działania różni się pod tym względem od działania białka p35, klasycznego inhibitora kaspaz, ale o małej stosunkowo specyficzności. Inhibitor ten jest przez kaspazę rozszczepiany na dwa fragmenty, które następnie pozostają związane z nią i w ten sposób zarówno enzym jak i inhibitor ulegają inaktywacji [90, 105].

Białka cIAP-1, cIAP-2 i X-IAP hamują również aktywację niektórych prokaspaz, zwłaszcza leżących w szlaku apoptotycznym stymulowanym przez cytochrom *c* [53, 101]. Kompleksują one z prokaspazą 9 i być może uniemożliwiają w ten sposób jej połączenie z białkiem Apaf-1 i cytochromem *c*, a w rezultacie jej proteolityczną aktywację. Ponieważ tylko aktywna kaspaza 9 przeprowadza proteolizę zymogenów kaspaz 3, 7 i pośrednio kaspazy 6 [106] (Ryc. 3), w obecności białek IAP nie dochodzi do aktywacji tych proteaz. Zdolność do hamowania aktywności określonych kaspaz jak też blokowania ich aktywacji cechuje też niektóre owadzie [107, 108] i wirusowe białka IAP [109].

IV. Uwagi końcowe

Mechanizmy działania białek IAP polegają, jak się to już wydaje udowodnione, przede wszystkim na ich bezpośrednich oddziaływaniach bądź z nieprzejawiającymi aktywności enzymatycznej białkami regulatorowymi (białka TRAF, owadzie regulatory apoptozy), bądź też na interakcjach z kaspazami lub ich nieaktywnymi zymogenami. Efektami tych oddziaływań są zmiany konformacyjne powstałych kompleksów białkowych prowadzące do zmian ich zdolności sygnalizacyjnych lub hamowania aktywności enzymatycznej.



Ryc. 3. Przypuszczalna kolejność aktywacji kaspaz po uwolnieniu z mitochondriów cytochromu c [wg. 106, zmodyf.]. Zakreskowany obszar w cząsteczce prokaspazy 9 oznacza fragment usuwany podczas aktywacji.

Wewnątrzkomórkowy poziom białek IAP (i innych endogennych białek antyapoptotycznych) może decydować więc o życiu lub śmierci komórek. Ich nadmierna ekspresja może nieprawidłowo przedłużać życie komórek, przyczyniać się do utrwalania w nich szkodliwych mutacji i rozwoju nowotworów, a także prowadzić do oporności na chemioterapię. Brak ekspresji białek IAP może zaś wywoływać liczne choroby degeneracyjne. Występowanie większości białek IAP nie przejawia zróżnicowania tkankowego, niewiele też wiadomo o regulacji ich ekspresji. Wyjątek stanowią dwa białka IAP — białko NAIP oraz wykryta w 1997 roku surwiwina. Białko NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) występuje w neuronach [39, 40], a jego brak lub obecność zmutowanej formy odpowiedzialne są w znacznym stopniu za wystąpienie choroby neurodegeneracyjnej mięśni, tzw. zaniku rdzeniowego mięśni (*spinal muscular atrophy*). Obecność surwiwiny charakteryzuje tylko tkanki płodowe oraz komórki

większości ludzkich nowotworów, w tym nowotworów płuc, pęcherza, trzustki, żołądka, prostaty, piersi, niektóre chłoniaki, a także liczne transformowane *in vitro* komórki [44, 45, 110, 111]. W przypadkach raka żołądka [110] oraz raka jelita grubego [112] wysokiemu poziomowi surwiwiny towarzyszy także wzrost poziomu białek Bcl-2 i p53, a nowotwory te charakteryzuje niski indeks apoptotyczny i na ogół złe prognozowanie. Czy obecność surwiwiny w nowotworach będzie mieć istotne znaczenie diagnostyczne pokażą dalsze badania.

Artykuł otrzymano 24 maja 1999 r.
Zaakceptowano do druku 8 lipca 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Thompson CB (1995) *Science* 267: 1456-1462
2. Reed JC (1995) *Curr Op Oncol* 7: 541-546
3. Darżynkiewicz Z (1995) *J Cell Biochem* 58: 151-159
4. Vaux DL, Strasser A (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5214-5218

5. Patel T, Gores GJ, Kaufman SA (1996) *FASEB J* **10**: 587-597
6. Whyte M (1996) *Trends Cell Biol* **6**: 245-248
7. Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenaebelle P, Fiers W (1997) *FEBS Lett* **410**: 96-106
8. Cohen GM (1997) *Biochem J* **326**: 1-16
9. Nicholson DW, Thornberry NA (1997) *Trends Biochem Soc* **22**: 299-306
10. Grzelakowska-Sztabert B (1998) *Post Biochem* **44**: 8-21
11. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) *Nature (Lond)* **391**: 43-50
12. Cory S (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12077-12079
13. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, Aime-Sempe C, Bodrug S, Kitada S, Hanada M (1996) *J Cell Biochem* **60**: 23-32
14. Reed JC (1997) *Nature (London)* **387**: 773-777
15. Korsmeyer SJ (1999) *Cancer Res* **59**: 1693s-1700s
16. Strasser A, Huang DCS, Vaux DL (1997) *Biochim Biophys Acta* **1333**: F151-F178
17. Adams JM, Cory S (1998) *Science* **281**: 1322-1326
18. Grzelakowska-Sztabert B (1997) *Kosmos* **46**: 53-64
19. Kroemer G, Zamzani N, Susin SA (1997) *Immunol Today* **18**: 44-51
20. Lawen A, Baker MA, Malik S (1998) *Protoplasma* **205**: 10-20
21. Bartosz G (1998) *Post Biochem* **44**: 22-31
22. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y (1996) *Oncogene* **12**: 2251-2257
23. Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier G, Dixit VM (1996) *J Biol Chem* **271**: 4573-4576
24. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4386-4391
25. Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G (1998) *J Biol Chem* **273**: 32479-32486
26. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) *Cell* **94**: 481-490
27. Pan G, O'Rourke K, Dixit VM (1998) *J Biol Chem* **273**: 5841-5845
28. Song Q, Kuang Y, Dixit VM, Vincenz C (1999) *EMBO J* **18**: 167-178
29. Reed JC (1997) *Cell* **91**: 559-562
30. Mignotte B, Vayssiere JL (1998) *Eur J Biochem* **252**: 1-15
31. Crook NE, Clem RJ, Miller LK (1993) *J Virol* **67**: 2168-2174
32. Clem RJ, Miller LK (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 5212-5222
33. Clem RJ, Hardwick JM, Miller LK (1996) *Cell Death Differ* **3**: 9-16
34. Miller LK (1997) *J Cell Physiol* **173**: 178-182
35. Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM (1995) *Cell* **83**: 1253-1262
36. Hawkins CJ, Ekert PG, Uren AG, Holmgren SP, Vaux DL (1998) *Cell Death Differ* **5**: 569-576
37. Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4974-4978
38. You M, Ku PT, Hrdlikova R, Bose HR jr (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 7328-7341
39. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamal K, Guan X, Ioannou P, Crawford TO, de Jong PJ, Surh L, Ikeda J-E, Korneluk RG, Mackenzie A (1995) *Cell* **80**: 167-178
40. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horwat G, Farahani R, McLean H, Ikeda JF, Mackenzie A, Korneluk RG (1996) *Nature (Lond)* **379**: 349-353
41. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van-Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB (1996) *EMBO J* **15**: 2685-2694
42. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV (1995) *Cell* **83**: 1243-1252
43. Uren AG, Coulson EJ, Vaux DL (1998) *Trends Biochem Soc* **23**: 159-162
44. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC (1998) *Am J Pathol* **152**: 43-49
45. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) *Nature Med* **3**: 917-921
46. Clem RJ, Duckett CS (1997) *Trends Cell Biol* **7**: 337-339
47. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV (1999) *Trends Biochem Soc* **24**: 47-53
48. Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK (1994) *J Virol* **68**: 2521-2528
49. Hauser HP, Bardroff M, Pyronolakis G, Jentsch S (1998) *J Cell Biol* **141**: 1415-1422
50. Freemont PS (1993) *Ann NY Acad Sci* **648**: 174-192
51. Saurin AJ, Borden KLB, Boddy MN, Freeman PS (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 208-214
52. Hoffman K, Bucher P, Tschopp J (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 155-156
53. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) *EMBO J* **16**: 6914-6925
54. Hawkins CJ, Uren AG, Heker G, Medcalf RL, Vaux DL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13786-13790
55. Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 608-615
56. Vandenaebelle P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995) *Trends Cell Biol* **5**: 392-399
57. Baker SJ, Reddy EP (1996) *Oncogene* **12**: 1-9
58. Schultze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME (1998) *Eur J Biochem* **254**: 439-459
59. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV (1994) *Cell* **78**: 681-692
60. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV (1995) *Science* **269**: 1424-1427
61. Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13973-13978
62. Hsu H, Shu HB, Pan MG, , Goeddel DV (1996) *Cell* **84**: 299-308
63. Duckett CS, Gedrich RW, Gilfillan MC, Thompson CB (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 1535-1542
64. Duckett CS, Thompson CB (1997) *Genes Develop* **11**: 2810-2821
65. Pullen SS, Miller HG, Everdeen DS, Dang TTA, Crute JJ, Kehry MR (1998) *Biochemistry* **37**: 11836-11845
66. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV (1996) *J Biol Chem* **271**: 19935-19942
67. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994) *Annu Rev Cell Biol* **10**: 405-455
68. Bauerle PA (1998) *Curr Biol* **8**: R19-R22
69. Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y (1998) *J Biol Chem* **273**: 28355-28359
70. Natoli G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Levrero M (1998) *Biochem Pharmacol* **56**: 915-920
71. Liu Z, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) *Cell* **87**: 565-576
72. Reinhard C, Shamoon B, Shyamala V, Williams LT (1997) *EMBO J* **16**: 1080-1092
73. Song HY, Regnier CH, Korschnig CJ, Goeddel DV, Rothe M (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9792-9796
74. Carpentier I, Declercq W, Malinin NL, Wallach D, Fiers W, Beyaert R (1998) *FEBS Lett* **425**: 195-198
75. Yeh WC, Shaninian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV, Wah Mak T (1997) *Immunity* **7**: 715-725
76. Rothe M, Xiong J, Shu HB, Williamson K, Goddard A, Goeddel DV (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8241-8246

77. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10057-10062
78. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr (1998) *Science* **281**: 1680-168
79. White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H (1994) *Science* **264**: 677-683
80. Chen P, Nordstrom W, Gish B, Abrams JM (1996) *Genes Dev* **10**: 1773-1782
81. Grether M, Abrams JM, Agapite J, White K, Steller H (1995) *Genes Dev* **9**: 1694-1708
82. Harvey AJ, Bidwal AP, Miller LK (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 2835-2843
83. Evans EK, Kuwana T, Strum SL, Smith JJ, Newmeyer DD, Kornbluth S (1997) *EMBO J* **16**: 7372-7381
84. McCarthy JV, Dixit VM (1998) *J Biol Chem* **273**: 24009-24015
85. Haining W N, Carboy-Newcombe C, Wei C L, Steller H (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4936-4941
86. Golstein P, Marguet D, Depraetere V (1995) *Cell* **81**: 185-186
87. Chen P, Lee P, Otto L, Abrams J (1996) *J Biol Chem* **271**: 25735-25737
88. Vucic D, Seshagiri S, Miller LK (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 667-67
89. Zhou L, Schnitzler A, Agapite J, Schwartz LM, Steller H, Nambu JR (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5131-5136
90. Bump NJ, Hackett M, Hugunun M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P, Licari P, Mankovich J, Shi L, Greenberg AH, Miller LK, Wong WW (1995) *Science* **269**: 1885-1888
91. Pronk GJ, Ramer K, Amiri P, Williams LT (1996) *Science* **271**: 808-810
92. Vucic D, Kaiser W, Harvey AJ, Miller LK (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10183-10188
93. Nordstrom W, Chen P, Steller H, Abrams JM (1996) *Develop Biol* **180**: 213-226
94. Fraser A G, McCarthy N J, Evan G S (1997) *EMBO J* **16**: 6192-6199
95. Thress K, Henzel W, Shillinglaw W, Kornbluth S (1998) *EMBO J* **17**: 6135-6143
96. Avdonin V, Kasuya J, Ciorba MA, Kaplan B, Hoshi T, Iverson L (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11703-11708
97. Bose R, Chen P, Loconti A, Grlich C, Abrams JM, Kolesnick RN (1998) *J Biol Chem* **273**: 28852-28859
98. Vucic D, Kaiser WJ, Miller LK (1998) *J Biol Chem* **273**: 33915-33921
99. Vucic D, Kaiser W, Miller LK (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 3300-3309
100. Deveraux GL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) *Nature (Lond)* **388**: 300-304
101. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998) *EMBO J* **17**: 2215-2223
102. Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS (1997) *J Biol Chem* **272**: 7797-7800
103. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC (1998) *J Biol Chem* **273**: 7787-7790
104. Tamm I, Sausville E, Scudiero D A, Vigna N, Oltersdorf T, Reed J C (1998) *Cancer Res* **58**: 5315-5320
105. Fisher A J, de la Cruz W, Zoog S J, Schneider C, Friesen P D (1999) *EMBO J* **18**: 2031-2039
106. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999) *J Cell Biol* **144**: 281-292
107. Kaiser WJ, Vucic D, Miller LK (1998) *FEBS Lett* **440**: 243-248
108. Hawkins CJ, Wang SL, Hay BA (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2885-2890
109. Seshagiri S, Miller LK (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13606-13611
110. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N (1998) *Cancer Res* **58**: 1808-1812
111. Jäättelä M (1999) *Exp Cell Res* **248**: 30-43
112. Kawasaki H, Altieri DC, Lu DC, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N (1998) *Cancer Res* **58**: 5971-5074

Czy aneksyna VI, białko wiążące wapń i fosfolipidy, jest białkiem G?

Is annexin VI, calcium- and phospholipid-binding protein, a G protein?

MAŁGORZATA DANIELUK¹, JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Oddziaływanie aneksyny VI z nukleotydami *in vitro*
- III. Wpływ GTP na biologiczną aktywność aneksyny VI
- IV. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: ADP — adenylozodifosforan; AnxVI — aneksyna VI; ATP — adenylozotrifosforan; cAMP — cykliczny 3',5'-adenylozomonofosforan; GAP — białka stymulujące aktywność GTPaz; GDP — guanylozodifosforan; GEF — białka stymulujące dysocjację GDP od białek G; GTP — guanylozotrifosforan.

I. Wstęp

Guanylozotrifosforan (GTP) wpływa na różnorodne procesy zachodzące w komórce za pośrednictwem białek wiążących GTP (białek G) [1-4]. Białka G są zaangażowane między innymi w proliferację komórek, przekazywanie sygnałów oraz syntezę białek i ich kierowanie do właściwych organelli w komórce [5]. Jednym z ważniejszych procesów kontrolowanych przez białka G jest transport pęcherzykowy [6-8]. Wyniki najnowszych badań wskazują, że niektóre aneksyny, białka wiążące wapń i fosfolipidy, wraz z GTP są elementami systemu kontrolującego transport pęcherzykowy, zarówno w komórkach zwierzęcych [9], jak i roślinnych [10, 11]. Na korzyść tej koncepcji przemawiają obserwacje, że aneksyny mogą wiązać GTP *in vitro*. W wyniku związania nukleotydu zmienia się charakter oddziaływań tych białek z błonami [12, 13].

Contents:

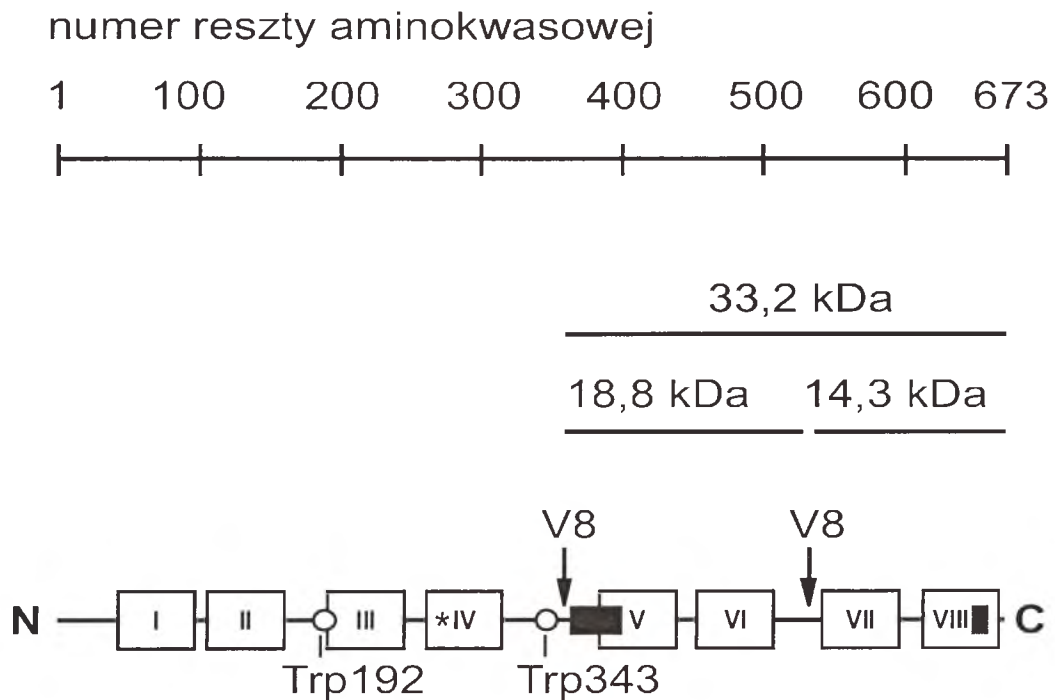
- I. Introduction
- II. Interaction of annexin VI with nucleotides *in vitro*
- III. Effect of GTP on biological activity of annexin VI
- IV. Concluding remarks

W niniejszym artykule przeglądowym przedstawimy dane świadczące, że aneksyna VI, białko o największej masie cząsteczkowej (68 kDa) wśród aneksyn, oddziałuje z GTP, i że oddziaływanie to może mieć znaczenie funkcjonalne.

II. Oddziaływanie aneksyny VI z nukleotydami *in vitro*

Aneksyna VI jest jedną z 10 różnych aneksyn występujących w komórkach ssaków. Budowa molekularna aneksyny VI predystynuje to białko do wiązania wielu ligandów, zarówno białek, fosfolipidów i innych makrocząsteczek, jak i związków niskocząsteczkowych, na przykład jonów i nukleotydów. Rejon rdzeniowy aneksyny VI tworzy osiem powtarzających się domen, składających się z 72 reszt aminokwasowych, zawierających sekwencje odpowiedzialne za wiązanie aneksyny VI z fosfolipidami i Ca²⁺ [14, 15] (Ryc. 1). Wiązanie aneksyny VI z błonami zależy od stężenia jonów wapnia i wykazuje specyficzność w stosunku do fosfatydyloseryny, a także kwasu fosfatydowego i fosfatydyloinozytolu [16, 17]. Aneksyna oddziałuje również z białkami cytoszkieletu komórkowego, a po związaniu z błonami jest zdolna do tworzenia kanałów jonowych transportujących Ca²⁺ [16, 17]. Opisane właściwości aneksyny VI skłaniają wielu badaczy do przypisywania temu białku zdolności do agregacji i fuzji błon oraz udziału w transporcie pęcherzykowym w trakcie egzo- i endocytozy [18, 19]. Istnieje również wic-

¹Mgr, ²Dr, Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



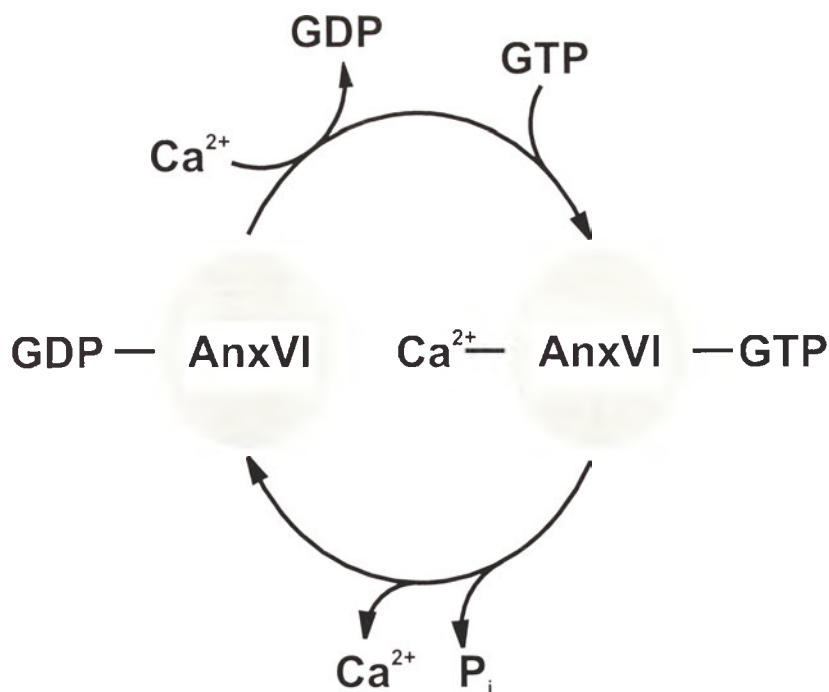
Ryc. 1. Schemat przedstawiający domenową budowę aneksyny VI. Na rysunku puste prostokąty (domeny oznaczone cyframi rzymskimi I-VIII) przedstawiają miejsca wiążące jony wapnia i cząsteczki fosfolipidów. Miejsce wiążące F-aktynę w domenie IV (Thr-Leu-Ile-Arg-Ile-Met-Val-Ser-Arg) zaznaczono gwiazdką. Kółka odpowiadają położeniu reszt tryptofanu: Trp192 i Trp343. Strzałkami zaznaczono miejsca trawienia aneksyny VI przez proteazę V8 ze *Staphylococcus aureus*. Trzy fragmenty proteolityczne (o m. cz. 33,2 kDa, 18,8 kDa i 14,3 kDa), powstające w wyniku trawienia aneksyny VI, wiążą ATP i GTP (wyniki własne). Na tej podstawie przypuszcza się, że domena wiążąca ATP/GTP występuje w C-końcowym rejonie cząsteczki aneksyny VI (położenie domeny zaznaczono czarnymi prostokątami). Fakt, że niektóre reszty aminokwasowe oddziałujące z nukleotydem zlokalizowane są w domenie V, a inne w domenie VIII wynika z przestrzennej budowy aneksyny VI, ponieważ na podstawie analizy krystalograficznej stwierdzono, że domeny V i VIII w cząsteczce aneksyny VI oddziałują ściśle ze sobą [14, 15].

le danych doświadczalnych, że aneksyna VI bierze udział w homeostazie jonów wapnia w komórce [20]. Udział aneksyny VI w homeostazie jonów wapnia jest szczególnie dobrze udokumentowany wynikami badań na myszach transgenicznych. W trakcie tych badań stwierdzono, że 10-krotnie zwiększony poziom aneksyny VI w kardiomiocytach zaburza wewnątrzkomórkową homeostazę jonów wapnia i cykl skurczowo-rozkurczowy mięśnia sercowego [21]. Mechanizm działania aneksyny VI polega w tym przypadku na oddziaływaniu z białkami transportującymi Ca^{2+} : kanałem uwalniającym Ca^{2+} (receptor rianodyny) z sarkoplazmatycznego retikulum i wymienniczem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ zlokalizowanym w błonie plazmatycznej [21].

W 1997 r. stwierdzono, że aneksyna VI wiąże *in vitro* nukleotydy (ATP, GTP) z podobnym powinowactwem, jak inne białka wiążące ATP/GTP ($K_D < 1 \mu\text{M}$) [22, 23]. Aneksyna VI oddziałuje również z funkcjonalnym analogiem nukleotydów, antagonistą receptorów purynergiczych — *Cibacronem blue* F3GA, należącym do grupy barwników triazynowych [24]. W przypadku ATP zaobserwowano, że wiązanie nukleotydu z aneksyną VI wywołuje zmiany konformacyjne w jej cząsteczce, którym towarzyszy spadek poziomu α -helisy oraz spadek powinowactwa aneksyny w stosunku do jonów wapnia [23,

25, 26]. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że te właśnie zmiany konformacji aneksyny VI po związaniu ATP są odpowiedzialne za spadek jej powinowactwa w stosunku do jonów wapnia, ponieważ, jak wiadomo, miejsca wiążące Ca^{2+} w cząsteczce aneksyny mają strukturę α -helikalną [14, 15]. W konsekwencji opisane zmiany konformacyjne wpływają na wiązanie aneksyny VI z F-aktyną i z cząsteczkami fosfolipidów oraz zmieniają zdolność białka do agregacji pęcherzków błonowych [12, 13].

Aneksyna VI nie jest jedynym przedstawicielem rodziny aneksyn, w przypadku którego stwierdzono zdolność wiązania nukleotydów. Właściwość ta charakteryzuje aneksynę I wiążącą ATP i cAMP [27, 28], aneksynę IV wiążącą ATP [29] oraz aneksynę VII wiążącą GTP i GDP [9, 30]. Na uwagę zasługuje fakt, że w aneksynach nie występują sekwencje aminokwasowe, które w innych białkach są odpowiedzialne za wiązanie nukleotydów. Do najczęściej spotykanych i najwcześniej odkrytych sekwencji wiążących nukleotydy należy „motyw Walkera A i B” w białkach wiążących ATP/GTP, takich jak ATP-azy transportujące jony i białkowe kinazy [31-33]. „Motyw Walkera” nie występuje w cząsteczce aneksyny VI, co można zinterpretować w ten sposób, że w cząsteczce aneksyny VI domena wiążąca ATP/GTP (Ryc. 1) ma odmienną strukturę niż w innych



Ryc. 2. Aneksyna VI jako białko wiążące GTP. Białko oscyluje pomiędzy dwiema formami: aktywną, kiedy białko wiąże się z GTP, i nieaktywną, związaną z GDP. Hipoteza zakłada, że aneksyna VI jest GTPazą. AnxVI — aneksyna VI. Inne wyjaśnienia w tekście.

białkach [34], a wymienione nukleotydy pełnią w stosunku do aneksyny VI funkcję fizjologicznych ligandów [12, 13, 35].

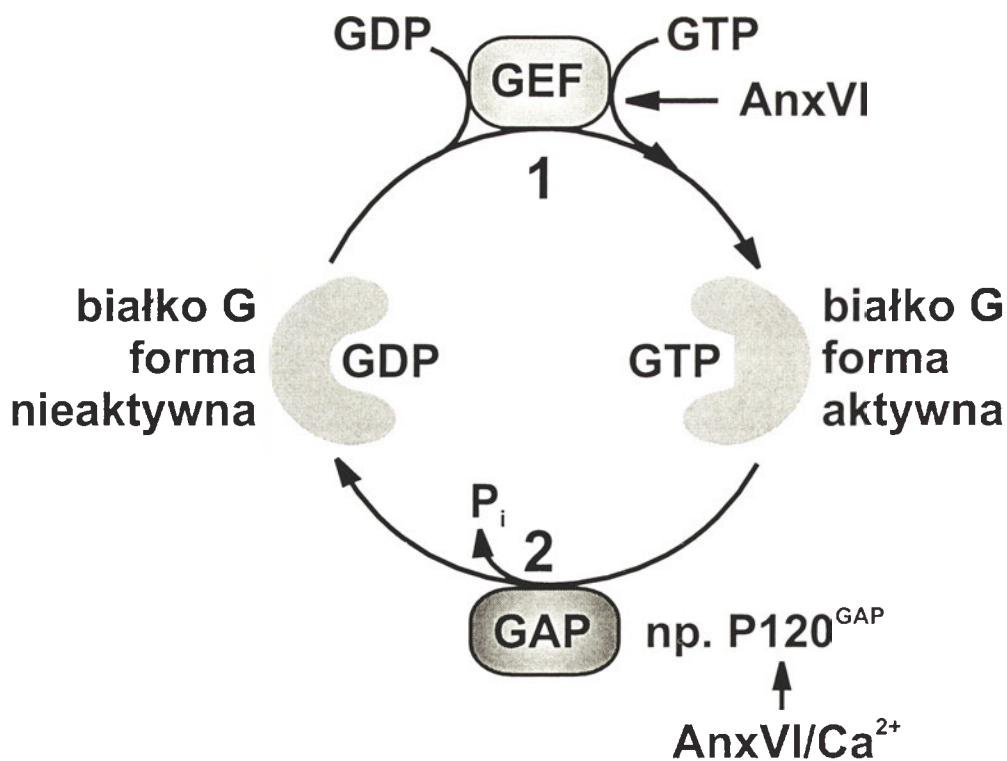
III. Wpływ GTP na biologiczną aktywność aneksyny VI

Odpowiednie stężenie różnych nukleotydów w komórce warunkuje jej przeżycie. Niektóre z nukleotydów i ich pochodnych, takie jak GTP, cAMP i ADP-ryboza, odgrywają rolę przekaźników informacji. Inne, takie jak ATP i w mniejszym stopniu ADP, są źródłem energii dla różnych reakcji [36]. Poziom ATP w cytoplazmie jest podstawowym wyznacznikiem stanu metabolicznego komórki, ale nie jest to przecież jedyna funkcja pełniona przez ten nukleotyd [35, 37]. Poziom ATP kontroluje na przykład oddychanie komórkowe (ATP jest allosterycznym inhibitorem oksydazy cytochromu c) [38], a także proces programowanej śmierci komórki — apoptozy [39]. W komórkach bowiem występują różne białka efektorowe i to wiążące ATP z różnym powinowactwem. Wśród białek efektorowych są także aneksyny. Szczególnie rola aneksyn w procesach egzo- i endocytozy oraz ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja (na przykład aneksyny wiążą się z błonami mitochondriów i błonami organelli komórkowych biorących udział w transporcie pęcherzykowym) przemawiają na korzyść hipotezy, że ATP i GTP regulują aktywność niektórych izoform aneksyn [12, 13, 35].

Dotychczasowe badania na temat oddziaływań aneksyn z nukleotydami *in vivo* napotykają jednak na poważne trudności interpretacyjne. Jedną z nich jest

mechanizm regulacji aktywności białek przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia nukleotydów. Na przykład stężenie ATP w komórce nie może podlegać dużym zmianom, podobnym do tych, które obserwuje się w przypadku innych regulatorów procesów komórkowych, takich jak jony wapnia. Do znacznych zmian stężenia ATP dochodzi tylko w stanach ekstremalnych, na przykład w cytoplazmie komórek poddanych stresowi oksydacyjnemu [35]. W związku z powyższym rodzi się wątpliwość, że może to nie ATP jest fizjologicznym ligandem aneksyny VI, a GTP? Średnie stężenie GTP w komórkach ssaków ($468 \pm 224 \mu\text{M}$) jest prawie 10-krotnie niższe od stężenia ATP ($3152 \pm 1698 \mu\text{M}$) [36]. Fakt ten świadczy, że to GTP może być cząsteczką sygnałową w komórce, a nie ATP. Jeśli tak, to można założyć, że aneksyna VI bierze udział w procesach komórkowych kontrolowanych przez GTP w dwojaki sposób: albo wiąże się z GTP, albo aktywuje białka regulujące aktywność białek G, takie jak białka GAP (ang. *GTPase activating proteins*) lub białka GEF (ang. *guanine-nucleotide exchange factors*).

Pierwsza hipoteza zakłada, że aneksyna VI wiąże się z GTP (Ryc. 2). Po związaniu nukleotydu w obecności jonów wapnia, aneksyna VI, jako GTPaza, katalizuje reakcję hydrolizy GTP do GDP. Reakcji hydrolizy GTP towarzyszy zmiana powinowactwa białka w stosunku do Ca²⁺. W formie związanej z GDP aneksyna VI jest nieaktywna. W wyniku wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺, GDP odysocjowuje od aneksyny VI, która jest zdolna do ponownego przyłączenia GTP. Istnicją dane doświadczalne, że inna aneksyna występująca w ko-



Ryc. 3. Udział aneksyny VI w regulacji aktywności białek wiążących GTP (białek G). Hipoteza zakłada, że aneksyna VI odgrywa rolę białka dysocjującego GDP od białka G (1), lub moduluje aktywność białka GAP, aktywatora GTPazy (2). AnxVI — aneksyna VI. Inne wyjaśnienia w tekście.

mórkach ssaków, aneksyna VII, odgrywająca rolę w fuzji błon, jest GTPazą, której aktywność jest regulowana *in vivo* przez jony wapnia [9]. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku aneksyn z komórek roślinnych [10, 11]. Wykazano również, że wiązanie GTP wpływa na aktywność aneksyny V jako kanału wapniowego, odgrywającego rolę w procesach mineralizacji tkanki łącznej [40].

Druga hipoteza sugeruje, że aneksyna VI działa jako aktywator innych białek G, nie będąc sama GTPazą (Ryc. 3). Jak wiadomo, białka G charakteryzują się tym, że w wyniku związania GTP ulegają aktywacji. Są wtedy zdolne do hydrolizy GTP do GDP, z uwolnieniem reszty fosforanowej (P_i). W formie związanej z GDP białka G stają się nieaktywne. Reakcja hydrolizy GTP katalizowana przez białka G jest stymulowana przez białka GAP [41, 42]. Proces dysocjacji GDP od białka G i ponownego przyłączenia przez białko G GTP jest procesem powolnym. Proces ten jest aktywowany przez białka GEF [5]. Na podstawie dostępnych danych literaturowych można wysunąć przypuszczenie, że aneksyna VI wpływa albo bezpośrednio na białka G, pełniąc funkcję białka stymulującego dysocjację GDP od białka G (GEF), albo pośrednio, wiążąc się z białkiem GAP. Potwierdzeniem tej ostatniej możliwości jest obserwacja, że aneksyna VI wiąże się z białkiem p120^{GAP}, aktywatorem GTPazy p21^{ras} [43]. Ponadto wykazano, że aneksyna VI wiąże się z dynaminą, GTPazą odgrywającą rolę w endocytozie [44], co przemawia na korzyść interpretacji, że to aneksyna VI jest jednym z białek GAP. Powyższa interpretacja nie wy-

klucza możliwości, że w każdym z wymienionych przypadków wiązanie GTP z aneksyną VI odgrywa rolę dodatkowego czynnika regulującego oddziaływanie aneksyny VI z białkami GEF i GAP.

IV. Uwagi końcowe

Podstawową kwestią, jaką powinno się rozstrzygnąć w przyszłych badaniach, jest odpowiedź na pytanie, czy aneksyna VI wiąże GTP. Wstępne wyniki badań przeprowadzonych w naszej pracowni, z zastosowaniem fluorescencyjnej pochodnej GTP, trinitrofenylo-GTP, oraz GTP-agarozy, świadczą, że aneksyna VI wiąże GTP *in vitro*. Ponadto, już wcześniej zauważono, że GTP w stężeniach mikromolarnych wygasza fluorescencję wewnętrzną aneksyny VI, w zależności od stanu konformacyjnego białka [23], co przez innych badaczy jest traktowane jako kryterium wiązania przez białko tego nukleotydu [45]. Należy przypuszczać, że w przyszłości badania oddziaływań aneksyny VI z GTP zaowocują opisem procesów, w których oddziaływania te odgrywają fizjologiczną rolę.

Podziękowanie

Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego nr 6 P04A 027 14 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Artykuł otrzymano 25 marca 1999 r.
Zaakceptowano do druku 19 kwietnia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Barańska J (1994) *Post Biol Kom* **21**: 79-488
2. Sprang S R (1997) *Annu Rev Biochem* **66**: 639-678
3. Żylińska L, Rębas E, Lachowicz A, Lachowicz L (1998) *Post Biochem* **44**: 158-163
4. Vaughan M (1998) *J Biol Chem* **273**: 667-668
5. Kjeldgaard M, Nyborg J, Clark B F C (1996) *FASEB J* **10**: 1347-1368
6. Bock J B, Scheller R H (1997) *Nature (Londyn)* **387**: 133-135
7. Olkkonen VM, Stenmark H (1997) *Int Rev Cytol* **176**: 1-85
8. Sasaki T, Takai Y (1998) *BiochemBiophysResCommun* **245**: 641-645
9. Pollard H B, Caohuy H, Minton A P, Srivastava M (1998) *Adv Pharmacol* **42**: 81-87
10. Carroll A D, Moye C, Van Kesteren P, Tooke F, Battey N H, Brownlee C (1998) *Plant Cell* **10**: 1267-1276
11. Shin H, Brown Jr R M (1999) *Plant Physiol* **119**: 925-934
12. Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1997) *Post Biochem* **43**: 111-119
13. Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1998) *Acta Biochim Polon* **45**: 735-744
14. Benz J, Bergner A, Hofmann A, Demange P, Gtting P, Liemann S, Huber R, Voges D (1996) *J Mol Biol* **260**: 638-643
15. Avila-Sakar A J, Creutz C E, Kretsinger R H (1998) *Biochim Biophys Acta* **1387**: 103-116
16. Gerke V, Moss S E (1997) *Biochim Biophys Acta* **1357**: 129-154
17. Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1998) *Post Biochem* **44**: 237-244
18. *Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S* (1998) *Acta Biochim Polon* **45**: 721-733
19. Litwa M, Bandorowicz-Pikuła J (1997) *Kosmos* **46**: 587-594
20. Bandorowicz-Pikuła J (1997) *Kosmos* **46**: 625-633
21. Gunteski-Hamblin A-M, Song G, Walsh R A, Frenzke M, Boivin G P, Doorn H G V, Kaetzel M A, Horseman N D, Dedman J R (1996) *Am J Physiol* **270**: H1091-H1100
22. Bandorowicz-Pikuła J, Awasthi Y C (1997) *FEBS Lett* **409**: 300-306
23. Bandorowicz-Pikuła J, Wrzosek A, Pikuła S, Awasthi Y C (1997) *Eur J Biochem* **248**: 238-244
24. Danieluk M, Buś R, Pikuła S, Bandorowicz-Pikuła J (1999) *Acta Biochim Polon* **46**: 419-429
25. Bandorowicz-Pikuła S, Danieluk M, Wrzosek A, Buś R, Pikuła S (1998) *Cell Molec Biol Lett* **3**: 365-374
26. Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1998) *Biochimie* **80**: 613-620
27. Cohen B E, Lee G, Arispe N, Pollard H B (1995) *FEBS Lett* **377**: 444-450
28. Han H-Y, Lee Y-H, Oh J-Y, Na B-S, Lee B-J (1998) *FEBS Lett* **425**: 523-527
29. Bandorowicz-Pikuła J, Wrzosek A, Makowski P, Pikuła S (1997) *Mol Membr Biol* **14**: 179-186
30. Caohuy H, Srivastava M, Pollard H B (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10797-10802
31. Saraste M, Sibbald P R, Wittinghofer A (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 430-434
32. Traut T W (1994) *Eur J Biochem* **222**: 9-19
33. Yoshida M, Amano T A (1995) *FEBS Lett* **359**: 1-5
34. Bandorowicz-Pikuła J (1998) *Molec Cell Biochem* **181**: 11-20
35. Szcweczyk A, Pikuła S (1998) *Biochim Biophys Acta* **1365**: 333-353
36. Traut T W (1994) *Mol Cell Biochem* **140**: 1-22
37. Higelmann D A (1997) *Annu Rev Physiol* **59**: 193-220
38. Arnold S, Kadenbach B (1997) *Eur J Biochem* **249**: 350-354
39. Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C (1996) *FEBS Lett* **378**: 107-110
40. Arispe N, Rojas E, Genge B R, Wu L N, Wuthier R E (1996) *Biophys J* **71**: 1764-1775
41. Wittinghofer A, Scheffzek K, Ahmadian M R (1997) *FEBS Lett* **410**: 63-67
42. Scheffzek K, Ahmadian M R, Wittinghofer A (1998) *Trends Biochem Sci* **23**: 257-262
43. Davis A J, Butt J T, Walker J H, Moss S E, Gawler D J (1996) *J Biol Chem* **271**: 24333-24336
44. Turpin E, Russo-Marie F, Dubois T, de Pailletres C, Alfsen A, Bomsel M (1998) *Biochim Biophys Acta* **1402**: 115-130
45. Baubichon-Cortay H, Baggetto L G, Dayan G, Di Pietro A (1994) *J Biol Chem* **269**: 22983-22989

Czy mutacja genu AMPD1, kodującego izoenzym mięśniowy deaminazy AMP u człowieka, może być markerem prognostycznym pierwotnej kardiomiopatii rozstrzeniowej?

Can mutation of AMPD1 gene encoding human AMP deaminase muscle isozyme be a prognostic marker of primary dilated cardiomyopathy?

KRYSTIAN KALETHA¹, ZYGMUNT CHODOROWSKI², GABRIELA NAGEL-STARCZYNOWSKA³, MAGDALENA GAZDA⁴, EWA SŁOMIŃSKA⁵

Wykaz stosowanych skrótów: AMPD1 — gen kodujący izoenzym mięśniowy deaminazy AMP u człowieka

Kardiomiopatia rozstrzeniowa (zastoinowa) jest chorobą mięśnia sercowego, którą charakteryzuje ogólne powiększenie masy serca, rozstrzeń (powiększenie objętości) jego jam oraz przerost i upośledzenie kurczliwości mięśnia sercowego [1]. Choroba dotyczy zazwyczaj obydwu komór, jednak najczęściej rozpoczyna się pod postacią niewydolności lewokomorowej [1].

W obrazie klinicznym kardiomiopatia rozstrzeniowa przejawia się początkowo objawami niewydolności lewej komory serca, z ograniczeniem jej frakcji wyrzutowej i zastojem krwi w krążeniu płucnym, do których dołączają stopniowo objawy niewydolności prawej komory serca i zastój krwi w krążeniu ogólnym [1].

Uwzględniając etiologię i patogenezę choroby można wyróżnić kardiomiopatię rozstrzeniową pierwotną i wtórną [1]. Rozpoznanie kardiomiopatii pierwotnej (idiopatycznej lub rodzinnej) ustala się poprzez wykluczenie wtórnych przyczyn choroby,

takich jak : wady zastawkowe serca, choroba niedokrwienności serca, wirusowe zapalenie mięśnia sercowego, układowe nadciśnienie tętnicze, kolagenozy, endokrynopatie, a także alkoholizm [1].

Występowanie pierwotnej kardiomiopatii rozstrzeniowej, u podłoża której leżą czynniki genetyczne, wbrew uprzednim szacunkom [2,3] nie jest wcale rzadkie i obecnie ocenia się je na blisko 20% przypadków [4]. Defekty genetyczne znajdowane u osób cierpiących na tę postać choroby dotyczą dwu rodzajów genów [5,6]. Jeden rodzaj to geny kodujące białka strukturalne komórki mięśniowej serca (kardiomiocyta), jak np. aktyna, dystrofina, czy też białka LIM (Lin-11, Isl-1 i Mcc-3). Białka te odpowiadają za organizację strukturalną i prawidłowe funkcjonowanie aparatu kurczliwego komórki mięśniowej. Drugi rodzaj genów to geny kodujące tzw. czynniki transkrypcyjne, kontrolujące ekspresję innych genów kardiomiocyta. Przykładem takiego czynnika transkrypcyjnego jest białko CREB (*Cyclic AMP Response — Element Binding Protein*), regulujące ekspresję genów komórki mięśnia sercowego w zależności od aktualnego, wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznego AMP.

Przebieg choroby jest bardzo zróżnicowany. Niektórzy pacjenci przez długi czas nie wykazują poważniejszych objawów chorobowych — u innych natomiast, objawy te pojawiają się wcześniej i szybko prowadzą do obukomorowej niewydolności serca. Jaka jest przyczyna tak znacznej zmienności osobni-

¹Prof. dr hab., ²Prof. dr hab., ³Dr, ⁴Mgr, ⁵Mgr;
^{1,3,4,5}Katedra i Zakład Biochemii A.M. w Gdańsku,
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
²I Klinika Chorób Wewnętrznych i Zatruc A.M. w Gdańsku,
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

czej w chronologii i natężeniu obserwowanych zmian chorobowych? Próba odpowiedzi na to bardzo istotne z punktu widzenia klinicznego i społecznego pytanie stała się podstawą wysunięcia przez Holmesa i wsp. [7] ciekawej hipotezy, która wiąże to zagadnienie z występowaniem defektu enzymatycznego mięśni szkieletowych (enzymopatią) — niedoborem mięśniowej deaminazy AMP [8].

Analizując profil genetyczny chorych z pierwotną kardiomiopatią rozstrzeniową pod kątem wspomnianej enzymopatii zauważono, że u chorych obciążonych tym defektem objawy niewydolności serca były mniej nasilone, a postęp choroby wolniejszy [7]. Objawy ciężkiej niewydolności sercowej, kwalifikujące chorego do zabiegu transplantacji serca, pojawiały się u osób z niedoborem mięśniowej deaminazy AMP blisko osiem lat później [7], aniżeli u chorych wykazujących prawidłową aktywność enzymu.

Niedobór mięśniowej deaminazy AMP (*Myoadenylate Deaminase Deficiency*) jest jedną z najczęściej spotykanych enzymopatii [8, 9]. Defekt dziedziczny jest w sposób autosomalny, recesywny i w postaci heterozygotycznej, klinicznie bezobjawowej, znajdujący jest u około 20% osobników rasy kaukaskiej i afrykańskiej. W tej postaci enzymopatii aktywność deaminazy AMP w mięśniu szkieletowym nie przekracza 40% wartości prawidłowej. Postać homozygotyczną enzymopatii, zazwyczaj objawową, w której aktywność deaminazy AMP w mięśniu szkieletowym nie przewyższa 5% wartości prawidłowej, spotyka się u 2-3% osobników wymienionej populacji [9].

Jeszcze do niedawna za istotną przyczynę defektu enzymatycznego uważano nonsensowną mutację punktową C34-T (Gln12 → Stop), zachodzącą w obrębie eksonu drugiego, genu kodującego izoformę mięśniową deaminazy AMP [10, 11]. Jej następstwem, obserwowanym u homozygot, jest przedwczesne zatrzymanie biosyntezy enzymu na etapie nieaktywnego peptydu szczątkowego. Zupełnie niedawno, dzięki badaniom Grossa i współpracowników [12], u pacjenta wykazującego niemal całkowity brak aktywności mięśniowej deaminazy AMP oraz objawy kliniczne ze strony układu mięśniowego, zidentyfikowano dodatkową mutację punktową genu *AMPD1*, w obszarze jego eksonu piątego. Mutacja ta: G468-T (Gln156 → His), rzecz istotna, dotyczyła osobnika będącego jednocześnie heterozygotą, ze względu na mutację nonsensowną C34-T. Opisany przypadek wskazuje na bardziej heterogenne, aniżeli początkowo sądzono [10, 11], podłoże defektu enzymatycznego.

Cechą charakterystyczną enzymopatii jest duża różnorodność jej obrazu klinicznego, w tym również występowanie przebiegu bezobjawowego. Przyczyna takiego stanu rzeczy nie jest do końca jasna. Występowanie zjawiska alternatywnego składania transkryptów (*alternative splicing*), obejmującego obszar zmutowanego eksonu drugiego, albo też wykształcenie się nieznanych jeszcze metabolicznych mechanizmów kompensacyjnych, to dwa możliwe tłumaczenia powyższego zjawiska [10, 11].

Wśród objawów klinicznych niedoboru mięśniowej deaminazy AMP na pierwszy plan wysuwa się łatwa męczliwość wysiłkowa oraz powysiłkowe bóle i skurcze mięśniowe [9]. Charakterystycznym, łatwym do oznaczenia parametrem defektu jest tzw. ujemny test wysiłkowy. Jego istota polega na braku powysiłkowego wzrostu stężenia amoniaku we krwi żyłnej — bezpośredniego następstwa uaktywnienia się gałęzi deaminującej cyklu nukleotydów purynowych [9].

Następstwa metaboliczne niedoboru mięśniowej deaminazy AMP są różnorakie. Osobników z niedoborem tego enzymu charakteryzuje znacznie wyższy (prawie pięciokrotnie), powysiłkowy spadek zawartości mięśniowej fosfokreatyny. Spadkowi temu nie towarzyszy, jak ma to miejsce w warunkach prawidłowych, wzrost tkankowego stężenia kwasu inozynowego (IMP). Zamiast tego obserwuje się wzrost stężenia łatwo dyfundujących przez błonę komórkową produktów degradacji puryn, takich jak inozyna, hipoksantyna oraz adenozyzna [7]. Ta ostatnia jest metabolitem kardioprotekcyjnym, stosowanym od niedawna również w terapii kardiologicznej. Adenozyne przypisuje się wiele korzystnych dla metabolizmu serca oddziaływań bezpośrednich i pośrednich. Do oddziaływań bezpośrednich zaliczamy zarówno te związane z poprawą ogólnego ukrwienia serca w mechanizmie autoregulacji przepływu wieńcowego, jak i te związane z jej udziałem w mechanizmie niedokrwiennej „hartowania” (*preconditioning*), hamowaniem produkcji prozapalnej cytokiny (TNF α), albo też „wygaszaniem” komorowych ognisk arytmicznych. Oddziaływania pośrednie realizowane są natomiast poprzez receptory adenozynowe i generalnie prowadzą do wyzwolenia efektów antyadrenergicznych z osłabieniem katecholaminowej stymulacji ośrodków pobudzania serca [7].

Na ile wysunięta przez Holmes'a i współautorów [7] hipoteza jest prawdziwa, tego obecnie nie sposób rozstrzygnąć. Bardziej szczegółowe badania przeprowadzone na liczniejszej grupie pacjentów, w tym badania retrospektywne chorych na kardiomiopatię rozstrzeniową, jak i badania prospektywne pacjen-

tów z niedoborem mięśniowej deaminazy AMP [13], pozwolą być może, uzyskać bardziej precyzyjną odpowiedź na postawione pytania.

Artykuł otrzymano 24 czerwca 1999 r.

Zaakceptowano do druku 19 lipca 1999 r.

Literatura

1. Rużyłło W, Rydlewska-Sadowska W (1995) W: Wojtczak A (red) *Choroby Wewnętrzne*, t1, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, str. 724-753
2. Michels VV, Driscoll DJ, Miller Jr FA (1985) *Am J Cardiol* **55**: 1232-1233.
3. Valentine HA, Hunt SA, Fowler MB, Billingham ME, Schroeder JS (1989) *Am. J Cardiol* **63**: 959-963.
4. Michels VV, Moll PP, Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesboro JH, Tezalaar HD (1992) *New Engl J Med* **326**: 77-82.
5. Leiden JM (1997) *New Engl J Med* **337**: 1080-1081.
6. Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai Y-S, Keating MT (1998) *Science* **280**: 750-752.
7. Loh E, Rebbeck TR, Mahoney PD, DeNofrio D, Swain JL, Holmes EW (1999) *Circulation* **99**: 1422-1425.
8. Fishbein WN, Armbrustmacher V, Griffin JL (1978) *Science* **200**: 545-548.
9. Kaletha K, Nowak G, Adrych K, Makarewicz W (1991) *Post Biochem* **37**: 58-62.
10. Kaletha K, Gross M (1995) *Post Biochem* **41**: 183-187.
11. Gross M (1997) *J Inher Metab Dis* **20**: 186-192.
12. Rotzer E, Mortier W, Reichmann H, Gross M. (1998) W: Griesmacher A, Chiba P, Muller M (red) *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man IX*, t431, Plenum Press, New York and London, str. 129- 133
13. Feldman AM, Wagner DR, McNamara DM (1999) *Circulation* **99**: 1396-1399.

Rola lekkich łańcuchów miozyny w regulacji skurczu mięśnia sercowego

The role of the myosin light chains in the regulation of cardiac muscle contraction

ANNA MOCZARSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Fosforylacja lekkich łańcuchów regulujących miozyny w niedokrwionym mięśniu sercowym
- III. Fosforylacja lekkich łańcuchów regulujących miozyny i stymulacja inotropowa serca
- IV. Cukrzyca i fosforylacja lekkich łańcuchów regulujących miozyny mięśnia sercowego
- V. Rola lekkiego łańcucha istotnego miozyny w regulowaniu kurczliwości mięśnia sercowego
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: RLC — lekki łańcuch regulujący miozyny, ELC — lekki łańcuch istotny miozyny, HC — ciężki łańcuch miozyny, S-1 — subfragment-1 miozyny, MLCK — kinaza lekkich łańcuchów miozyny.

I. Wstęp

Prowadzone w ostatnich latach intensywne badania struktury główki miozyny przyczyniły się do wzrostu zainteresowania jej lekkimi łańcuchami — regulującym (RLC) i istotnym (ELC). Szczególnie ciekawa i wciąż jeszcze niedostatecznie poznana jest rola obu lekkich łańcuchów we wzajemnych oddziaływaniach miozyny i aktyny. Jej wyjaśnienie potrzebne jest nie tylko dla pełniejszego zrozumienia mechanizmu skurczu mięśnia, ale także dla poznania procesów, wpływających na kurczliwość mięśnia w różnych stanach patologicznych. Liczne obserwacje wskazują, że w uszkodzonym mięśniu sercowym jego funkcja skurczowa jest często utrzymana na tyle, aby ten niezbędny dla życia organ, pomimo wie-

Contents:

- I. Introduction
- II. Phosphorylation of cardiac muscle myosin regulatory light chains during ischemia
- III. Myosin regulatory light chains phosphorylation and inotropic stimulation of heart muscle
- IV. Diabetes mellitus and phosphorylation of cardiac myosin regulatory light chains
- V. The role of the myosin essential light chain in the regulation of cardiac contractility
- VI. Summary

lu zmian fizjologicznych (zaburzenie metabolizmu, uszkodzenie struktury komórek), mógł nadal choć w ograniczonym stopniu pełnić swoją funkcję. Poznanie tego zjawiska i zbadanie potencjalnych mechanizmów „naprawczych” może być pomocne w opracowaniu metod terapeutycznych, mających na celu ograniczenie dalszego rozwoju istniejących już zaburzeń prawidłowej czynności mięśnia sercowego.

Zaproponowany przez R a y m e n t a i wsp. [1, 2] model krystalicznej struktury główki miozyny mięśnia szkieletowego kurczącego, zakłada obecność w niej dwu domen — motorycznej i regulatorowej. Domena motoryczna zawiera miejsce wiązania i hydrolyzy ATP oraz miejsce wiązania aktyny z którą oddziałuje w procesie skurczu. W domenie regulatorowej znajdują się lekkie łańcuchy miozyny — regulujący (RLC) i istotny (ELC). Funkcja domeny regulatorowej w mięśniu szkieletowym i sercowym nie jest tak dobrze poznana jak przypadku mięśnia gładkiego czy miozyny mięczaków. Fosforylacja reszty serynowej (Ser-19) znajdującej się w końcu-N lekkiego łańcucha regulującego odgrywa kluczową rolę w inicjacji skurczu w mięśniu gładkim. W miozynie mięczaków, aktywność skurczowa wyzwalana jest przez wiązanie Ca^{2+} z miejscem znajdującym się w końcu-N lekkiego łańcucha istotnego, który stabilizowany jest przez interakcje z lekkim łańcuchem re-

*Dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego, Zakład Biochemii Mięśni, Pracownia Molekularnych Podstaw Skurczu Mięśnia, ul Pasteura 3, 02-093 Warszawa

gulującym i łańcuchem ciężkim (HC) miozyny [3-5]. Rola lekkich łańcuchów miozyny w mięśni szkieletowym i sercowym nie jest tak jednoznaczna. Badania wykazały, że usunięcie ELC i RLC z subfragmentu-1 (S1) główki miozynowej nie wpływa w sposób istotny na zdolność hydrolizy ATP przez główkę, co może sugerować, że łańcuchy te nie są niezbędne dla aktywności enzymatycznej [6, 7]. Zakłada się jednak, że mogą one stabilizować strukturę ciężkiego łańcucha miozyny, który jest głównym wyznacznikiem aktywności skurczowej, przez co wpływają na parametry skurczu, „dostrajając” motor miozynowy i zapewniając właściwą przemianę energii chemicznej w mechaniczną [8].

II. Fosforylacja lekkich łańcuchów regulujących miozyny w niedokrwionym mięśniu sercowym

Lekkie łańcuchy miozyny zaliczane są do rodziny białek wiążących wapń, posiadających charakterystyczne motywy „EF-hand” [9, 10]. Każdy motyw utworzony jest przez dwie helisy i łączącą je pętlę zawierającą miejsce wiązania Ca^{2+} . Łańcuchy istotne miozyny mięśni kręgowców w toku ewolucji całkowicie utraciły zdolność przyłączania Ca^{2+} , natomiast łańcuchy regulujące zachowując pierwszy motyw „EF-hand”, utrzymały możliwość wiązania jonów wapnia lub magnezu [11, 12]. RLC są także specyficznie fosforylowane przez kinazę lekkich łańcuchów miozyny (MLCK). Jej aktywacja odbywa się przez odwracalne wiązanie wapnia i kalmoduliny przy stężeniach Ca^{2+} podobnych do tych jakie niezbędne są dla aktywacji miofibrylarniej ATPazy [13, 14]. Łańcuchy regulujące miozyny, uzyskanej z komory serca człowieka, zawierają położone blisko końca-N (1APKKAKKRAGGANSNVF¹⁷) jedno miejsce fosforylacji Ser-14, natomiast RLC miozyny przedsionków ludzkiego serca mogą być fosforylowane w dwu miejscach. Jak to ma znaczenie dla kurczliwości mięśnia sercowego dokładnie nie wiadomo [11, 15]. Defosforylacja odbywa się przy udziale fosfatazy lekkich łańcuchów [16].

Fosforylacja, a także zdolność łańcucha regulującego do wiązania kationów dwuwartościowych (Ca^{2+} , Mg^{2+}) powodują, że może on przyjąć różną konformację, co prawdopodobnie wpływa na konformację domeny regulatorowej. Takie zmiany mogą mieć wpływ na strukturalną organizację całej główki

miozyny i przez to na wzajemne oddziaływania miozyny z aktyną w procesie skurczu [17, 18].

Udział fosforylacji w kurczliwości zdrowego i chorego serca nie jest dostatecznie poznany. Wyniki badań wskazują, że fosforylacja RLC przez kinazę lekkich łańcuchów miozyny odgrywa modulującą rolę w procesie generowania siły podczas skurczu w mięśni prążkowanym kręgowców [19]. Wzrost poziomu fosforylacji przyczynia się do zwiększenia wrażliwości na Ca^{2+} aparatu kurczliwego mięśnia sercowego, co prowadzi do wzrostu produkcji siły przy niskich stężeniach jonów wapnia [19, 20].

Eksperymenty przeprowadzone na włóknach wyizolowanych z mięśnia *psaos* (mięsień lędźwiowo-udowy) królika pokazały, że szybkość narastania siły podczas skurczu izometrycznego związana jest ze wzrostem poziomu fosforylacji RLC [21, 22]. Taki sam wpływ fosforylacji na rozwój siły zauważono w pozbawionych błony sercowych beleczkach (podłużne pasma mięśniowe wypuklające się ze ścian komór serca do ich światła) [20]. W sercu szczura poddanego zwiększonemu wysiłkowi fizycznemu obserwowano korelację pomiędzy fosforylacją łańcuchów regulujących i szybkością rozwoju napięcia w lewej komorze serca [23]. Podobną zależność pomiędzy aktywnym napięciem i poziomem fosforylacji RLC zauważono w sercach szczurów, które przez dłuższy okres czasu perfundowane były roztworem zawierającym substancje o działaniu inotropowo dodatnim¹ [24].

Badania krótko niedokrwionego mięśnia sercowego, w którym nie dochodzi do trwałego uszkodzenia miocytów nasunęły przypuszczenie, że obserwowane tu upośledzenie funkcji skurczowej serca wywołane jest zmianą poziomu fosforylacji białek bezpośrednio zaangażowanych w skurcz. Englund i Krause [25] wykazali jednak, że stopień fosforylacji białek kurczliwych nie jest zmieniony w izolowanych sercach szczura, które poddano niedokrwieniu lub tylko niedotlenieniu. Podobne wyniki uzyskaliśmy w naszym laboratorium analizując poziom fosforylacji RLC oraz białek regulujących związanych z filamentem aktynowym w czasie 20 min. ischemii i reperfuzji serca królika [26]. Niektórzy badacze zakładają, że szybkość procesów fosforylacji i defosforylacji łańcuchów regulujących miozyny serca jest bardzo niska ze względu na małe ilości kinazy lekkich łańcuchów i fosfatazy w mięśniu sercowym [27]. Należy też zaznaczyć, że poja-

1 Czynniki inotropowe (dodatnie lub ujemne) — związki chemiczne zmieniające kurczliwość mięśnia sercowego

wiające się w literaturze opinie na temat fosforylacji białek aparatu kurczliwego mięśnia sercowego, nie zawsze odzwierciedlają ich faktyczny stan w danych warunkach patofizjologicznych, co może wynikać z trudności w utrwaleniu rzeczywistego poziomu fosforylacji badanych preparatów, a także / lub ze stosowanych metod pomiaru.

Zaburzenie funkcji mięśnia sercowego po jego niedokrwieniu jest zjawiskiem szeroko opisanym w literaturze zarówno przez klinicystów jak i biochemików. Badania ostatnich lat przyniosły też wiele informacji na temat udziału i znaczenia fosforylacji łańcuchów regulujących w procesie skurczu, jednak tylko znikomy procent wśród nich stanowią dane dotyczące tego zjawiska w różnych stanach patologicznych mięśnia sercowego, przebiegających ze zmianą jego kurczliwości.

M o r a n o [28] badając serca szczurów z samoistnym nadejściem zaobserwował spadek poziomu fosforylacji RLC w lewej komorze serca w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Podobne zjawisko obserwowano w przypadku eksperymentalnie wywołanego zawału w sercu szczura, gdy po podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej fosforylacja łańcuchów regulujących w nieobjętym przez zawał obszarze lewej komory serca spadła, natomiast poziom MLCK był podwyższony [29]. W prawej komorze, która w trakcie rozwoju lewokomorowego uszkodzenia w opisanym modelu doświadczalnym ulega hipertrofii [30, 31], poziomy fosforylacji RLC oraz kinazy lekkich łańcuchów były podwyższone. Ponieważ stopień fosforylacji RLC zależny jest od ilości obecnej w tkance kinazy, to jak sugerują autorzy, obserwowany w lewej komorze serca wzrost zawartości MLCK jest procesem kompensującym obniżoną fosforylację łańcuchów regulujących [29]. Z licznych badań wynika, że jedną z konsekwencji niedokrwienia serca jest zaburzenie homeostazy szeregu procesów komórkowych, co może pociągnąć za sobą zmiany jego metabolizmu, a także załamanie się funkcji skurczowej serca. Regulacja homeostazy związana jest między innymi z fosforylacją zaangażowanych w te procesy białek [32, 33]. Można by zatem przypuszczać, że upośledzenie funkcji skurczowej lewej komory serca jest wynikiem załamania się procesów fosforylacji także łańcuchów regulujących miozyny. Zjawisko to pojawia się jednak dopiero w osiem tygodni po zaindukowaniu zawału, natomiast wcześniej nie występuje. Brak czasowej korelacji pomiędzy upośledzeniem funkcji skurczowej a załamaniem się poziomu fosforylacji nasuwa wątpliwości czy rzeczywiście w powstawaniu funkcjonal-

nych zmian w lewej komorze serca fosforylacja RLC odgrywa decydującą rolę [29]?

III. Fosforylacja lekkich łańcuchów regulujących miozyny i stymulacja inotropowa mięśnia sercowego

Niektórzy badacze łącząc zmianę fosforylacji z upośledzeniem funkcji skurczowej serca, zaproponowali, że inotropowa regulacja jego kurczliwości odbywa się właśnie poprzez fosforylację łańcuchów regulujących [24]. Inni byli jednak bardziej powściągliwi z wysnuwaniem podobnych wniosków, ponieważ nie potrafili wykryć takiej zależności. Typowym tego przykładem są badania wpływu stymulacji β -adrenergicznej, która według jednych badaczy powoduje wzrost poziomu fosforylacji RLC natomiast inne wyniki wskazują, że podanie adrenaliny lub wzrost stężenia jonów wapnia nie wywołują takich zmian [34, 35]. Informacje na temat fosforylacji łańcuchów regulujących oraz wpływu stymulacji inotropowej są ważne, ponieważ białka kurczliwe wpływają na funkcjonalną aktywność serca, ich fosforylacja prawdopodobnie moduluje produkcję siły, a degradacja tych białek stanowi wymierny wskaźnik uszkodzenia mięśnia sercowego.

A k i y a m a i wsp. [36], posługując się modelem eksperymentalnie wywołanego zawału w sercu królika, przeprowadzili badania poziomu fosforylacji RLC w obszarze bezpośrednio objętym niedokrwieniem. Podwiązanie przedniej zstępującej tętnicy wieńcowej spowodowało, że zawał w postaci widocznej nekrozy i zbliznowaceń, pojawił się w przedniej ścianie lewej komory serca. Ściana tylna wolna była od zawału.

Przyczyną zawału mięśnia sercowego jest ostre i długo trwające niedokrwienie pewnego obszaru komory serca, czego wynikiem jest zaburzenie funkcji skurczowej pojawiające się w ciągu kilku minut od zaistnienia niedokrwienia. Ischemia nie powoduje jednak nagłej i całkowitej destrukcji wszystkich kardiomiocytów. Pewna pula aktywnych miocytów jest stale obecna w tkance objętej zawałem. Biochemiczna analiza miozyny uzyskanej z lewej komory serca pokazała stopniowy spadek względnej ilości łańcuchów regulujących w obu badanych obszarach, przy czym w obszarze niedokrwionym, jak należało oczekiwać, był on znacznie większy. Jednocześnie ujawniła wyraźną redukcję fosforylacji RLC i to zarówno w rejonie zawału (przednia ściana), jak i w obszarze wolnym od zawału (ściana tylna) [36]. Po zawale mięśnia sercowego dochodzi do przebudowy komo-

ry, co odmienia jej architekturę. Skutkiem tego jest znaczne zmniejszenie się grubości i wydłużenie oraz zwiotczenie obszaru, który uległ zawałowi. Podstawą takich morfologicznych zmian jest redukcja ilości miocytów w rejonie serca objętym zawałem oraz możliwość zmian kształtu komórek i odległości pomiędzy nimi [37]. Wydaje się, że redukcja ilości nieuszkodzonych kardiomiocytów musi być połączona ze zmianami fosforylacji RLC, co znalazło potwierdzenie w eksperymentach A k i y a m y i wsp. Jednak badanie tego zjawiska po stymulacji inotropowej chorego serca pozostawiło także pewne wątpliwości. Podanie izoproterenolu (substancja o działaniu inotropowo dodatnim) zgodnie z oczekiwaniami znacznie podniosło szybkość pracy serca oraz poziom fosforylacji łańcuchów regulujących i ten ostatni efekt istotny był głównie w obszarze nieobjętym przez zawał chociaż niewielki wzrost obserwowano też w przedniej ścianie lewej komory. Usprawnienie funkcji serca oraz wzrost fosforylacji RLC pojawiły się jednak dopiero w siedem dni po wywołaniu niedokrwienia u zwierząt badanych, natomiast u zwierząt pozornie operowanych (*sham operated*) zjawisko to w ogóle nie wystąpiło [36].

Interesujących wyników dostarczyły ostatnie badania endoteliny – potencjalnego czynnika o działaniu inotropowo dodatnim, występującego m. in. w zdrowej tkance serca oraz we krwi, które pokazały, że w sercu szczura endotelina podnosi siłę skurczu bez wzrostu poziomu wapnia. Okazało się też, że peptyd ten powoduje wzrost fosforylacji RLC [38]. Jest mało prawdopodobne, aby w indukowanej endoteliną fosforylacji łańcuchów regulujących pośredniczyła specyficzna kinaza lekkich łańcuchów miozyny (MLCK) zależna od kalmoduliny i jonów wapnia, ponieważ jej aktywność w sercu jest niska [27]. V e n e m a i wsp. [39] pokazali, że białkowa kinaza C zdolna jest fosforylować łańcuchy regulujące miozyny mięśnia sercowego podobnie jak MLCK. Ponadto okazało się, że dominującą w sercu formą białkowej kinazy C jest izoenzym PKC- ϵ , który ulega aktywacji przez endotelinę i adrenalinę i jego aktywność nie zależy od obecności kationów dwuwartościowych [40]. Endotelina może zatem pełnić ważną funkcję regulującą kurczliwość mięśnia sercowego [38].

IV. Cukrzyca i fosforylacja lekkich łańcuchów regulujących miozyny mięśnia sercowego

Przewlekła cukrzyca u zwierząt i u ludzi prowadzi do zmiany funkcji serca, czego skutkiem jest załamanie się produkcji siły podczas skurczu, i zaburzenie

jego funkcji tłoczącej [41]. Badania miozyny wyizolowanej z takich serc, oprócz zmian w prawidłowym wzorze jej izoform, wykazały też spadek poziomu fosforylacji lekkich łańcuchów regulujących, oraz zaburzoną aktywność miofibrylarniej ATPazy [42-44]. Podobną redukcję aktywności miofibrylarniej ATPazy obserwowano w sercach, których funkcja skurczowa została zmieniona na skutek niewydolności zastawki dwudzielnej, choroby wieńcowej czy kardiomiopatii rozstrzeniowej [45-47]. W tym ostatnim przypadku łańcuchy regulujące w końcowych stadiach choroby były całkowicie zdefosforylowane [48]. Ponieważ jak można przypuszczać fosforylacja łańcuchów regulujących miozyny niezbędna jest dla prawidłowej aktywności skurczowej mięśnia, to zmiany jej poziomu mogą mieć pewien wpływ na aktywność miofibrylarniej ATPazy i przez to przyczynić się do zmienionej mechaniki mięśnia sercowego. Badania L i u i wsp. [49] wykazały obniżenie zawartości zarówno kinazy lekkich łańcuchów jak i RLC w tkance serc cukrzyków. Ponieważ stopień fosforylacji łańcuchów regulujących zależy od stężenia obu tych białek, to spadek ich zawartości może tłumaczyć obserwowany w homogenatach badanych serc obniżony poziom fosforylacji RLC. Analiza homogenatów serc szczurów z kardiomiopatią cukrzycową dostarczyła jeszcze innych ciekawych wyników, wskazujących na udział fosforylacji łańcuchów regulujących w dysfunkcji serca połączonej ze spadkiem aktywności miofibrylarniej ATPazy. Okazało się bowiem, że podawanie chorym zwierzętom insuliny odwraca obniżoną aktywność miofibrylarniej ATPazy, zmienia poziom fosforylacji RLC oraz przywraca właściwy poziom kinazy lekkich łańcuchów. Poprawia się też zmieniona wcześniej kurczliwość serca [42-44]. Interesujące są także wyniki dotyczące zmian poziomu glukozy oraz poziomów insuliny we krwi zwierząt z cukrzycą, które leczono lub nie leczono insuliną, a które wskazują, że obserwowany w cukrzycy spadek fosforylacji lekkich łańcuchów regulujących może być konsekwencją stresu metabolicznego. Jednak dokładny metaboliczny sygnał prowadzący do zmian w białkach mających wpływ na fosforylację RLC pozostaje obecnie nieznany [49].

Badania dotyczące zmian poziomów fosforylacji łańcuchów regulujących miozyny w sercu, którego funkcja skurczowa uległa wyraźnemu uszkodzeniu nasuwają niejednoznaczne wnioski. O ile bowiem indukowany w sercach szczurów zawał powoduje obniżenie się poziomu fosforylacji RLC, i to zarówno w miejscu bezpośrednio objętym zawałem jak i w prawidłowo ukrwionych obszarach lewej komory

serca, to w przypadku krótko trwającego niedokrwienia, które pomimo braku rozległych zmian martwiczych jest przyczyną upośledzenia kurczliwości serca, istotnych zaburzeń poziomów fosforylacji łańcuchów regulujących nie zaobserwowano. Podobne konkluzje nasuwają badania innych chorób serca przebiegających z upośledzeniem jego kurczliwości, chociaż w wielu z nich zaobserwowano też znaczne zmiany we wzorze izoform lekkich łańcuchów miozyny, co wskazywałoby na uruchomienie przez chore serce mechanizmu adaptacyjnego służącego usprawnieniu jego funkcji skurczowej i przystosowaniu do nowych patofizjologicznych wymagań (problem ten szerzej opisywałam w poprzednim artykule [50]). Wyjaśnienie mechanizmu który kontroluje i reguluje procesy skurczu niezbędne jest dla lepszego zrozumienia zmian obserwowanych w różnych chorobach serca.

V. Rola lekkiego łańcucha istotnego miozyny w regulowaniu kurczliwości mięśnia sercowego

Z dotychczasowych badań wynika, że domena regulatorowa główki miozynowej może odgrywać istotną rolę w modulowaniu jej oddziaływania z aktyną, a zatem w regulowaniu kurczliwości mięśnia sercowego. Uzyskane wyniki pokazały, że podczas skurczu mięśnia aktyna oddziałuje z domeną motoryczną główki miozynowej oraz z domeną regulatorową [51]. Oddziaływanie z tą ostatnią odbywa się poprzez koniec-N lekkiego łańcucha istotnego (ELC), który wiąże się z końcem-C aktyny. Hipotezę tę potwierdziły liczne wcześniejsze eksperymenty [52, 53]. Pojawia się jednak pytanie: jaką rolę w tym oddziaływaniu pełni związany z domeną regulatorową główki miozyny łańcuch regulujący?

Prowadzone w naszym laboratorium badania miozyny uzyskanej z krótko niedokrwionego mięśnia sercowego nasunęły przypuszczenie, że obserwowany w niedokrwionym mięśniu wzrost stężenia jonów wapnia w komórce stwarza możliwość wymiany związanego z łańcuchem regulującym jonu magnezu na wapń. Wykorzystując fakt, że w końcu-N lekkiego łańcucha istotnego znajduje się miejsce wrażliwe na obecność papainy, oraz, że dostępność tego miejsca zmienia się w zależności od rodzaju kationu wysycającego lekki łańcuch regulujący miozyny, zbadaliśmy wpływ takiej wymiany na możliwość ekspozycji ELC do trawienia papainą. Okazało się, że wysycenie łańcucha regulującego wapniem powoduje wzrost trawienia lekkiego łańcucha istotnego papainą w przeciwieństwie do miozyny w której łańcuch

regulujący wysycony jest magnezem. Wymiana kationów dwuwartościowych związanych z łańcuchem regulującym prawdopodobnie pociąga za sobą zmianę strukturalnej organizacji główki miozyny, co przejawia się zmianą ułożenia końca-N lekkiego łańcucha istotnego podczas oddziaływania główki miozynowej z filamentem aktynowym i ATP w procesie skurczu [54]. Przeprowadzone przez Moranó i wsp. [55] badania wyizolowanych z komory ludzkiego serca włókien mięśniowych zdają się z kolei wskazywać na rolę jaką pełni koniec-N łańcucha istotnego w oddziaływaniu z końcem C-aktyny. W obecności syntetycznego peptydu, odpowiednika N-końcowego fragmentu lekkiego łańcucha istotnego miozyny serca (5 KPEPKKDDAK¹⁴), przy submaksymalnych i maksymalnych stężeniach Ca^{2+} , zaobserwowano wzrost generowanej przez włókna siły. Zaproponowano zatem, że oddziaływanie końca-N łańcucha istotnego z aktyną może regulować kurczliwość mięśnia sercowego. Do podobnych wniosków skłaniają wyniki uzyskane przez inną grupę badaczy. Obecność syntetycznego peptydu w miofibrylach wyizolowanych z serca szczura, przy submaksymalnych stężeniach Ca^{2+} , indukowała wzrost aktywności miofibrylarnej Mg^{2+} ATPazy powyżej wartości osiąganych przy maksymalnej aktywacji jonami wapnia. Efekt ten zależny był od obecności pełnego kompleksu białek regulujących związanych z cienkim filamentem. Ekstrakcja tropoiny I i C z miofibrili powodowała, że peptyd tracił zdolność stymulowania szybkości ATPazy, natomiast ponowna rekonstrukcja wyekstrahowanych białek odbudowywała ten efekt. Badacze wysunęli zatem hipotezę, że peptyd bezpośrednio aktywuje cienki filament przez oddziaływanie z aktyną [56]. Można więc sądzić, że koniec-N lekkiego łańcucha istotnego, którego odpowiednik — syntetyczny peptyd zastosowano w powyższych doświadczeniach oddziałuje z filamentem aktynowym przyłączając się i odłączając od monomerów aktyny, co w cyklu mostków poprzecznych podczas hydrolizy ATP prawdopodobnie związane jest z przejściem ze słabego do silnego stanu wiązania aktyny z miozyną.

Cykliczne oddziaływanie główek miozynowych (tzw. mostki poprzeczne) z filamentami aktynowymi jest podstawą molekularnego mechanizmu skurczu zarówno w mięśniu prążkowanym jak i gładkim. Te wzajemne aktomiozynowe oddziaływania regulowane są przyłączaniem ATP i jego hydrolizą do ADP i fosforanu nieorganicznego (Pi) przez aktomiozynową ATPazę. Towarzyszą temu zmiany powinowactwa miozyny do aktyny, co przejawia się cyklicznym przejściem od słabego do silnego stanu wiąża-

nia mostka z filamentem aktynowym, oraz zmianami konformacyjnymi zachodzącymi w białkach bezpośrednio zaangażowanych w skurcz. Dla ruchu filamentów lub generowania siły potrzebne jest silne połączenie mostka z filamentem aktynowym, co ma miejsce podczas uwalniania produktów hydrolizy. Przymocowanie mostków poprzecznych przed odłączeniem fosforanu jest słabe. Uwolnieniu Pi towarzyszy wzmocnienie wiązania miozyny z aktyną. Do wymiany związanego z kompleksem aktomiozyny ADP na ATP dochodzi w kolejnych etapach cyklu. Proces ten osłabia wiązanie się główki miozynowej do aktyny i dysocjuje jej połączenie z aktyną, a zatem cały cykl ponownie się rozpoczyna. Z badań przeprowadzonych na mięśniach szkieletowych wynika, że produkty hydrolizy ATP mogą przesuwając reakcję w cyklu mostków poprzecznych. H o a r i wsp. [57] zasugerowali, że wzrost stężenia produktów hydrolizy może przesuwając reakcję w kierunku słabego wiązania (nadmiar Pi) lub wydłużyć etap silnego wiązania (nadmiar ADP). Wysokie stężenie fosforanu nieorganicznego jak pokazały wyniki badań obniża generowanie napięcia oraz aktywność aktomiozynowej ATPazy. Zakłada się zatem, że fosforan oddziałuje na cykl mostków poprzecznych przez wprowadzenie ich w stan słabego wiązania. Z kolei badania z nadmiarem ADP pokazały, że podnosi on maksymalną siłę skurczu włókien wyizolowanych z mięśnia łądźwiowo-udowego królika i obniża maksymalną szybkość ich skracania [57]. Hamujący wpływ ADP wykazały też testy ruchliwości (*in vitro*) miozyny uzyskanej z żołądków kurzych [58]. Sugeruje się, że ADP może współzawodniczyć z ATP o miejsce jego wiązania i hamować końcowe etapy hydrolizy ATP, przyczyniając się w ten sposób do wzrostu rozwoju napięcia we włóknie [59].

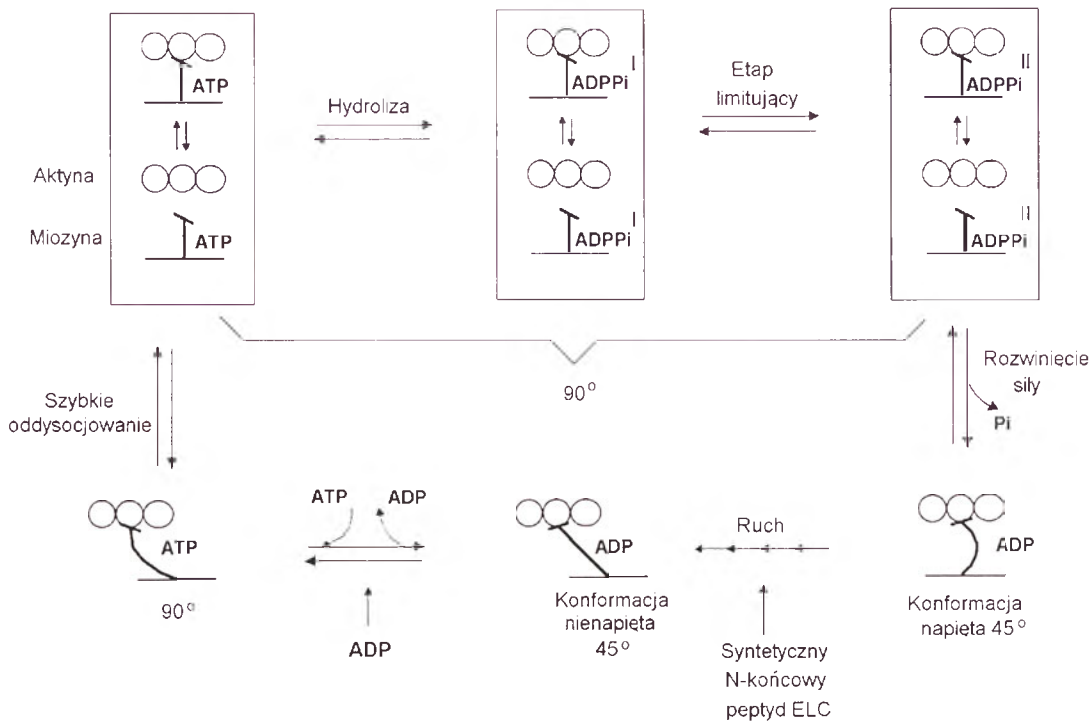
Kinetyczna analiza szybkości uwalniania ADP wykazała, że jest ona znacznie wolniejsza w mięśniach sercowych niż w szkieletowych [60]. Badania, których celem było określenie wielkości hamowania przez ADP aktywowanej aktyny ATPazy miozynowej w różnych tkankach mięśniowych pokazały, że w przypadku subfragmentu-1 (S1) miozyny mięśnia gładkiego 50% hamowanie aktywności ATPazy aktywowanej aktyną pojawia się przy proporcji ADP:ATP= 3:1, dla S1 miozyny mięśnia sercowego ten stosunek wynosi 6:1, a dla S1 z mięśnia szkieletowego aż 40-50:1 [59].

Przyjmuje się, że w mięśniach szkieletowych stężenie ADP nie może wzrosnąć na tyle aby zahamować ATPazę *in vivo* prawdopodobnie ze względu na obecność licznych enzymów biorących udział w przekształcaniu ADP w ATP [61]. W mięśniach gładkich

ADP wyraźnie podwyższa rozwój napięcia i opóźnia odłączanie się mostków poprzecznych [62]. Podobne zjawisko obserwuje się w mięśniach sercowych.

Przeprowadzone w naszym laboratorium badania miofibrili uzyskanych z serca królika pokazały, że ADP w sposób istotny obniża hydrolizę ATP. Zaobserwowaliśmy też, że obecność syntetycznego peptydu odpowiednika końca-N lekkiego łańcucha istotnego miozyny serca odwraca ten efekt. Zjawisko to zależne jest od stężenia jonów wapnia i pojawia się przy wysokim jego poziomie. Uzyskane wyniki pokazały zatem nieznany dotąd wpływ syntetycznego peptydu na hamujące działanie podwyższonego poziomu ADP [63]. Opierając się na modelu cyklu mostków poprzecznych zaproponowanym przez Eisenberga i Greene [64] (Ryc.1) efekt ten można wytłumaczyć następująco: wiązanie się syntetycznego peptydu z kompleksem aktomiozynowym prowadzi do wzrostu napięcia, a zatem zgodnie z modelem do utrzymywania się tzw. konformacji napiętej 45⁰ (umownie określanej kąt pomiędzy osią główki miozynowej a osią filamentu aktynowego). Należy przypuszczać, że przejście z tej konformacji do konformacji nienapiętej 45⁰ związane jest prawdopodobnie z odłączeniem się końca-N lekkiego łańcucha istotnego od aktyny. Ponieważ jednak zastosowany w doświadczeniach syntetyczny peptyd odpowiednik końca-N lekkiego łańcucha istotnego pozostaje związany z aktyną, uniemożliwiając przez to przyłączanie się lub odłączanie końca natywnego łańcucha istotnego od aktyny, to napięcie nie jest uwalniane (brak przejścia do konformacji nienapiętej 45⁰) i nie towarzyszy temu jak zaznaczono na modelu ruch filamentów. Podobna sytuacja ma miejsce w skurczu izometrycznym gdy mostek nie odłącza się od aktyny. Eisenberg i Greene [64] zakładają, że w takim przypadku uwolnienie ADP z konformacji napiętej 45⁰ kompleksu aktomiozynowego zachodzi bardzo wolno i bezpośrednio w tej konformacji ADP wymieniany jest na ATP, po czym następuje powrót do stanu aktomiozyna-ATP i cykl rozpoczyna się na nowo.

Konformacja napięta 45⁰ kompleksu aktomiozynowego z ADP jest stanem wysokoenergetycznym i ADP występujący w środowisku nawet w nadmiarze, praktycznie nie wymienia się ze związanym nukleotydem. Zatem wzrost stężenia ADP na tym etapie nie może mieć wpływu na aktywność ATPazy, co wyjaśniałoby obserwowany w naszych eksperymentach efekt syntetycznego peptydu znoszącego hamujące działanie ADP. Jednak nukleotyd ten wiąże się z kompleksem aktomiozynowym znajdującym się w stałej nienapiętej konformacji 45⁰ o niskiej energii.



Ryc. 1. Zmodyfikowany schemat Eisenberga i Greene [64] przedstawiający cykl mostków poprzecznych. Miejsca prawdopodobnego wpływu nadmiaru ADP oraz syntetycznego peptydu — odpowiednika końca-N lekkiego łańcucha istotnego miozyny, zaznaczono strzałkami.

Na tym etapie ADP, którego poziom w środowisku jest podwyższony może współzawodniczyć z ATP o miejsce jego wiązania. Związanie ADP przyczyni się do wzrostu napięcia ponieważ reakcja przesunie się w kierunku konformacji napiętej.

Zrozumienie tego zjawiska jest niezwykle ważne dla poznania przyczyn oraz mechanizmu zmian kurczliwości serca obserwowanych w różnych jego stanach patologicznych. Badania niedotlenionego serca pokazały np., że ostremu załamaniu się jego funkcji skurczowej towarzyszy około 50% wzrost poziomu ADP [65]. W świetle przedstawionych wyżej wyników należy sądzić, że hamowanie przez ADP może mieć związek z upośledzeniem cyklu skurczowo-rozkurczowego (wydłużenie czasu trwania skurczu i krótki niepełny rozkurcz), obserwowanym w długo trwającym niedokrwieniu serca oraz w tzw. sercu "ogłuszonym" [66]. Wynika to prawdopodobnie z wpływu jaki ADP wywiera na ostatnie etapy hydrolizy ATP, powodując przedłużenie stanów silnego wiązania główek miozyny z filamentem aktynowym. Wyniki te sugerują, że ADP może być fizjologicznie ważnym modulatorem aktywności ATPazowej w tkance mięśnia sercowego.

VI. Podsumowanie

Wszystkie przedstawione tu wyniki badań podtrzymują hipotezę, że domena regulatorowa główki miozyny uczestniczy w regulacji skurczu mięśnia

sercowego na drodze oddziaływania końca-N łańcucha istotnego miozyny z aktyną w cyklu mostków poprzecznych. W procesie tym ważną modulującą rolę odgrywa fosforylacja łańcuchów regulujących oraz wymiana związanych z tymi łańcuchami kationów dwuwartościowych. Wiadomo, że fosforylacja i defosforylacja białek kardiomiocytów stanowią ważny mechanizm regulujący funkcję skurczową serca oraz jego metabolizm. Procesy te wywołują pewne zmiany konformacyjne białek przez co zmienia się ich struktura i właściwości biologiczne. Do podobnych zmian może prowadzić wymiana związanych z łańcuchem regulującym jonów magnezu na wapń, która jak należy przypuszczać ma duże znaczenie dla procesu oddziaływania miozyny z aktyną. Zakłada się bowiem, że dla wytworzenia konformacji napiętej kompleksu aktomiozyna-ADP łańcuch regulujący powinien być wysycony jonami wapnia. Potwierdzają to wyniki przeprowadzonych przez nas badań w których wpływ peptydu na hamujące działanie nadmiaru ADP obserwowany był tylko w obecności wysokich stężeń Ca^{2+} . Można zatem założyć, że zarówno fosforylacja RLC jak i wymiana jonów magnezu na wapń spowodują, że ułożenie łańcucha regulującego w domenie regulatorowej główki miozynowej będzie zmienione. To z kolei może pociągnąć za sobą zmianę ułożenia końca-N lekkiego łańcucha istotnego, uniemożliwiając lub pozwalając na jego oddziaływanie z aktyną. Takie cykliczne oddziaływania końca lekkiego łańcucha

istotnego z cienkim filamentem mogą prawdopodobnie regulować lub modulować generowanie siły w mięśniu sercowym.

Podziękowania

Autorka dziękuje Pani Profesor Irenie Kąkol za cenne uwagi dotyczące niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 18 stycznia 1999 r.

Zaakceptowano do druku 6 maja 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM (1993) *Science* **261**: 50-58
2. Rayment I, Holden HM (1994) *TIBS* **19**: 129-134
3. Kwon H, Goodwin EB, Nyitray L, Berliner E, O'Neal-Hennessey E, Melandri FD, Szent-Györgyi AG (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4771-4775
4. Xie X, Harrison DH, Schlichting I, Sweet RM, Kalabokis VN, Szent-Györgyi AG, Cohen C (1994) *Nature (Lond)* **368**: 306-312
5. Lowey S, Trybus KM (1995) *Biophys J* **68**: 120s-127s
6. Wagner PD, Giniger E (1981) *Nature* **292**: 560-562
7. Sivaramakrishnan M, Burke M (1982) *J Biol Chem* **257**: 1102-1105
8. Sweeney HL, Stull JT (1986) *Am J Physiol* **250**: C657-C660
9. Matsuda G (1983) *Adv Biophys* **16**: 185-218
10. Strynadka NCJ, James MNG (1989) *Annu Rev Biochem* **58**: 951-998
11. Schaub MC, Hefti MA, Zuellig RA, Morano I (1998) *Cardiovasc Res* **37**: 381-404
12. Watterson JG, Kohler L, Schaub MC (1979) *J Biol Chem* **254**: 6470-6477
13. Walsh MP, Vallet B, Autric F, Demaille JG (1979) *J Biol Chem* **254**: 12136-12144
14. Adelstein RS, Klee CB (1981) *J Biol Chem* **256**: 7501-7509
15. Morano I, Wankerl M, Bohm M, Erdmann E, Rüegg JC (1989) *Basic Res Cardiol* **84**: 298-305
16. Fearson N, Perry V (1975) *J Biochem* **151**: 99-107
17. Alexis NN, Gratzer WB (1978) *Biochemistry* **17**: 2319-2325
18. Stepkowski D, Kąkol I (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 345-351
19. Sweeney HL, Bowman BF, Stull JT (1993) *Am J Physiol* **264**: C1085-C1095
20. Morano I, Rüegg JC (1986) *Basic Res Cardiol* **81**: 17-23
21. Metzger JM, Greaser ML, Moss RL (1989) *J Gen Physiol* **93**: 855-883
22. Sweeney HL, Stull JT (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 414-418
23. Fitzsimons DP, Bodell PW, Baldwin KM (1989) *J Appl Physiol* **67**: 2447-2453
24. Kopp SJ, Bárány M (1979) *J Biol Chem* **254**: 12007-12012
25. England PJ, Krause EG (1987) *Biomed Biochim Acta* **46**: 369-380
26. Andres J, Moczarska A, Stepkowski D, Kąkol I (1991) *Basic Res Cardiol* **86**: 219-226
27. Herring BP, England PJ (1986) *Biochem J* **240**: 205-214
28. Morano I, Lengsfeld M, Ganten U, Ganten D, Rüegg J (1988) *J Mol Cell Cardiol* **20**: 875-886
29. Liu X, Shao Q, Dhalla NS (1995) *J Mol Cell Cardiol* **27**: 2613-2621
30. Dixon IMC, Lee SL, Dhalla NS (1990) *Circ Res* **66**: 782-788
31. Afzal N, Dhalla NS (1992) *Am J Physiol* **262**: H864-H874
32. Luciani GB, D'Agnolo A, Mazzucco A, Gallucci V, Salviati G (1993) *Am J Physiol* **265**: H1334-1341
33. Mubagwa K (1995) *Cardiovasc Res* **30**: 166-175
34. Jeacocke SA, England PJ (1980) *Biochem J* **188**: 763-768
35. Westwood SA, Perry SV (1981) *Biochem J* **197**: 185-193
36. Akiyama K, Akopian G, Jinadasa P, Gluckman TL, Terhakopian A, Massey B, Bing RJ (1997) *J Mol Cell Cardiol* **29**: 2641-2652
37. Mahaffey K, Raya T, Pennock G, Morkin E, Goldman S (1995) *Circulation* **91**: 794-801
38. Rossmannith GH, Hoh JF, Turnbull L, Ludowyke RJ (1997) *J Physiol Lond* **505**: 217-227
39. Venema RC, Raynor RL, Noland TA, Kuo JF (1993) *Biochem J* **294**: 401-406
40. Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH (1993) *Circ Res* **72**: 757-767
41. Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, Levinson GE, Oldewurtel HA, Ahmad MR, Haider B (1977) *J Clin Invest* **60**: 884-899
42. Pierce GN, Dhalla NS (1981) *J Mol Cell Cardiol* **13**: 1063-1069
43. Pierce GN, Dhalla NS (1985) *Am J Physiol* **248**: E170-E175
44. Dillmann WH (1980) *Diabetes* **29**: 579-582
45. Pagani ED, Alousi AA, Grant AM, Older TM, Dziuban SW Jr, Allen PD (1988) *Circ Res* **63**: 380-385
46. Anderson PA, Malouf NN, Oakeley AE, Pagani ED, Allen PD (1992) *Basic Res Cardiol* **87**(suppl 1): 117-127
47. Alousi AA, Grant AM, Etzler JR, Cofer BR, Vander Bel-Kahn J, Melvin D (1990) *Mol Cell Biochem* **96**: 79-88
48. Morano I (1992) *Basic Res Cardiol* **87**(suppl 1): 129-142
49. Liu X, Takeda N, Dhalla NS (1997) *Metabolism* **46**: 71-75
50. Moczarska A (1997) *Post Biochem* **43**: 120-126
51. Andreev OA, Borejdo J (1997) *Circ Res* **81**: 688-693
52. Sutoh K (1982) *Biochemistry* **21**: 3654-3661
53. Trayer JP, Trayer HR, Levine BA (1987) *Eur J Biochem* **164**: 259-266
54. Moczarska A, Kąkol J (1995) *Biochem Mol Biol Int* **3**: 765-772
55. Morano I, Ritter O, Bonz A, Timek T, Vahl ChF, Michel G (1995) *Circ Res* **76**: 720-725
56. Rarick HM, Oppenorth TJ, von Geldern TW, Wu-Wong JR, Solaro RJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 27039-27043
57. Hoar PE, Mahoney ChW, Kerrick WGL, Montague D (1987) *Pflugers Arch* **410**: 30-36
58. Warshaw D, Trybus K (1991) *Biophys J* **59**: 186a(abstract)
59. Drew JS, Harwalkar VA, Stein LA (1992) *Circ Res* **71**: 1067-1077
60. Siemankowski RF, White HD (1984) *J Biol Chem* **259**: 5045-5053
61. Pate E, Cooke R (1989) *J Muscle Res Cell Motil* **10**: 181-196
62. Nishimura J, van Breeman C (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **165**: 408-415
63. Moczarska A, Kąkol I (1999) *Basic Appl Myol* (praca wysłana do druku)
64. Eisenberg E, Greene LE (1980) *Annu Rev Physiol* **42**: 293-309
65. Bittl JA, Balschi JA, Ingvall JS (1987) *Circ Res* **60**: 871-878
66. Grossman W (1991) *N Engl J Med* **325**: 1557-1564

Endoteliny — w dekadę po ich odkryciu

Endothelins — one decade after discovery

KRYSTIAN KALETHA¹, ZYGMUNT CHODOROWSKI², PAWEŁ DUTKA³, GABRIELA NAGEL-STARCZYNOWSKA⁴

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Struktura i biochemia endotelin
 - II-1. Struktura
 - II-2. Biosynteza i degradacja
 - II-3. Enzym konwertujący endoteliny
 - II-4. Receptory endotelinowe
 - II-5. Wewnątrzkomórkowy układ efektorowy
- III. Fizjologia endotelin
- IV. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: ANP-przedsionkowy peptyd (czynnik) natriuretyczny (*atrial natriuretic peptide*), ECE-enzym konwertujący endoteliny (*endothelin converting enzyme*), ETs(1-21)-endoteliny 21 aminokwasowe, ETs(1-31)-endoteliny 31 aminokwasowe, EDRF-śródbłonkowy czynnik rozkurczowy (*endothelial derived relaxing factor*), TGFβ — transformujący czynnik wzrostowy β (*transforming growth factor β*)

I. Wprowadzenie

Minęło dziesięć lat, od czasu kiedy na łamach *Nature* [1] ukazał się artykuł Yanagisawa i wsp. z ośrodka badawczego w Tsukuba, opisujący sekwencję aminokwasową silnie obkurczającego mięśnie gładkie naczyń krwionośnych tzw. śródbłonkowego czynnika naczynio-skurczowego (*endothelium derived constricting factor* — EDCF) [2]. Czynnikiem tym okazał się 21 aminokwasowy peptyd, nazwany przez odkrywców endoteliną. Niedługo potem [3, 4] u ssaków (szczura, wieprza), w tym także człowieka, znaleziono homologiczne sekwencje nukleotydowe kodujące dwie dodatkowe izoformy odkrytego peptydu, nazwane endoteliną 2 i 3.

Odkrycia te wywołały ogromne zainteresowanie fizjologów i fizjopatologów oczekujących, że przy-

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure and biochemistry of endothelins
 - II-1. Structure
 - II-2. Biosynthesis and degradation
 - II-3. Endothelins converting enzyme
 - II-4. Endothelins receptors
 - II-5. Intracellular effector system
- III. Physiology of endothelins
- IV. Summary

czynią się one do wyjaśnienia patomechanizmu pierwotnego, a także wtórnych postaci nadciśnienia tętniczego. Od tego czasu problematyka endotelin stała się jednym z wiodących tematów badawczych na całym świecie. Ich owocem jest wielka liczba opublikowanych prac doświadczalnych, obejmujących różnorakie aspekty fizjologicznej i fizjopatologicznej roli endotelin. Celem niniejszego artykułu jest zbiorcze przedstawienie poglądów na temat fizjologicznej roli endotelin, prezentowanych obecnie, w dziesięć lat po ich odkryciu.

II. Struktura i biochemia endotelin

II-1. Struktura endotelin

Endoteliny [ETs(1-21)] stanowią rodzinę trzech 21 aminokwasowych peptydów wykazujących charakterystyczne podobieństwa strukturalne. Każdy z nich posiada po dwa wewnętrzne wiązania dwusiarczkowe [cystyna¹-cystyna¹⁵ (C¹-C¹⁵) i cystyna³-cystyna¹¹ (C³-C¹¹)], aminokwasy polarne w pozycji 8-10 oraz hydrofobowy C-koniec. Endotelina-2 [ET-2(1-21)] i endotelina-3 [ET-3(1-21)] różnią się od endoteliny-1 [ET-1(1-21)] odmiennym składem aminokwasowym (Ryc. 1). Strukturę podobną do endotelin [ETs(1-21)] posiada również grupa peptydów wyizolowanych z jadu afrykańskiego węża *Atractaspis engaddensis* zwanych sarafotoksynami [5, 6].

Aktywność biologiczna endotelin, jak wszystkich białek, wynika z ich struktury. Dla zachowania ak-

¹Prof. dr hab., ²Prof. dr hab., ³Lek. med., ⁴Dr nauk przyrodniczych,

^{1,3,4}Katedra i Zakład Biochemii A.M. w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk,

²Klinika Chorób Wewnętrznych i Zatruc A.M. w Gdańsku, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

tywności biologicznej endotelin istotne okazały się zarówno wewnętrzne wiązania dwusiarczkowe jak i obecność karboksykońcowego tryptofanu [7].

II-2. Biosynteza i degradacja endotelin

U człowieka i u innych ssaków (szczur, wieprz, pies), endoteliny są produktami ekspresji trzech niezależnych genów, zlokalizowanych w trzech różnych chromosomach [3]. Spośród nich endotelina-1(1-21), wytwarzana przez komórki śródbłonka naczyniowego, jest izoformą o najlepiej poznanych właściwościach biologicznych.

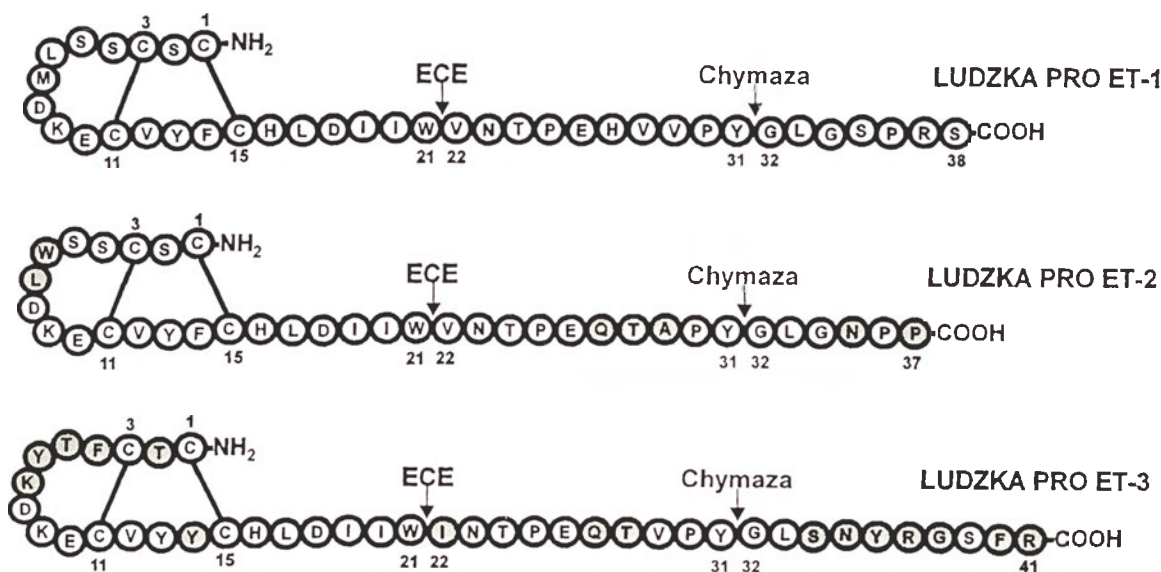
Gen kodujący ludzką endotelinę-1 zlokalizowany jest w chromosomie 6 [3, 4]. Liczy on ponad 6800 par zasad i w swym rejonie promotorowym zawiera sekwencje regulacyjne, odpowiadające (między innymi) na pobudzenie przez estry forbolowe oraz tzw. czynnik jądrowy 1. Za pośrednictwem tego ostatniego, czynnik wzrostowy β (TGF- β) stymuluje transkrypcję genu kodującego ET-1(1-21) [4].

RNA informacyjny (mRNA) ludzkiego genu ET-1 liczy ponad 2000 nukleotydów. Za jego stabilność odpowiada specyficzna, nie ulegająca translacji sekwencja nukleotydowa końca 3', bogata w kwas adenylowy i urydylowy. U człowieka geny endotelin, w obszarze kodującym biologicznie aktywny produkt ostateczny, wykazują wysoką homologię nukleotydową [4].

Pierwotnymi produktami białkowymi ekspresji genów kodujących endoteliny, są liczące nieco ponad 200 aminokwasów (212 aminokwasów u

człowieka), preproendoteliny (Ryc. 2). Białka te nie wykazują znaczącej funkcji biologicznej i podlegają dalszej, dwuetapowej obróbce posttranslacyjnej [5-9]. W pierwszym etapie tej obróbki, w wyniku działania specyficznej „dwuzasadowej” endopeptydazy, rozbijającej wiązania lizyna⁵¹-arginina⁵² oraz arginina⁹²-arginina⁹³, białka te ulegają przekształceniu na mniejsze, około 40 aminokwasowe (38, 37 i 41 aminokwasowe, odpowiednio w przypadku ludzkiej ET-1, ET-2 i ET-3) peptydy wtórne, zwane proendotelinami, lub „wielkimi endotelinami” („*big endothelins*”). W drugim etapie obróbki posttranslacyjnej, w wyniku działania specyficznej endopeptydazy obojętnej (enzymu konwertującego endoteliny — ECE), rozbijającej wiązanie peptydowe tryptofan²¹-walina²² (W²¹-V²²) — w przypadku ET-1 i ET-2, lub tryptofan²¹-izoleucyna²² (W²¹-I²²) — w przypadku ET-3, proendoteliny przekształcane są (Ryc. 1) w biologicznie aktywne formy dojrzałe — endoteliny [ETs (1-21)]. Równocześnie w trakcie tego procesu odszczepiony zostaje nieaktywny fragment C końcowy [6].

Niedawno opublikowano artykuł [11] wskazujący na to, że enzym konwertujący endoteliny (ECE) nie jest jedynym, który specyficznie trawi ludzkie proendoteliny. Okazało się bowiem, że peptydy te mogą być trawione również przez trypsynopodobną proteinazę serynową komórek tłuszcznych tkanki łącznej oskrzeli i naczyń krwionośnych — chymazę (EC 3.4.21.39). Enzym ten hydrolizuje specyficznie wiązanie peptydowe tyrozyna³¹-glicyna³² (Y³¹-G³²) (Ryc. 1), wytwarzając w ten sposób nową



Ryc. 1. Struktura pierwszorzędowa ludzkich proendotelin. Kółka zaciemnione ilustrują aminokwasy inne od znajdujących we wzorcowej proendotelinie-1. Enzym konwertujący (ECE) oraz chymaza trawią specyficznie mało aktywne proendoteliny, tworząc odpowiednio rodzinę 21 aminokwasowych i 31 aminokwasowych, biologicznie aktywnych endotelin „dojrzałych”.

generację endotelin 31 aminokwasowych. Endoteliny te — [ETs(1-31)], oddziałują na tkankę mięśniową gładką równie silnie obkurczająco jak endoteliny 21 am. kwasowe, lecz oddziaływanie to dotyczy w głównej mierze mięśniówki oskrzeli [12]. Należy przy tym wyraźnie zaznaczyć, że efekty biologiczne wywierane przez ETs (1-31) nie wynikają z ich wtórnej obróbki proteolitycznej przez enzym konwertujący endoteliny (ECE), chymotrypsyno-podobne proteazy lub też inne, wrażliwe na hamujące działanie fosforamidonu metaloendopeptydazy. Wśród endotelin 31 aminokwasowych najsilniej obkurcza oskrzela (działanie bronchospastyczne) endotelina ET-2(1-31). Efekt skurczowy wywierany przez ten peptyd jest porównywalny z działaniem endoteliny ET-1(1-21), lecz silniejszy od efektu wywieranego przez ET-2(1-21). Z doświadczeń porównawczych przeprowadzonych na wyizolowanych fragmentach tętnic wieńcowych wieprza wynika, że ET-1(1-31) w porównaniu z ET-1(1-21), obkurcza naczynia (działanie wazospastyczne) nieco słabiej i wolniej. Efekt ten nie jest uwarunkowany zachowaniem ciągłości śródbłonka naczyniowego. Endoteliny (1-31) znajdowane są nie tylko w płucach — duże ich ilości znaleziono również w ludzkim sercu [11, 12].

W komórkach śródbłonka naczyniowego nie znaleziono większych ilości ziarnistości, które mogłyby świadczyć o wewnątrzkomórkowym magazynowaniu endotelin. Synteza endotelin „wielkich“ (proendotelin) wydaje się być zatem regulowana głównie na poziomie transkrypcji [13]. W regulacji tej biorą udział takie bodźce stymulujące jak: hormony (angiotensyna II, katecholaminy, wazopresyna), specyficzne peptydy (neuropeptyd Y, cytokiny, TGF β), cyklosporyna, trombina, a także czynniki mechaniczne (rozciąganie naczyń) oraz niedokrwienie, któremu towarzyszy hipoksja lub anoksja. Bodźcami hamującymi transkrypcję endotelin jest czynnik rozkurczowy naczyń — EDRF (tlenek azotu), prostacyklina, przedsionkowy peptyd (czynnik) natriuretyczny (ANP), a także heparyna (Ryc. 2). mRNA dla preproET-1 znajdujący jest głównie w komórkach śródbłonka naczyń, dla preproET-2 i preproET-3 natomiast, w mięśniu sercowym, jelitach, płucach i nerkach [6].

Wytworzona przez komórki śródbłonka naczyniowego ET-1(1-21) jest uwalniana do krwiobiegu i przestrzeni okołokomórkowej ścian naczyń. Angiotensyna II, wazopresyna oraz trombina stymulują sekrecję zsyntetyzowanej endoteliny. Tlenek azotu, prostacyklina oraz peptyd natriuretyczny sekrecję tę hamują [5, 13, 14].

Okres półtrwania ET-1(1-21) jest bardzo krótki i liczony jest w minutach [15]. Głównymi narządami metabolizującymi endoteliny są nerki i płuca. W płucach eliminacja ET-1(1-21) dokonuje się na drodze wiązania receptorowego i następującej po tym internalizacji [15]. W kłębuszkach nerkowych, ze względu na swą niewielką masę cząsteczkową (ok. 2.5 kDa) ET-1(1-21) ulega przesączeniu, a następnie (w obrębie kanalików proksymalnych) degradacji.

Degradacja endoteliny-1(1-21) przebiega dwuetapowo z udziałem wrażliwej na fosforamidon endopeptydazy obojętnej. W etapie pierwszym, w cząsteczce ET-1(1-21) rozbiciu ulega wiązanie peptydowe seryna⁵-leucyna⁶ (S⁵-L⁶). W wyniku takiej hydrolizy powstają dwa pochodne fragmenty peptydowe, z których większy wykazuje pewną aktywność biologiczną. W etapie następnym, rozbiciu ulega wiązanie peptydowe pomiędzy kwasem asparaginyowym¹⁸ a izoleucyną¹⁹ (D¹⁸-I¹⁹). W odróżnieniu od ET-1(1-21), ET-2(1-21) i ET-3(1-21) ulegają jedynie proteolizie jednoetapowej [6].

Sarafotoksyny są znacznie bardziej odporne na proteolizę, co tłumaczy po części ich silne działanie toksyczne [6].

II-3. Enzym konwertujący endoteliny

Enzym konwertujący endoteliny (ECE) wykazuje około 10 krotnie wyższą aktywność w stosunku do proET-1(1-21), aniżeli w stosunku do proET-3(1-21) [16]. Enzym ten został wyizolowany i dobrze scharakteryzowany. Występuje on w postaci dwu, kodowanych przez różne geny izoenzymów: ECE-1 i ECE-2 [17]. Izoenzymy te są obojętnymi metalodoproteazami, wrażliwymi na działanie fosforamidonu i związków chelatujących (EDTA, 1,10-fenantrolina), lecz niewrażliwymi na działanie typowych inhibitorów obojętnych metaloproteaz, takich jak kaptokryl czy kelatorfan. Izoenzym ECE-1 występuje w formie dwu alternatywnie składowanych odmian, wykazujących jednakowe właściwości, lecz nieco odmienną lokalizację tkankową i subkomórkową [17-19]. Odmiana ECE-1 α , znajdująca jest w aparacie Golgiego komórek „wytwarzających”, tj. komórek śródbłonkowych naczyń, gdzie odpowiedzialna jest prawdopodobnie za wewnątrzkomórkowe „dojrzenie” ET-1(1-21). Po przetransportowaniu do lizosomów, ECE-1 α ulega szybkiej degradacji. Odmiana ECE-1 β znajdująca jest natomiast w komórkach „efektorowych”, tj. komórkach mięśni gładkich naczyń, gdzie powiązana z błoną cytoplazmatyczną komórki uczestniczy w wytwarzaniu ET-1(1-21) [14]. Izoenzym ECE-1 wykazuje wyraźnie większą

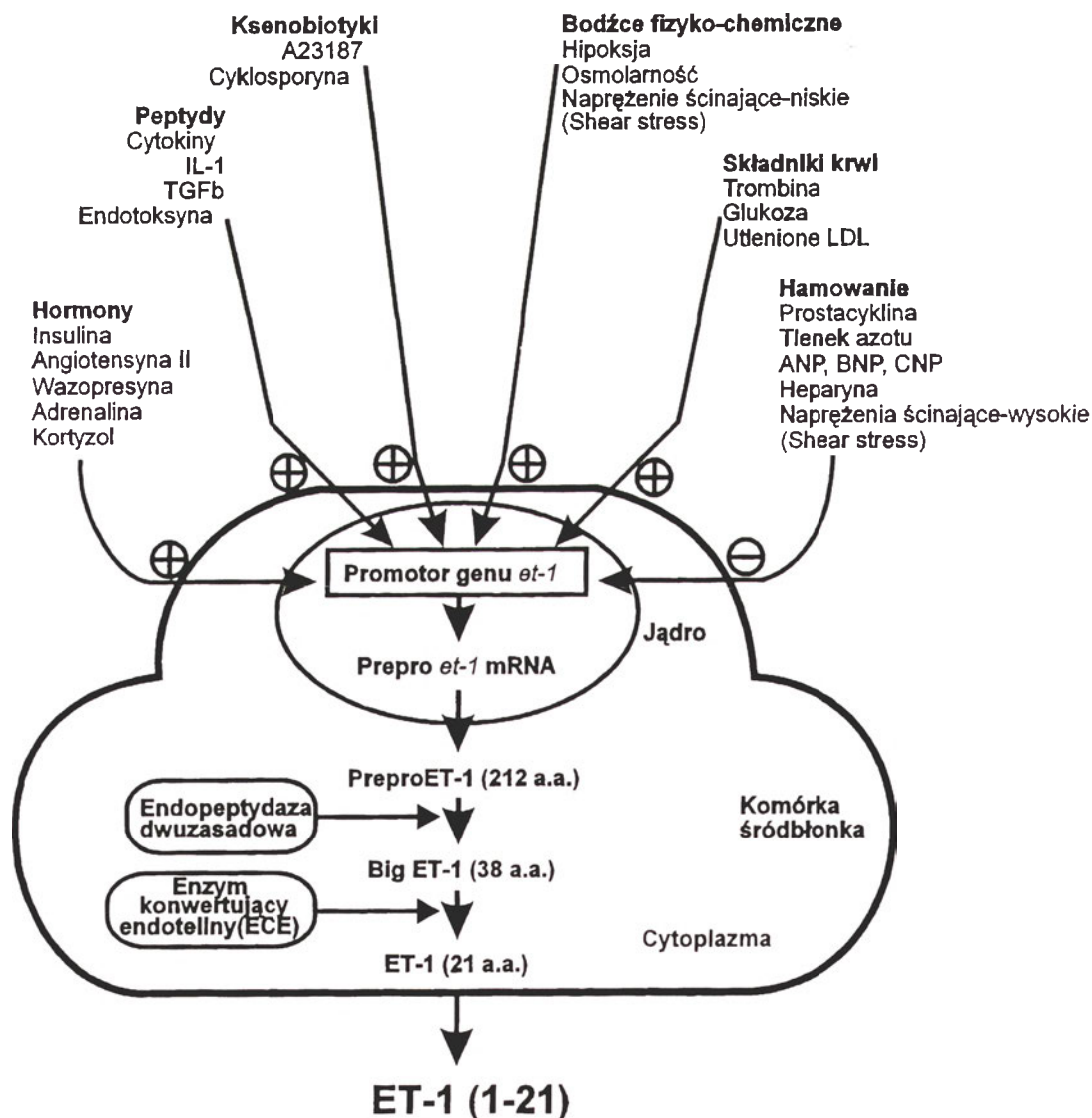
specyficzność substratową do proET-1(1-21), aniżeli do pozostałych proendotelin. Izoenzym ECE-2 jest strukturalnie podobny do ECE-1 i tak jak on hamowany jest przez fosforamidon. W przeciwieństwie do ECE-1, ECE-2 wykazuje większą specyficzność substratową w stosunku do proET-2 i proET-3, aniżeli do proET-1. ECE-2 jest również powiązany z błoną cytoplazmatyczną komórki, lecz swą optymalną aktywność wykazuje w środowisku lekko kwaśnym (pH 5.5) [17, 18].

W roku 1997 wykazano dodatkową aktywność peptydazową enzymu konwertującego. Drugim po proendotelinach, specyficznym substratem dla enzymu konwertującego okazała się nieoczekiwanie bradykinina [20]. Hydroliza bradykininy katalizowana przez ECE zachodzi pomiędzy proliną⁷ i fenyloalaniną⁸. Prowadzi ona do rozbicia wyjściowego nona-

peptydu na fragmenty siedmio- i dwuaminokwasowe i hamowana jest przez fosforamidon oraz EDTA. Nowo odkryta zdolność ECE do rozkładania bradykininy może mieć dodatkowe znaczenie fizjologiczne. Bradykina, produkt rozkładu kininogenu, stymulując syntezę wazodylatacyjnych prostaglandyn (PGE₂) jest równocześnie substratem dla enzymu konwertującego angiotensynę (ACE), rozkładającego silnie naczynioskurczową angiotensynę II. Przyspieszenie rozkładu bradykininy prowadzi w konsekwencji do wzrostu oporów naczyń obwodowych i ogólnego podwyższenia ciśnienia w układzie krążenia.

II-4. Receptory endotelinowe

Metodami biologii molekularnej wyróżniono do tej pory dwa typy receptów endotelinowych: ETA



Ryc. 2. Czynniki regulujące biosyntezę ET-1(1-21). Oznaczenia: interleukina-1 (IL-1), transformujący czynnik wzrostowy beta (TGFβ), przedsiönkowy peptyd natriuretyczny (ANP), mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP), peptydy natriuretyczne typu C (CNP), lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), aminokwasy (a.a.), wg. [32], zmodyfikowane.

[21] i ETB [22]. U człowieka geny kodujące te receptory zlokalizowane są w obrębie chromosomu 13 (gen dla receptora ETA) i 4 (gen dla receptora ETB). Wykazują one około 60% homologii, a zasadnicze różnice w sekwencji aminokwasowej dotyczą części N-końcowej receptora. Obydwa receptory sprzężone są z układem białek G i składają się z siedmiu przezłonowych domen, pozakomórkowego końca -N, oraz wewnątrzkomórkowego (cytoplazmatycznego) końca -C [6, 8, 21, 22]. Białko receptora ETA liczy 427 aminokwasów i posiada masę cząsteczkową około 48.5 kDa. Receptor ten wiąże specyficznie endoteliny ET-1(1-21) z powinowactwem: ET-1 > ET-2 > ET-3. Selektywnym antagonistą i blokerem receptora ETA jest związek o nazwie BQ-123. Białko receptora ETB liczy 415 aminokwasów, posiada masę cząsteczkową około 46.9 kDa i wykazuje jednakowe powinowactwo do wszystkich endotelin (ET-1=ET-2=ET-3). Antagonistą i blokerem receptora ETB jest związek o nazwie BQ-788. Obydwa receptory w swych regionach N-końcowych posiadają miejsca potencjalnej N-glikozylacji, zaś w regionach C-końcowych miejsca potencjalnej fosforylacji przy udziale kinaz serynowo-treoninowych [6, 23, 24]. mRNA kodujący białko obydwu receptorów znajduje się w różnych tkankach szczura i człowieka, takich jak serce, płuca, nerki, nadnercza i mózg. W komórkach śródbłonna naczyniowego zachodzi jedynie ekspresja genu kodującego receptor ETB. W komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych ma miejsce ekspresja genów kodujących obydwie receptory (Ryc. 3). Selektyny dla ET-1(1-21) receptor ETA znajdujący się w błonie cytoplazmatycznej komórek mięśni gładkich i tu odpowiedzialny jest za wywołanie skurczu naczyń. Nieselektywny dla ET-1(1-21) receptor ETB występuje przypuszczalnie w dwóch odmianach. Głównym miejscem ekspresji jednej z jego odmian (receptor ETB1) jest błona cytoplazmatyczna komórek śródbłonkowych. Ekspresja drugiej odmiany receptora (ETB2) jest mniej intensywna i dotyczy błony cytoplazmatycznej komórek mięśni gładkich naczyń.

Aktywacja receptorów ETB1 komórek śródbłonna naczyniowego uwalnia z nich substancje rozkurczające tkankę mięśniową gładką naczyń (tlenek azotu, prostacyclinę PGI₂) i prowadzi w efekcie do rozkurczu naczyń [10, 23]. W przeciwieństwie do tego aktywacja receptorów ETA komórek mięśni gładkich wywołuje silny i długotrwały skurcz naczyniowy (Ryc. 3). Za wywołanie efektu wazokonstrykcyjnego odpowiadać mogą w pewnych warunkach również zlokalizowane na powierzchni komórek mięśni gładkich receptory ETB2 [10, 23-25].

Wywołane w ten sposób efekty są jednak zmienne i zależą od rodzaju i wielkości naczyń.

Liczba receptorów endotelinowych nie jest stała. Zwiększa się ona w wyniku niedokrwienia oraz pod wpływem cyklosporyny, zmniejsza natomiast pod wpływem angiotensyny II, estrów forbolowych, a także pod wpływem samej endoteliny-1 [24].

Wstępne rezultaty badań izotopowych wskazują na to, że ET-1(1-31) i ET-1(1-21) nie współzawodniczą ze sobą w wiązaniu się z opisanymi powyżej receptorami endotelinowymi [11, 12]. W efektach fizjologicznych endotelin [ETs(1-31)] pośredniczą prawdopodobnie inne, być może podobne do ETA receptory [12, 26].

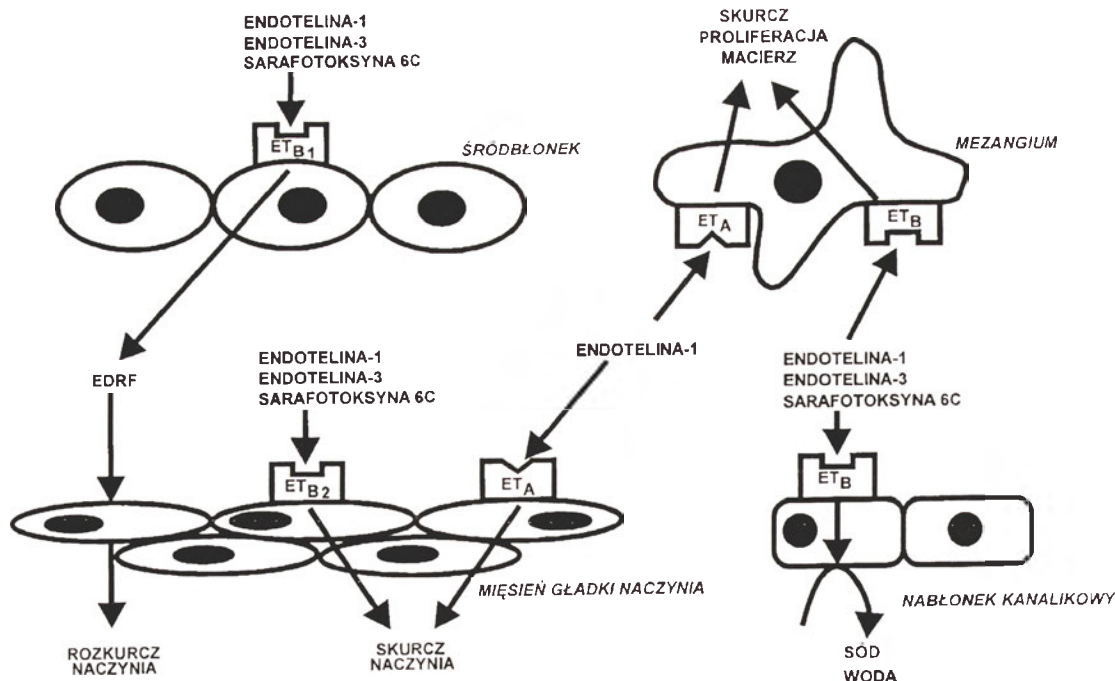
II-5. Wewnątrzkomórkowy układ efektorowy

Wazospastyczne działanie ET-1(1-21) powiązane jest ze zwiększonym dokomórkowym napływem jonów wapnia. Leki blokujące wolne kanały wapniowe, jak np. nifedypina, częściowo zapobiegają skurczowi naczyń wywołanemu przez endoteliny [5, 6].

Wywierane przez endoteliny efekty fizjologiczne związane są ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i dokonują się przy udziale różnych systemów przekąźnikowych [9, 10, 27]. W pierwszym etapie cząsteczka ET-1(1-21) wiąże się z receptorami błonowymi ETA (komórek mięśni gładkich), lub ETB (komórek śródbłonkowych) i za pośrednictwem kompleksu białek G (Gs — w przypadku komórek mięśni gładkich lub Gi — w przypadku komórek śródbłonkowych) uaktywnia fosfolipazy błonowe C i D. Zaktywowane enzymy hydrolizują wchodzące w skład błony komórkowej fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP₂) i fosfatydylocholinę (PC), uwalniając z nich związki sygnałowe takie jak: inozytolo-1,4,5-trójfosforan (IP₃), diacyloglicerol (DAG) oraz kwas fosfatydowy (PA). Powstałe w ten sposób związki, poprzez wiązanie się z receptorami sarkoplazmatycznych kanałów wapniowych i uwalnianie nagromadzonego tam wapnia (IP₃), albo też poprzez aktywację kinazy białkowej C (DAG i PA), przygotowują aparat kurczliwy komórki do skurczu (Ryc. 4).

Zachodząca niezależnie fosforylacja kanałów wapniowych błony cytoplazmatycznej (ROC — *Receptor Operated Channels*), wywołując dokomórkowy napływ wapnia pozakomórkowego, podnosi dodatkowo stężenia wapnia w cytoplazmie i wzmacnia przez to fizjologiczną odpowiedź komórki [27, 28].

Wydaje się, że w podobny sposób przebiega wewnątrzkomórkowa sygnalizacja bronchospastycznego oddziaływania endotelin (1-31) [26].



Ryc. 3. Hipotetyczny model funkcjonowania receptorów endotelinowych w łożysku naczyniowym oraz kłębuszkach i kanalikach nerkowych. Przyłączenie się ET-1(1-21) do receptorów ET_A (i prawdopodobnie również do receptorów ET_{B2}) zlokalizowanych w błonie cytoplazmatycznej komórek mięśni gładkich wywołuje skurcz naczyń. Związanie się ET-1(1-21) z receptorami ET_{B1} zlokalizowanymi w błonie cytoplazmatycznej komórek śródbłonkowych, powoduje uwolnienie z tych komórek substancji z grupy EDRF i w efekcie rozkurcz naczyń. Związanie się ET-1(1-21) z receptorami ET_A i ET_B komórek mezangium kłębuszków nerkowych powoduje jego skurcz i rozrost. Przyłączenie się ET-1(1-21) do receptorów ET_B komórek nabłonkowych kanalików nerkowych wywołuje efekt sodo- i moczopędny. ET-1(1-21) posiada jednakowe powinowactwo do receptorów ET_A i ET_B; ET-3(1-21) wiąże się preferencyjnie z receptorami ET_B, wg. [23], zmodyfikowane.

III. Fizjologia endotelin

Głównym obszarem wazospastycznego oddziaływania endotelin ETs(1-21) jest tętnice, oraz w mniejszym stopniu, żyłne, łożysko naczyniowe. Podanie dożylnie zwierzęciu ET-1(1-21) w dawce jednorazowej, powoduje wyraźny (około 10-krotnie silniejszy od angiotensyny II) i długotrwały skurcz naczyń systemowych. Skurcz ten osiąga swe maksimum po upływie 15- 45 minut od podania peptydu i poprzedzony jest zawsze wstępną fazą rozkurczową. Początkowemu spadkowi ciśnienia tętniczego towarzyszy wzrost częstości rytmu serca oraz wzrost jego objętości wyrzutowej [29-31]. W okresie wzrostu ciśnienia tętniczego częstość rytmu oraz objętość wyrzutowa serca ulegają obniżeniu [31].

W surowicy krwi ludzi zdrowych stężenie biologicznie aktywnej ET-1(1-21) jest niskie i zawiera się w przedziale 0.3-3.0 pM [32]. Nie osiąga ono zatem wartości progowej równej kilkudziesięciu pikomolom, koniecznej dla wywołania układowego (tj. endokrynnego) efektu wazospastycznego [29-31]. W przestrzeniach pomiędzy śródbłonkiem a mięśniówką naczyniową, stężenie endoteliny-1(1-21) jest jednak z reguły znacznie wyższe, co umożliwia wywoływanie przez nią efektów (skurczów naczy-

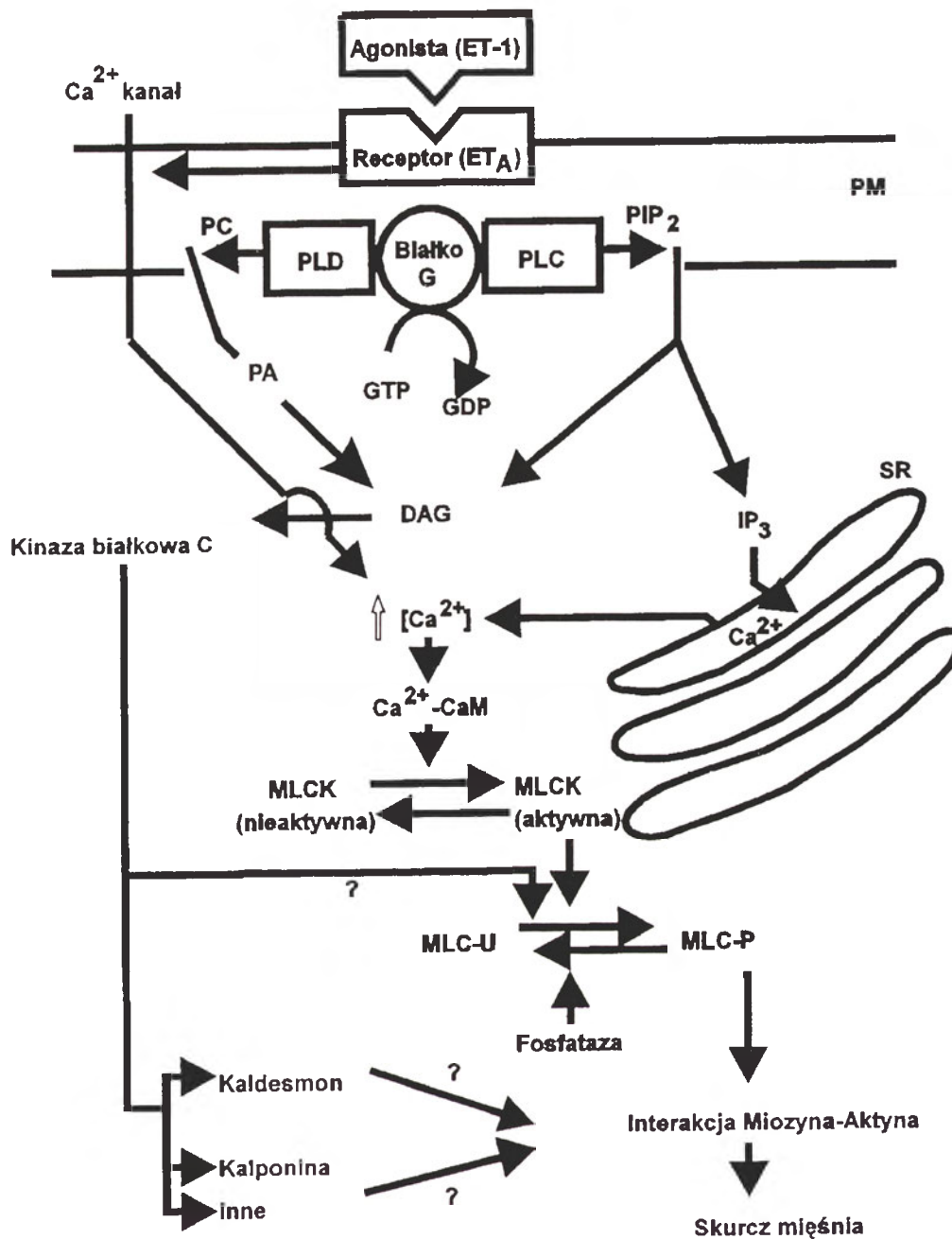
niowych) lokalnych [31, 32]. W warunkach zdrowia endotelina-1(1-21), ze względu na zakres swego oddziaływania, przypomina zatem substancję o oddziaływaniu auto- i (lub) parakrynnym, aniżeli endokrynnym [23, 24, 31-33].

Mechanizmy regulujące tkankowe stężenie endotelin są prawdopodobnie różnorodne, choć nie do końca poznane (Ryc. 2). Krótki czas półtrwania mRNA oraz półtrwania dojrzałej, biologicznie aktywnej endoteliny ET-1(1-21) [29] wskazują na to, że regulacja ta jest precyzyjna i ciągła. Usuwanie ET-1(1-21) z krwiobiegu zachodzi głównie w nerkach i płucach [9, 32], co jest wynikiem największej w tych tkankach aktywności endopeptydaz degradujących [24, 32, 33].

Siła efektu naczynioskurczowego wywieranego przez ET-1(1-21) jest zmienna i w znacznym stopniu zależy od ilości uwalnianych przez śródbłonek naczyniowy substancji rozkurczających z grupy EDRF, takich jak tlenek azotu i prostacyklina.

Endotelina jest silnym stymulatorem wydzielania tych substancji i wspólnie z nimi (Ryc. 3) moduluje napięcie ścian naczyń krwionośnych [14, 27, 32-34].

W nerkach synteza ET-1(1-21) dokonuje się w śródbłonku naczyń nerkowych (doprowadzających, odprowadzających i prostych), naczyń kłębuszków

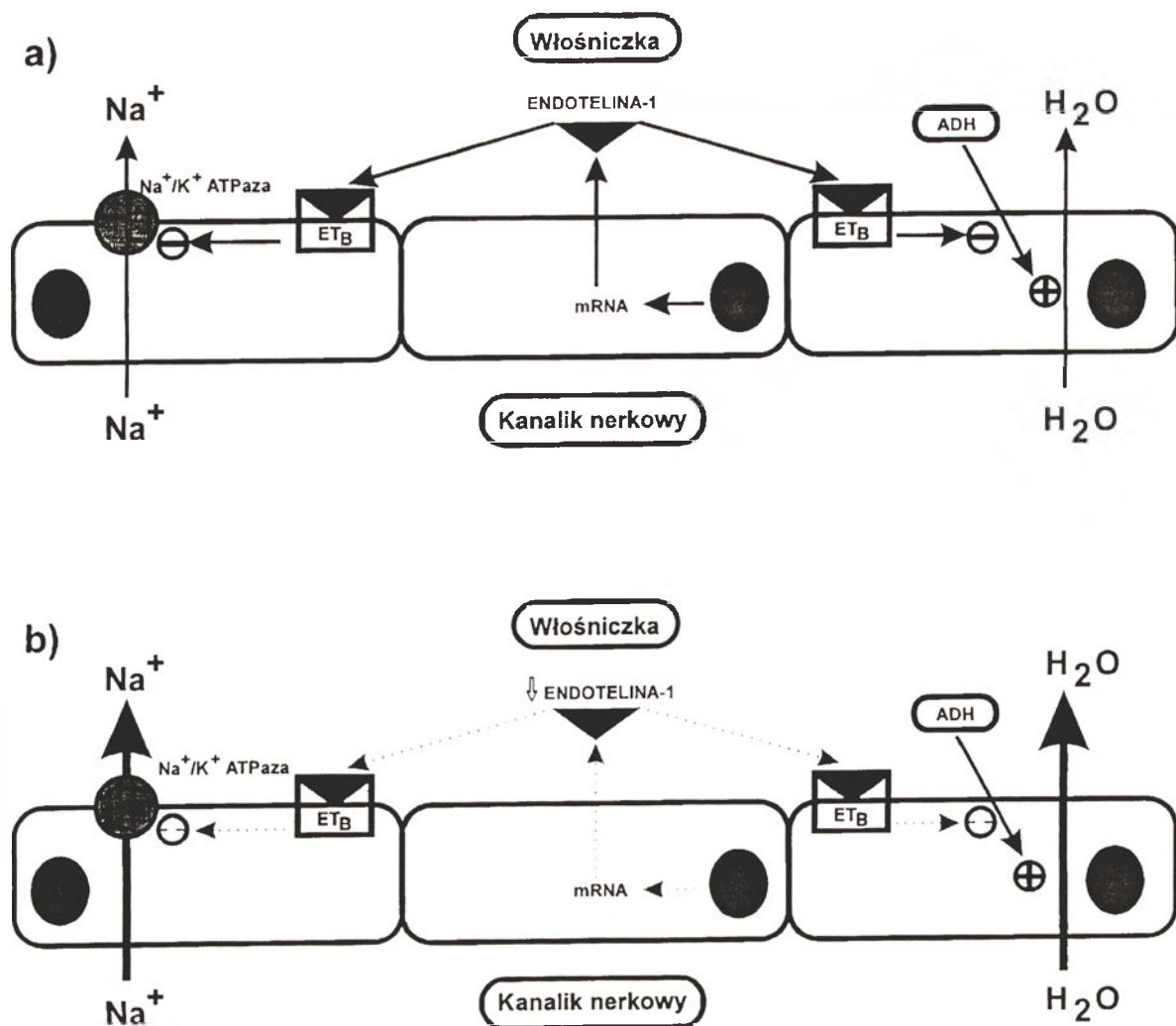


Ryc. 4. Model skurczu mięśnia gładkiego, indukowanego działaniem ET-1(1-21). Oznaczenia: kalmodulina (CaM), diacyloglicerol (DAG), inozytolo-1, 4, 5-trójfosforan (IP₃), kinaza lekkiego łańcucha miozyny (MLCK), lekki łańcuch miozyny (MLC): nieufosforylowany (MLC-U) i ufosforylowany (MLC-P), fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloinozytolo-4, 5-difosforan (PIP₂), fosfolipaza C (PLC), fosfolipaza D (PLD), retikulum sarkoplazmatyczne (SR), błona plazmatyczna (PM), wg. [27], zmodyfikowane.

nerkowych oraz w nabłonku kanalików zbiorczych. W tych ostatnich jest ona niezależna od hormonów regulujących wchłanianie zwrotne, takich jak wazopresyna, przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP) czy bradykinina. U ludzi zdrowych endoteliny wydalone są z moczem w ilości 20-90 ng dziennie [30, 31].

Podana do tętnicy nerkowej ET-1(1-21) oddziałuje na narząd głównie poprzez receptory ETB (u szczura) lub ETA (u człowieka) [24, 25]. Za ich pośrednictwem, w wyniku obkurczenia doprowa-

dzających i odprowadzających tętniczek kłębuszkowych, dochodzi do znaczącego zmniejszenia przepływu krwi przez nerki i w efekcie spadku filtracji kłębuszkowej nerek. Drugim, poza naczyniami, miejscem działania ET-1(1-21) w nerkach są kanaliki nerkowe. Oddziałując na licznie obecne w komórkach nabłonka kanalików nerkowych receptory, endotelina-1(1-21) zwiększa nerkową utratę sodu i wody. Zebrane dowody doświadczalne [23, 25] wskazują na to, że oddziaływanie powyższe dokonuje się na drodze następujących mechanizmów (Ryc.



Ryc. 5. Wpływ ET-1 (1-21) na reabsorbcję sodu i wody u zwierząt: normotensyjnych (a) i hipertensyjnych (b). Wytwarzana przez nabłonek kanalików nerkowych ET-1(1-21), działając na nabłonkowe receptory ET_B, w warunkach fizjologicznych (a) hamuje reabsorbcję sodu (obniżając aktywność ATP-azy sodowo-potasowej) i wody (obniżając wydzielanie hormonu antydiuretycznego — ADH). Efektem takiego działania jest wydalanie sodu i wody przez nerki. W warunkach patologicznych (nadciśnienie tętnicze) (b), wskutek niedostatecznej biosyntezy ET-1(1-21), retencja sodu i wody w nerkach ulega zwiększeniu, wg. [32], zmodyfikowane.

5): 1) zmniejszenia reabsorbcji wody, jako wynik zahamowania aktywności ATP-azy sodowo-potasowej w komórkach nabłonka kanalików nerkowych (bliższych i zbiorczych), 2) zmniejszenia reabsorbcji wody poprzez hamowanie wpływu hormonu antydiuretycznego (ADH) na przepuszczalność osmotyczną, 3) zmiany ilości wytwarzanej endoteliny i liczby jej tkankowych receptorów (ilość wytwarzanej endoteliny-1, a także liczba jej kanalikowych i kłębuszkowych receptorów zmniejsza się wraz ze spadkiem objętości płynów w układzie naczyniowym).

Niedotlenienie pęcherzyków płucnych, w szczególności trwające dłużej, powoduje uszkodzenie komórek śródbłonkowych naczyń [35], co zaburza delikatną równowagę wytwarzanych przez nie substancji skurczowych i rozkurczowych na korzyść tych pierwszych. W rezultacie dochodzi do wzrostu stężenia

ET-1(1-21) w krwiobiegu małym i w konsekwencji, do postępującego zwężenia łożyska naczyniowego. Tak interpretuje się obecnie udział endoteliny w patogenezie samoistnego nadciśnienia płucnego [33-37].

IV. Podsumowanie

Zaobserwowane fakty wskazują wyraźnie na istotną rolę, jaką w utrzymaniu prawidłowego, fizjologicznego napięcia tkanki mięśniowej gładkiej naczyń i oskrzeli spełniają endoteliny. Razem z innymi wydzielanymi przez śródbłonek naczyniowy substancjami o działaniu auto- i parakrynnym (tlenek azotu, prostacyklina), stanowią one ważny element lokalnej gry hormonalno-nerwowej, wyznaczającej wypadkowe, układowe ciśnienie tętnicze. Wszelkie uszkodzenia śródbłonka naczyniowego, obniżając

ilość produkowanych tam substancji rozkurczowych, uwrażliwiają tkankę mięśniową gładką na czynnik obkurczający działający na krążących w krwiobiegach endotelin. Działanie takie, w dłuższej perspektywie czasowej prowadzić może do wystąpienia utrwalonego, niewrażliwego na działanie środków rozkurczowych, układowego nadciśnienia tętniczego.

Podziękowania

Autorzy dziękują Panu Profesorowi Leonowi Zelewskiemu za przeczytanie pracy i cenne uwagi krytyczne.

Artykuł otrzymano 11 marca 1999 r.
Zaakceptowano do druku 19 lipca 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) *Nature (London)* **332**: 411-415
2. Rubanyi G, Vanhoutte PM (1985) *J Physiol* **364**: 45-56.
3. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Tomoh M (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2863-2867.
4. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T (1989) *J Biol Chem* **264**: 14954-14959.
5. Rubanyi GM, Botello PLH (1991) *FASEB J* **5**: 2713-2720.
6. Lotersztajn S (1993) *Med/Sci* **9**: 1084-1093.
7. Hiley CR (1989) *Trends Pharmacol Sci* **10**: 47-49
8. Webb DJ (1991) *Trends Pharmacol Sci* **12**: 43-46.
9. Sakurai T, Goto K (1993) *Drugs* **46**: 795-804.
10. Takuwa Y (1993) *Endocrine J* **40**: 489-506
11. Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H (1997) *J Immun* **159**: 1987-1992.
12. Kishi F, Minami K, Okishima N, Murakami M, Mori S, Yano M, Niwa Y, Nakaya Y, Kido H (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 387-390
13. Simonson MS, Dunn MJ (1990) *Hypertension Suppl* **1** 15: I-1-I12
14. Luscher TF (1993) *Eur J Clin Invest* **23**: 670-685
15. Sirvio ML, Mersarinne K, Saijonmak K, Fyrquist F (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **167**: 1191-1195
16. Oppenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K (1992) *FASEB J* **6**: 2653-2659
17. Shimada K, Tsakahashi M, Ikeda M, Tanzawa K (1995) *FEBS Lett* **371**, 140-144
18. Emoto N, Yanagisawa M (1995) *J Biol Chem* **270**: 15262-15268
19. Barnes K, Brown C, Turner AJ (1998) *Hypertension* **31**: 3-9
20. Hoang MV, Turner J (1997) *Biochem J* **327**: 23-26
21. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990) *Nature (London)* **348**: 730-732.
22. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990) *Nature (London)* **348**: 732-735.
23. Brooks DP (1997) *News Physiol Sci* **12**: 83-89.
24. Webb DJ, Monge JC, Rabelink JC, Yanagisawa M (1998) *Trends Pharmacol Sci* **19**: 5-8.
25. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ (1995) *Circulation* **92**: 357-363
26. Yoshizumi M, Kim S, Kagami S, Hamaguchi A, Tsuchia K, Houchi H, Iwao H, Kido H, Tamaki T (1998) *Br J Pharmacol* **125**: 1019-1027
27. Grossman JD, Morgan JP (1997) *News Physiol Sci* **12**: 113-117.
28. Servitja J-M, Masgrau R, Sarri E, Picatose F (1998) *Br J Pharmacol* **124**: 1728-1734
29. Joško J, Gwóźdź B, Hendryk St (1997) *Post Hig Med Dośw* **51**: 431-441
30. Pinto-Sietmsa S-J, Paul M (1998) *Kidney Int* **54**: S115-S121.
31. Chudek J, Niemir Z, Kokot F (1996) *Pol Arch Med Wewn* **96**: 581-589
32. Haynes WG, Webb DJ (1998) *J Hypertension* **16**: 1081-1098
33. Stjernquist M (1998) *Cell Tissue Res* **292**: 1-9
34. Goodwin AT, Amrani M, Gray CC, Jayakumar J, Yacoub M (1998) *J Physiol* **511**: 549-557.
35. Higenbottam TW, Laude EA (1998) *Chest* **116**: 73S-79S
36. Gaine SP, Rubin LJ (1998) *Lancet* **352**: 719-725.
37. Ni Z, Bermanian S, Kivlighn SD, Vaziri N (1998) *Kidney Int* **54**: 188-192

Różne efekty działania kinazy białkowej A

Various effects of protein kinase A action

ANNA OSTROWSKA*

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Efekty działania kinazy białkowej A
 - II-1 Aktywowanie genów przez kinazę białkową A.
 - II-2. Wpływ kinazy białkowej A na metabolizm podstawowy komórki
 - II-3. Rola kinazy białkowej A w cyklu komórkowym
- III. Izoenzymy kinazy białkowej A
- IV. Struktura enzymu
- V. Aktywowanie kinazy białkowej A i czynniki wpływające na jej aktywność
- VI. Biosynteza kinazy białkowej A
- VII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: AKAP — białko zakotwiczące kinazę białkową A (*protein kinase A anchoring protein*), AP-1 — białko regulacyjne 1 (*activator protein 1*), AP-2 — białko regulacyjne 2 (*activator protein 2*), ATP — adenozyntriisfosforan, C — podjednostka katalityczna kinazy białkowej A, cAMP — 3', 5'-cykliczny monofosforan adenozyliny, cdk — kinaza białkowa zależna od cyklin, cDNA — komplementarny DNA, CRE — sekwencja DNA odpowiadająca (aktywowana) na cAMP (*cAMP response element*), CREB — białko wiążące CRE (*CRE binding protein*), CBP — białko wiążące CREB, Ht31 — białko z tarczycy o ciężarze cząsteczkowym 31 000 zakotwiczące kinazę białkową A (*human thyroid anchor protein*), kinazy MAP (*mitogen activated protein kinase*) — kinazy aktywowane na skutek stymulacji receptorów czynników wzrostu, uczestniczące w kaskadzie fosforylacji, która prowadzi do ekspresji białek wpływających na podziały i różnicowanie się komórek, zwane inaczej kinazami ERK (*extracellular signal regulated protein kinase*), MAP-2 — białko 2 związane z mikrotubulami (*microtubule associated protein 2*) p75 i p150 — białka z mózgu wołowego o ciężarze cząsteczkowym 75 000 i z mózgu szczura o ciężarze cząsteczkowym 150 000 wiążące kinazę białkową, R — podjednostka regulacyjna kinazy białkowej A

I. Wstęp

Do odkrycia kinazy białkowej A, zwanej też kinazą białkową zależną od cAMP (fosfotransferaza-ATP-białko EC 2.7.1.37) doprowadziły badania wpływu fosforylacji na metabolizm glikogenu. Nad

Contents

- I. Introduction
- II. The effects of protein kinase A action
 - II-1. The gene activation by protein kinase A
 - II-2. The influence of protein kinase on basal cellular metabolism
 - II-3. The role of protein kinase A in the cell cycle regulation
- III. Protein kinase A isoenzymes
- IV. The structure of the enzyme
- V. The activation of protein kinase A and the factors influencing its activity
- VI. Biosynthesis of the protein kinase A
- VII. Conclusions

zagadnieniem tym pracowali w latach pięćdziesiątych dwaj uczeni amerykańscy, Edwin Krebs i Edmond Fischer, laureaci nagrody Nobla z roku 1992. Szerzej na temat historii odkrycia kinazy białkowej A i znaczenia fosforylacji białek pisze Teresa Jakubowicz i Eugeniusz Gąsior w "Postęпах Biochemii" sprzed kilku lat [1]. Niniejszy artykuł dotyczy kinazy białkowej A i jej funkcji w komórkach kręgowców.

II. Efekty działania kinazy białkowej A w komórce

Kinaza białkowa A wpływa na metabolizm komórkowy poprzez fosforylacje białek, które prowadzą do zmian ich właściwości. Fosforylacja białek znajdujących się w jądrach komórkowych prowadzi do zmian aktywności genów, fosforylacja białek cytoplazmatycznych wpływa na podstawowy metabolizm komórkowy i ruch białek w cytoplazmie, fosforylacja białek membranowych zmienia przepuszczalność błon komórkowych dla jonów.

II-1. Aktywowanie genów przez kinazę białkową A

Kinaza białkowa A aktywuje wiele genów poprzez fosforylacje białek obecnych w jądrach komórkowych, które oddziałują z promotorowymi regionami genów. Sekwencje takiego regionu nazwano CRE (*cAMP response element*). Scharakteryzowano dwa

*Dr, Pracownia Biochemii Ekologii, Instytut Ekologii, PAN, ul. Konopnickiej 1, Dziekanów Leśny

typy białek oddziałujących z sekwencją odpowiadającą na cAMP: białko wiążące sekwencje aktywowane przez cAMP (*CRE binding protein*) i AP-2 (*activator protein 2*). CREB jest białkiem o ciężarze cząsteczkowym 45 kDa. Jest aktywowane przez fosforylację seryny 133 przez kinazę białkową A. Typową sekwencją regulacyjną genu, z którą oddziałuje CREB jest TGACGTCA. Ufosforylowana forma CREB dimeryzuje poprzez strukturę zamka leucynowego (*leucine zipper*) z drugą cząsteczką CREB lub z innym czynnikiem transkrypcji [2, 3]. Fosforylacja i dimeryzacja CREB umożliwia związaną z dużym białkiem, o ciężarze cząsteczkowym 265 kDa, CBP (*CREB binding protein*). Analogiem CBP jest białko p300, które wiąże się z białkiem onkogennym E1A adenowirusów [4-6]. Związanie CBP powoduje przyłączenie podstawowych czynników transkrypcji TFIIB, TFIIID i białka wiążącego sekwencje TATA — TBP (*TATA binding protein*) do promotora genu [7-13]. Białko CBP wiąże acetylazę histonu i samo wykazuje aktywność acetylazy histonu oraz helikazy [14-16]. Kompleks ten łączy się z pozostałymi podstawowymi czynnikami transkrypcji i razem z polimerazą II RNA przyłącza się do promotora genu aktywując jego transkrypcję [9, 10, 13, 16, 17]. Schemat aktywowania genu przez kinazę białkową A i CREB jest przedstawiony na rycinie 1.

Białko AP-2, o ciężarze cząsteczkowym 52 kDa jest aktywne w postaci dimeru. Rozpoznaje sekwencje promotorowego regionu genu bogate w guaninę i cytozynę (5'-GCCNNNGGC-3'). Białko aktywuje promotor genu współdziałając z innymi czynnikami transkrypcji. Jest aktywowane przez kinazę białkową A i C i kwas retinowy [20, 21]. Badając ekspresję podjednostki β gonadotropiny łożyskowej stwierdzono, że do aktywowania tego genu potrzebna jest aminowa część białka AP-2, charakteryzująca się dużą zawartością proliny i aminokwasów o charakterze kwaśnym [21].

Kinaza białkowa A aktywuje między innymi geny hormonów peptydowych: somatostatyny, gonadotropin, hormonu wazoaktywnego, proopiomelanokortyny, proenkefalin, prolaktyny, hormonu wzrostu, wazopresyny i insuliny [22-30], a także geny receptorów adrenergicznych [31, 32], ferrytyny [33], enzymów syntetyzujących katecholaminy: hydroksylazy tyrozyny i β -hydroksylazy dopaminy [34, 35]. Kinaza białkowa A aktywuje geny *c-jun* i *c-fos* [7, 36]. Uczestniczy w procesie melanogenezy (synteza pigmentu melaniny) poprzez aktywację ekspresji tyrozynazy i dwu innych białek enzymatycznych towarzyszących tyrozynazie [37] i w odpowiedzi immu-

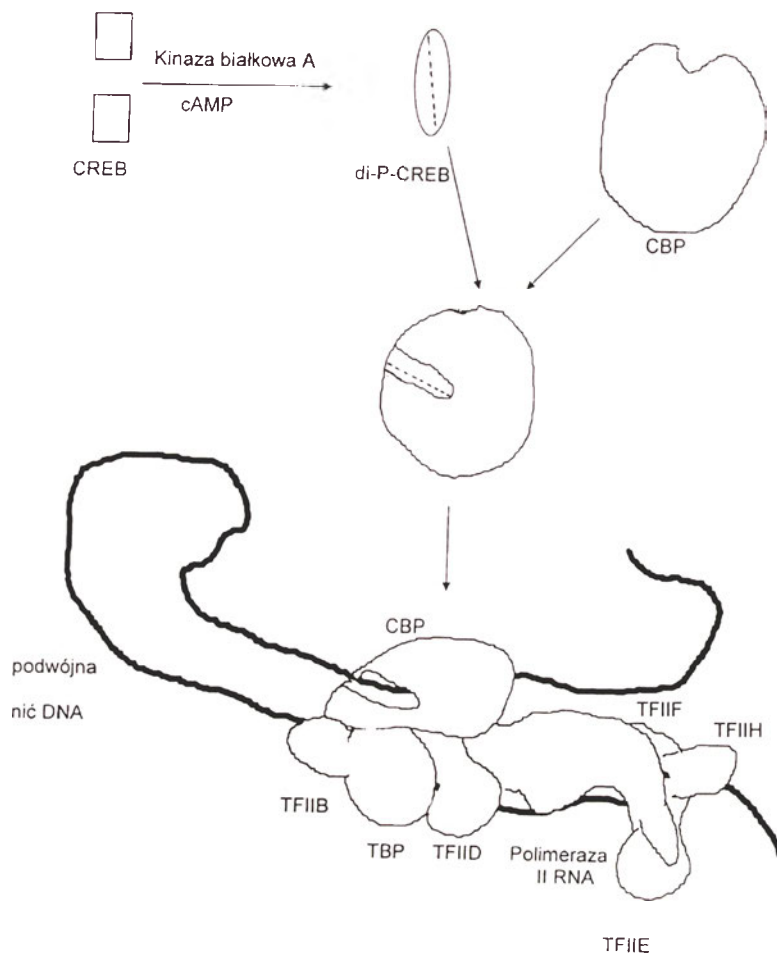
nologicznej poprzez aktywację genu interleukiny 2 [38].

II-2. Wpływ kinazy białkowej A na metabolizm podstawowy komórki

Fosforylacja enzymów kluczowych dróg metabolicznych przez kinazę białkową A wpływa na podstawowy metabolizm komórkowy prowadząc do przyspieszenia procesów katabolicznych. Fosforylacja fosforylasy glikogenu powoduje jej aktywację, natomiast fosforylacja syntazy glikogenu obniża aktywność tej syntazy. Fosforylacja karboksylazy acetylokoenzymu A i reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A obniża syntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu [1, 39, 40]. Kinaza białkowa A nie fosforyluje bezpośrednio tych enzymów, ale hamuje aktywność fosfataz fosfoproteinowych [39]. Aktywność kalpain, proteaz działających w pH obojętnym i w obecności jonów wapnia jest hamowana przez kalpastatyny. Kalpastatyny są białkami o ciężarze cząsteczkowym 17 — 172 kDa. Istnieje tylko jeden gen kalpastatyny. Różnice między kalpastatinami wynikają z różnego składania transkryptu RNA, istnienia kilku miejsc początku translacji i modyfikacjom proteolitycznym. W cząsteczce kalpastatyny są cztery domeny wiążące kalpainę. Jedna cząsteczka kalpastatyny może hamować aktywność czterech cząsteczek kalpainy. Fosforylacja kalpastatyny przez kinazę białkową A wpływa na specyficzność hamowania kalpain. W promotorowej części genu kalpastatyny znajdują się sekwencje, które są aktywowane przez białko fosforylowane przez kinazę białkową A [41, 42].

II-3. Rola kinazy białkowej A w cyklu komórkowym

Kinaza białkowa A uczestniczy w regulowaniu cyklu komórkowego poprzez aktywowanie genu cykliny A. Cyklina A oddziałuje z kinazami zależnymi od cyklin (cdks). Aktywuje cdk1 w fazie G2 i cdk2 w fazie S [43-45]. Kinaza białkowa A może uczestniczyć w kaskadzie reakcji fosforylacji kinaz aktywowanych mitogenami (*mitogen activated protein kinase; MAP kinase*), zwanych też kinazami regulowanymi przez sygnał zewnętrzny (*extracellular signal regulated protein kinase, ERK*). Fosforylacja kinazy tyrozynowej obniża aktywność kinaz MAP. Fosforylacja niskocząsteczkowej GTPazy ras powoduje, że nie aktywuje ona kinazy Raf-1, co w konsekwencji obniża aktywność kinaz MAP [46-49]. Fosforylacja onkogennego białka Op 18, destabilizującego mikro-



Ryc. 1. Aktywowanie ekspresji genu przez kinazę białkową A. Schemat wykonano na podstawie piśmiennictwa przedstawionego w 2, 3; 7-19.

tubule przez kinazę białkową A obniża jego aktywność [50]. Kinaza białkowa A indukuje syntezę białek p27 i p21, inhibitorów kinaz zależnych od cyklin, które hamują rozwój komórek nowotworowych [51] i aktywowanie promotora wirusa pMVM [52].

II-4. Wpływ kinazy białkowej A na sekrecję hormonów

Mechanizm aktywowania sekrecji hormonów przez kinazę białkową A nie jest dokładnie poznany. Podanie analogów cAMP do hodowli komórek przysadki mózgowej powoduje zwiększenie uwalniania hormonu luteinizującego i hormonu wzrostu [23, 53-55], co wskazuje, że kinaza białkowa A uczestniczy w tym procesie. Białko MAP-2 oraz białka błon komórkowych są substratem dla kinazy białkowej A [56-61]. Fosforylacja tych białek może być związana z procesem sekrecji hormonów.

III. Izoenzymy kinazy białkowej A

Wyróżniamy dwa typy kinazy białkowej A — I i II. Ta klasyfikacja została wprowadzona na podsta-

wie elucji enzymu różnymi stężeniami chlorku sodu z DEAE celulozy. Kinaza białkowa A I jest eluowana przy stężeniu chlorku sodu 0,05 — 0,10 M; kinaza białkowa A II — 0,15 — 0,25 M. Te dwa izoenzymy kinazy białkowej A różnią się szybkością dysocjacji na podjednostki regulacyjną (R) i katalityczną (C) i asocjacji pod wpływem siły jonowej oraz powinowactwem do MgATP, które jest wysokie dla I typu kinazy białkowej A i niskie dla II typu enzymu. Ponadto, podjednostki R różnią się składem aminokwasowym, ciężarem cząsteczkowym — RI — 49 kDa; RII — 51-58 kDa i zdolnością wewnątrzcząsteczkowej fosforylacji, której ulega tylko podjednostka RII [62-67].

Dalszą heterogenność kinazy białkowej A stwierdzono w badaniach, w których użyto cDNA podjednostek kinazy białkowej A z różnych komórek. Charakterystyka tych podjednostek jest przedstawiona w Tabeli I. W komórkach ssaków stwierdzono obecność czterech podjednostek regulacyjnych: podjednostki regulacyjnej RI α , podjednostki regulacyjnej RI β , podjednostki regulacyjnej RII α i podjednostki regulacyjnej RII β oraz trzech izoform podjednostki katalitycznej C: C α C β i C γ . Ponadto, z mózgu my-

szy wyizolowano i sklonowano trzy subizofomy podjednostki C β : C β 1, C β 2 i C β 3 [68]. Izofomy RI α , RII α i C α są syntetyzowane we wszystkich badanych tkankach natomiast ekspresja RI β , RII β , C β i C γ jest ograniczona do tkanek spełniających specyficzne funkcje.

IV. Struktura enzymu

Kinaza białkowa A jest tetramerycznym holoenzymem składającym się z dwu podjednostek regulacyjnych (R) i dwu katalitycznych (C) [63, 65]. Schemat struktury kinazy białkowej A jest przedstawiony

Tabela I

Podjednostki kinazy białkowej A

Podjednostki kinazy białkowej A	Występowanie	Masa cząst. kDa	Aktywowanie przez cAMP	Izolacja genu rok	Piśmiennictwo
RI α	w większości tkanek	49	±	1983	[63, 98, 102]
RI β	mózg, przysadka mózgową	49, 53	-	1988	[63, 102]
RII α	w większości tkanek	54, 58	±	1987	[63, 98, 99, 102]
RII β	mózg, tkanki: wydzielnicza, tłuszczowa, krwiotwórcza	51, 52, 54	+	1988	[63, 98, 99, 101-104]
C α	w większości tkanek	40	+	1986	[63, 98, 102]
C β	mózg, przysadka mózgową	40	-	1986	[63, 68, 102]
C β ₁	mysz, cały mózg, część przednia	40	-	1997	[68]
C β ₂	mysz, mózg, część przednia brzuszno-przyśrodkowa (system limbiczny)	40	-	1997	[68]
C β ₃	mysz, hipokamp mózgu	40	-	1997	[68]

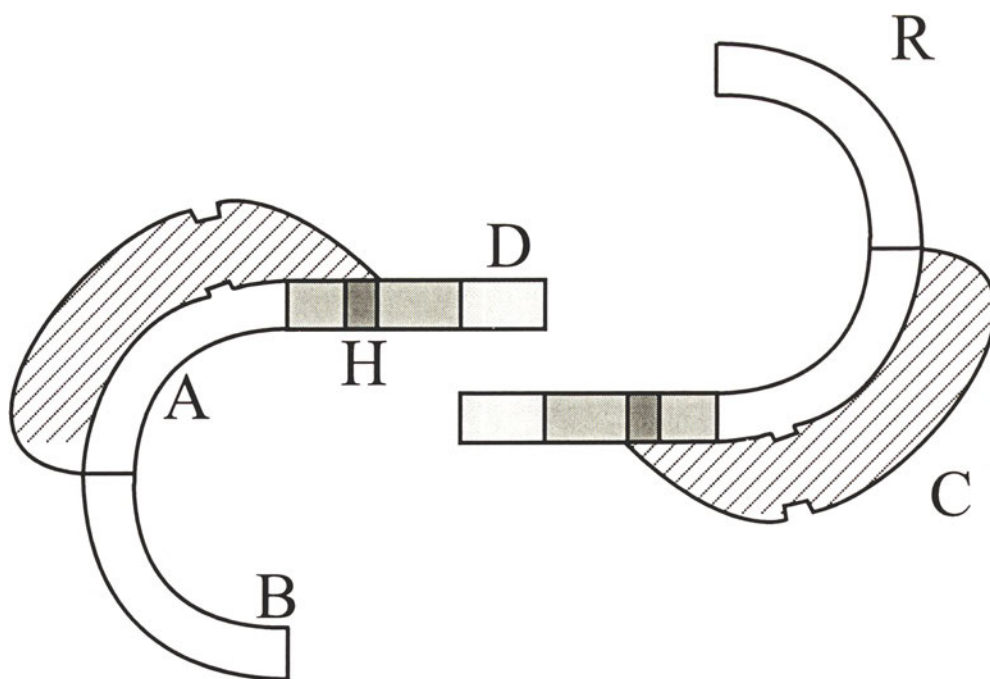
na rycinie 2. Każdy ze znanych czterech izomerów podjednostki R zbudowany jest według tego samego schematu. Pierwsze czterdzieści N-końcowych aminokwasów, w większości hydrofilowych uczestniczy w tworzeniu dimeru (Ryc. 2 D). Następnie znajduje się miejsce zwane antygenowym, które jest rozpoznawane przez przeciwciała, potem region rozpoznawany przez podjednostkę katalityczną C, zwany regionem pseudosubstratowym lub miejscem zawiasu („hinge” region, Ryc. 2 H) i drugie miejsce antygenowe. Karboksylowy koniec podjednostki regulacyjnej zawiera dwa miejsca wiążące cAMP: A i B usytuowane jedno po drugim. Miejsce A znajduje się wewnątrz cząsteczki podjednostki R, a miejsce B jest na jej karboksylowym końcu [63, 65].

Przestrzenna struktura miejsc wiążących cAMP została wydedukowana na podstawie badań struktury białka aktywowanego przez cAMP z *Escherichia coli* (catabolite gene activator protein, CAP lub

cAMP receptor protein, CRP). Białko to wiąże się z promotorem genu *lac* w obecności cAMP aktywując jego transkrypcję. Miejsce wiążące cAMP w białku aktywującym gen *lac* jest struktura o kształcie beczki złożona z 8 nici typu β i otoczona przez trzy helisy α . Cykliczny AMP jest wiązany wewnątrz tej struktury na skutek oddziaływań między arginina i kwasem glutaminowym zlokalizowanych na niciach „beczki”, tyrozyną na jednej z helis α , a egzocyklicznym tlenem fosforanu i grupą 2-hydroksylową rybozy i pierścieniem adenozyliny cAMP [63, 65]. W podjednostce R kinazy białkowej A istnieją dwa miejsca wiążące cAMP. Badania struktury krystalograficz-

nej podjednostki RI α , jej fragmentów i zmutowanych fragmentów wykazały, że miejsce A jest osłonięte przez nici i helisy, podobnie jak miejsce wiążące cAMP w CAP. Miejsce B, które znajduje się na końcu karboksylowym podjednostki R jest mniej osłonięte przez nici β niż w białku CRP z *Escherichia coli* [67]. Schemat struktury miejsca A wiążącego cAMP w podjednostce RI α jest przedstawiony na rycinie 3.

Badania krystalograficzne katalitycznej podjednostki C wykazały, że jest ona lekko wydłużoną cząsteczką składającą się z dwu części, mniejszej i większej, zwanych płaciami (*lobe*), oddzielonych zagłębieniem. Mniejszy płatek, znajduje się w N-końcowej części podjednostki C między 15 a 127 aminokwasem. Wiązany jest tu MgATP. Płatek mniejszy składa się z płaszczyzny zawierającej 5 antyrównoległych nici β i jednego elementu helikalnego włączonego między 3 i 4 nić β . Aminowy koniec



Ryc. 2. Schemat struktury kinazy białkowej A. Rycina została wykonana na podstawie pozycji piśmiennictwa: 63-65, 67. R — podjednostka regulacyjna; C — podjednostka katalityczna; D — dimeryzująca część podjednostki regulacyjnej; H — pseudosubstratowy region „zawiasu”; A i B — miejsca wiążące cAMP.

podjednostki C zaczyna się amfipatyczną helisą α , która leży na powierzchni większego płatu i nie jest identyfikowana w strukturze krystalograficznej. Aminoterminalna glicyna jest często mirystoilowana, co stabilizuje podjednostkę C [65].

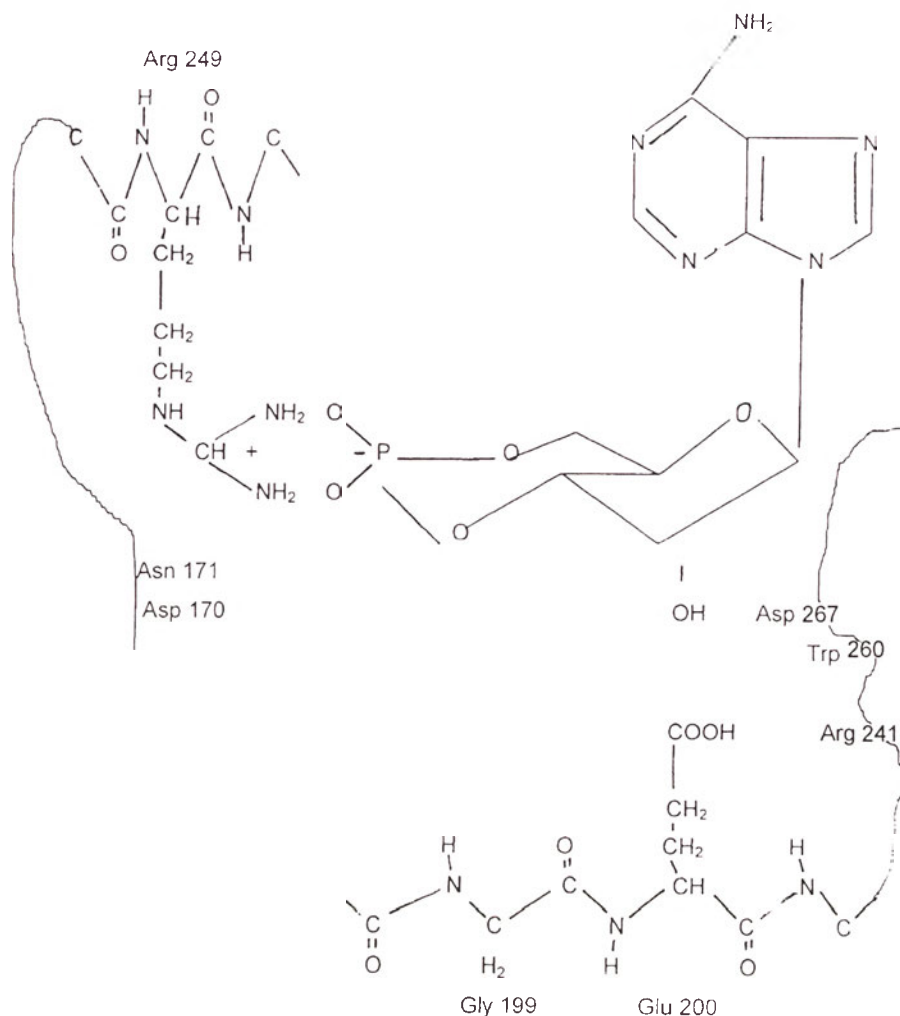
Płat większy wiąże substrat i katalizuje reakcję przeniesienia fosforanu. Ta część podjednostki C znajduje się między aminokwasami 127 i 280. Składa się z 7 α -helis i jednej płaszczyzny β zawierającej cztery antyrównoległe nici. Płaszczyzna leży na powierzchni zagłębienia pomiędzy płatami. Siedemdziesiąt C-końcowych aminokwasów (281-350) rozciąga się ponad obydwoima częściami podjednostki katalitycznej. Ta część podjednostki C rozpoznaje i wiąże substrat, uczestniczy w wiązaniu ATP i katalizuje przeniesienie fosforanu. Podjednostka C zawiera kilka miejsc ulegających fosforylacji Ser 19, Ser 139, Thr 197, Ser 338. Oddziaływanie pomiędzy podjednostkami R i C odbywa się poprzez aminokwasy miejsca pseudosubstratowego i miejsca A, wiążącego cAMP w podjednostce regulacyjnej, a His 87 znajdującą się w płacie mniejszym podjednostki katalitycznej C, Trp 196, Tyr 198 i Lys 213 znajdującą się w płacie większym [70-74].

V. Aktywowanie kinazy białkowej A i charakterystyka czynników wpływających na jej aktywność

Aktywatorem kinazy białkowej A jest cAMP, syntetyzowany przez cyklazę adenilową. Hormonalna stymulacja receptorów membranowych, powiązanych z podjednostką α lub $\beta\gamma$ białka G prowadzi do aktywacji cyklazy adenilowej i do syntezy cAMP

[75-76]. Cykliczny AMP wiąże się z podjednostką regulacyjną w miejscach A i B znajdujących się na jej karboksylowym końcu. Badania kinetyczne wiązania cAMP z podjednostką regulacyjną, zmutowaną w miejscu A lub B wykazały, że cykliczny nukleotyd jest wiązany najpierw w miejscu B, co powoduje takie zmiany konformacyjne w cząsteczce podjednostki regulacyjnej, które umożliwiają związanie następnej cząsteczki cAMP w miejscu A. Związanie dwu cząsteczek cAMP z podjednostką regulacyjną prowadzi do dysocjacji holoenzymu kinazy białkowej A na podjednostki, odsłonięcie aktywnego centrum w podjednostce katalitycznej C i przeniesienie fosforanu na substrat białkowy [63, 65].

Aktywność kinazy białkowej A wykryto w specyficznych przedziałach komórkowych. Rozmieszczenie izoenzymów kinazy białkowej A w komórce zależy od typu podjednostki regulacyjnej [78-84]. Podjednostka regulacyjna RI występuje w cytosolu komórkowym i nie jest powiązana ze strukturami komórkowymi. Podjednostka regulacyjna RII jest zakotwiczona w błonach plazmatycznych, zewnętrznych błonach komórkowych, retikulum endoplazmatycznym i w aparacie Golgiego. Podjednostka RII została znaleziona w jądrach komórkowych, w komórkach GH4C1 przysadki mózgowej szczura i w fibroblastach szczura [81]. W komórkach pochodzących z nabłonka nerek, ulegających podziałom mitotycznym podjednostkę RII znaleziono w centrosomach i na biegunach wrzecion podziałowych w metafazie [78]. Fakt istnienia kinaz białkowych regulujących funkcje centrosomu jest znany [85].



Ryc. 3. Schemat miejsca A wiążącego cAMP w podjednostce R I α . Arg 209 może tworzyć mostki wodorowe z Asp 170 i z rdzeniem karbonylowym Asn 171 oraz z niecyklicznym tlenem fosforanu cAMP. Glu 200 i Gly 199 tworzą mostki wodorowe z grupą 3'-hydroksylową rybozy pierścienia adenozyiny. Odległości pomiędzy Glu 200 a Trp 260 i Arg 241 wskazują, że między tymi aminokwasami mogą powstawać mostki wodorowe. Arg 241 może też oddziaływać z Asp 267, leżącą w miejscu B wiążącym cAMP [67, 69, 73].

Podjednostka RII wiąże się ze strukturami subkomórkowymi przez białko wiążące mikrotubule, MAP-2 (*microtubule associated protein 2*) i białko AKAP (*cAMP-dependent protein kinase anchoring protein*). Białko MAP-2 (270-300 kDa) występuje w postaci włókien tworzących między sobą połączenia i łączących się ze sobą i z mikrotubulami. Jest substratem kinazy białkowej A [57, 86].

Białka AKAP wyizolowano najpierw z mózgow wołowych (p75) i szczurzych (p150), a następnie z innych tkanek i z innych gatunków zwierząt [58, 79, 87, 88]. Białka AKAP wyizolowane z wątroby rozdzielono elektroforetycznie. Zidentyfikowano elektroforetycznie ponad 40 białek wiążących podjednostkę RII o ciężarach cząsteczkowych od 25 do 300 kDa [58]. Sklonowano i scharakteryzowano kilka białek AKAP [59, 89], między innymi białko wiążące się z podjednostką regulacyjną kinazy białkowej A w jądrach komórkowych przysadki mó-

zowej szczura, AKAP-95 [81]. W strukturze białka AKAP-95 znajduje się motyw palców cynkowych, które mogą wiązać kwas dezoksyrybonukleinowy. Autorzy pracy sugerują, że AKAP-95 może uczestniczyć w wiązaniu czynników transkrypcji do regionów promotorowych genów poprzez wpływ na fosforylację chromatyny jądrowej, czynników transkrypcji i enzymów aparatu transkrypcyjnego.

Aminowy koniec dimeru podjednostki regulacyjnej RII wiąże się z białkami zakotwiczącymi. Białka zakotwiczące podjednostkę RII nie mają podobnej struktury pierwszorzędowej w części, która wiąże podjednostkę. Badania przeprowadzone z zastosowaniem dichroizmu kołowego wiązania podjednostki RII przez białka AKAP wykazały, że w wiązaniu podjednostki RII odgrywają istotną rolę duże hydrofobowe powierzchnie, które oddziałują z N-końcową częścią dimeru (Ryc. 1 D) podjednostki RII [90, 91].

Aktywność kinazy białkowej A zależy od proporcji podjednostek R i C. Do zaktywowania kinazy białkowej A potrzebne jest więcej cAMP niż wynikałoby to z jej budowy. Nadmiar podjednostki C kompensowany jest przez podjednostkę R. W komórkach S49, które syntetyzują więcej podjednostki C, wzrasta zawartość podjednostki RI α , tak, że zawartość podjednostek R przekracza zawartość podjednostek C. Ta kompensacja następuje na skutek zwiększenia stabilności mRNA i tempa translacji, a także stabilizacji białka podjednostki RI α [63, 92].

Hormony wpływają na aktywność kinazy białkowej A. Steroidy modyfikują aktywność enzymu. W przedniej części przysadki mózgowej szczura aktywność kinazy białkowej A zmienia się w cyklu estralnym pod wpływem estradiolu i progesteronu [93]. Hormony mogą stymulować syntezę podjednostek kinazy białkowej A, co wpływa na proporcje i kombinacje podjednostek. Stwierdzono dwukrotny wzrost zawartości podjednostki RII w jajniku świni podczas rozwoju pęcherzyków owulacyjnych, w tym samym czasie nie zmieniał się poziom podjednostki RI α [94]. W jajniku szczura poziom podjednostki RII β wzrastał około dziesięciokrotnie podczas dojrzewania pęcherzyków owulacyjnych i obniżał się po luteinizacji [95, 96]. Stymulacja gruczołu przytarczyc izoproterenolem powodowała wzrost zawartości podjednostek RI i C w jądrach komórkowych [97]. W komórkach Sertoliego stymulacja cAMP powodowała 30- do 50-krotny wzrost mRNA podjednostki RII β . Zawartość białka podjednostki RII β wzrastała w mniejszym stopniu niż zawartość mRNA. Wzrost poziomu mRNA innych podjednostek kinazy białkowej A był mniejszy niż mRNA podjednostki RII β . Zawartość białka podjednostki RII α zmniejszała się, a RI nie zmieniała się [98].

Ekspresja białka podjednostki RII β jest stymulowana przez cAMP. Zwiększona indukcja podjednostki RII β nie wydaje się wpływać na osłabienie sygnału cAMP poprzez podwyższenie poziomu białek wiążących cykliczny nukleotyd. Wzrost poziomu białka podjednostki RI α , którego jest najwięcej (75% podjednostek R kinazy białkowej A) i którego poziom nie zmienia się w stymulowanych komórkach, bardziej efektywnie zmniejszałby sygnał przekazywany przez cAMP. Podjednostka RII β zastępuje kompetytywnie podjednostkę RI α w holoenzymie kinazy białkowej A [99], co sugeruje jej wyjątkową rolę w przekazywaniu sygnału do komórki przez cAMP. Badania na transformowanych fibroblastach, syntetyzujących podjednostkę RII β wskazują, że podjednostka ta może spełniać funkcje czynnika

transkrypcji wiążącego i aktywującego promotorewe regulacyjne sekwencje CRE [100].

VI. Biosynteza kinazy białkowej A

Podjednostki kinazy białkowej A RI α , RI β , RII α , RII β , C α i C β są syntetyzowane z oddzielnych genów. Warianty podjednostki C β — C β 1, C β 2 i C β 3 są syntetyzowane z tego samego genu przez różne składanie transkryptu RNA. Geny podjednostek kinazy białkowej A wykazują podobną strukturę. Regiony regulacyjne tych genów zawierają liczne sekwencje GC, nie posiadają sekwencji TATA i posiadają kilka miejsc startu transkrypcji. Większość tych genów jest aktywowana przez cAMP [63, 98, 101, 102]. W badaniach przeprowadzonych na komórkach przysadki mózgowej stwierdzono, że cAMP aktywuje ekspresję dwu podjednostek kinazy białkowej A: RII β i C α . Badania te wskazują, że ekspresja podjednostki RII β jest stymulowana przez fosforylację już istniejących białek, a podjednostki C α poprzez *de novo* syntezę białek aktywujących promotor C α [102].

W ostatnich latach został scharakteryzowany region promotorowy genu podjednostki RII β . Gen tej podjednostki został wyizolowany z genomowego banku myszy [103] i wątroby szczura [104] i zsekwencjonowany. Rdzeń promotorowego regionu genu jest zlokalizowany wewnątrz pierwszych 400 nukleotydów powyżej kodonu inicjującego ATG. Zawiera on kilka miejsc startu transkrypcji, sekwencje bogate w GC i region wiążący specyficzne dla tkanki kompleksy białek jądrowych. Fragment promotora aktywowany przez cAMP zawiera sekwencję wiążącą białko regulacyjne AP-2. W regionie promotorowym genu podjednostki RII β myszy, w odległości ponad 1000 nukleotydów od miejsca startu transkrypcji zidentyfikowano sekwencję, która wiąże białko regulacyjne AP-1. Ten region może być aktywowany pośrednio przez cAMP. Sekwencje bogate w GC uczestniczą w wyborze miejsca startu transkrypcji. Promotor genu RII β oddziałuje z licznymi białkami regulującymi jego ekspresję [103, 104].

VII. Podsumowanie

Kinaza białkowa A uczestniczy w wielu różnorodnych procesach biochemicznych zachodzących w organizmach żywych. Fosforylacja białek obecnych w jądrach komórkowych zmienia aktywność aparatu transkrypcyjnego, ekspresję czynników transkrypcji

i genów białek enzymatycznych i strukturalnych, co wpływa na wzrost i rozwój komórek. Poprzez regulowanie genu cykliny A, białek wpływających na aktywność kinaz zależnych od cyklin oraz oddziaływanie ze szlakami kinaz MAP uczestniczy w procesach podziału i różnicowania się komórek. Wpływa na syntezę białek enzymatycznych i ich aktywność, przez co uczestniczy w metabolizmie podstawowym komórki. Poprzez aktywowanie ekspresji swoich podjednostek wpływa na własną aktywność. Uczestniczy w syntezie hormonów. Kinaza białkowa A może spełniać te wszystkie funkcje dzięki kompartmentacji izoform holoenzymu w komórce. Znaczenie izoform nie jest jasne. Nie jest wyjaśniona rola podjednostek RII β i C β , które są syntetyzowane w specyficznych tkankach, w odpowiedzi na hormonalną stymulację komórki. Mogą istnieć różnice w specyficznościach substratowych pomiędzy podjednostkami C. Można przypuszczać, że izoformy są w różny sposób aktywowane przez cAMP, w zależności od oddziaływań podjednostek między sobą i dostępności miejsc wiążących cykliczny nukleotyd z podjednostką R. Kinaza białkowa A rozmieszczona jest w różnych miejscach w komórce poprzez podjednostkę regulacyjną, która ją zakotwicza w strukturach komórkowych. Rozmieszczenie w komórce decyduje o dostępie do substratu i cAMP. Aktywowanie odpowiedniego izoenzymu kinazy białkowej A, znajdującego się w tym samym przedziale komórkowym, w którym jest cAMP dostarczony na skutek stymulacji receptora i dostęp do właściwego substratu stanowią o różnorodności efektów działania kinazy białkowej A.

Podziękowania

Składam najserdeczniejsze podziękowanie Pani Profesor dr hab. Zofii Zielińskiej za cenne uwagi udzielone mi podczas pisania artykułu.

*Artykuł otrzymano 9 listopada 1998 r.
Zaakceptowano do druku 10 maja 1999 r.*

Piśmiennictwo

1. Jakubowicz T, Gąsior E (1993) *Post Bioch* **39**: 2-7
2. Gonzalez G A, Montminy M R (1989) *Cell* **59**: 675-680
3. Alber T (1992) *Curr Opin Genet Dev* **2**: 205-210
4. Eckener R, Ewen M E, Newsome D, Gerdes M, De Capiro J A, Lawrence J B, Liwingston D M (1994) *Gen Develop* **8**: 869-884
5. Arany Z, Newsome D, Oldread E, Livingston D M, Eckener R (1995) *Nature (London)* **374**: 81-84
6. Lundblad J R, Kwok R P S, Lawrence M E, Harter M L, Goodman R S (1995) *Nature (London)* **374**: 85-88

7. Arias J, Alberts A S, Brindle P, Claret F X, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M (1994) *Nature (London)* **370**: 226-229
8. Chrivia J C, Kwok R P S, Lamb N, Hagiwara M, Montminy M R, Goodman R (1993) *Nature (London)* **365**: 855-859.
9. Ferreri K, Gill G, Montminy M (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1210-1213
10. Kwok R P S, Lundblad J R, Chrivia J C, Richards J P, Bachinger H P, Brennan R G, Roberts S G E, Green M R, Goodman R II (1994) *Nature (London)* **370**: 223-226
11. Peterson S R, Jesch S A, Chamberlin T N, Dvir A, Rabindran S K, Wu C, Dynan W S (1995) *J Biol Chem* **270**: 1449-1454
12. Parker D, Ferreri K, Nakajima T, Lamorte V J, Evans R, Koerber S C, Hoeger C, Montminy M R (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 694-703
13. Nakajima T, Uchida C, Anderson S F, Parvin J D, Montminy M (1997) *Gen Develop* **11**: 738-747
14. Bannister A J, Kouzarides T (1996) *Nature (London)* **384**: 641-643
15. Ogryzko V V, Schiltz R L, Russanova V, Howard B H, Nakatani Y (1996) *Cell* **87**: 953-959
16. Nakajima T, Uchida C, Anderson S F, Lee C G, Hurwitz J, Parvin J D, Montminy M (1997) *Cell* **90**: 1107-1112
17. Liang G, Hai T (1997) *J Biol Chem* **272**: 24088-24095
18. Bjorklund S, Kim Y J (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 335-337
19. Kornberg R D (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 325-326
20. Wang D, Shin T H, Kudlow J E (1997) *J Biol Chem* **272**: 14244-14250
21. Johnson W, Albanese C, Handwerker S, Williams T, Pestell R G, Jameson J L (1997) *J Biol Chem* **272**: 15405-15412
22. Roesler W J, Vandenbark G R, Hanson R W (1988) *J Biol Chem* **263**: 9063-9066
23. Counis R (1990) *Ann Endocrinol (Paris)* **51**: 72-81
24. Albanese C, Kay T W H, Troccoli N M, Jameson J L (1991) *Mol Endocrinol* **5**: 693-702
25. Sladek C D, Gallagher M J (1993) *Endocrinology* **133**: 1320-1330
26. Jacob K K, Stanley F M (1994) *J Biol Chem* **269**: 25515-25520
27. Oetjen E, Diedrich T, Eggers A, Eckert B, Kneipel W (1994) *J Biol Chem* **269**: 27036-27044
28. Spiro C, McMurray C T (1997) *J Biol Chem* **272**: 33145-33152
29. Levin N, Roberts J L (1991) *Front Neuroendocrinol* **12**: 1-22
30. Tan Y, Low K G, Boccia C, Grossman J, Comb M J (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7546-7556
31. Thomas R F, Holt B D, Schwinn D A, Liggett S B (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4490-4494
32. Razik M A, Lee K, Price R R, Williams M R, Ongjoco R R, Dole M K, Rudner X L, Kwatra M M, Schwinn D A (1997) *J Biol Chem* **272**: 28237-28246
33. Bevilacqua M A, Faniello M C, Quaresima B, Tiano M T, Giuliano P, Feliciello A, Avvedimento V E, Cimino F, Costanzo F (1997) *J Biol Chem* **272**: 20736-20741
34. Nagamoto-Combs K, Piech K J, Bets J A, Sun B, Tank A W (1997) *J Biol Chem* **272**: 6051-6058
35. Swanson D J, Zellmer E, Lewis E J (1997) *J Biol Chem* **272**: 27382-27392
36. Ramirez S, Ali S A S, Robin P, Trouche D, Harel-Bellan A (1997) *J Biol Chem* **272**: 31016-31021
37. Bertolotto C, Busca R, Abbe P, Bille K, Aberdman E, Ortonne J P, Ballotti R (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 694-702
38. Butscher W G, Powers C, Olive M, Vinson C, Gardner K (1998) *J Biol Chem* **273**: 552-560

39. Cohen P, Hardie D G (1991) *Biochem Biophys Acta* **1094**: 292-299
40. Mounier C, Chen W, Klautky S A, Goodridge A G (1997) *J Biol Chem* **272**: 23606-23615
41. Salamino F, De Tullio R, Michetti M, Mengotti P, Melloni P, Pontremoli S (1994) *Biochim Biophys Res Commun* **199**: 1326-1332
42. Cong M, Thompson V F, Goll D E, Antin P B (1998) *J Biol Chem* **273**: 660-666
43. Sherr C J, Roberts J M (1995) *Genes Dev* **9**: 1149-1163
44. Desduets C, Matesick G, Molina C A, Foulkes N S, Seassone-Corsi P, Brechot T, Sobczak-Thepot J (1995) *J Cell Biol* **15**: 3300-3309
45. Yoshizumi M, Wang H, Hsieh C M, Sibinga N E S, Perrellas M A, Lee M E (1997) *J Biol Chem* **272**: 22259-22264
46. Burgering B M T, Pronk G J, van Weeren P C, Chardin P, Bos J L (1993) *EMBO J* **12**: 4211-4220
47. Wu J, Deont P, Jelinek T, Wolfman A, Weber M J, Sturgill T W (1993) *Science* **262**: 1065-1069
48. Giasson E, Servant M J, McLoche S (1997) *J Biol Chem* **272**: 26879-26886
49. Marshall C J (1998) *Nature (London)* **392**: 553-554
50. Gradin H M, Larsson N, Marklund U, Gullberg M (1998) *J Cell Biol* **140**: 131-141
51. Chinery R, Brockman J A, Dransfield D T, Coffey R J (1997) *J Biol Chem* **272**: 30356-30361
52. Deleu L, Fuks F, Spitkovsky D, Horlen R, Faisst S, Rommelaere J (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 409-419
53. Puttagunta A L, Chik C L, Girard M, O'Brien L, Ho A K (1992) *J Endocrinol* **135**: 343-352
54. Inukai T, Wang X, Greer S E, Greer M A (1993) *Cell Calcium* **14**: 219-226
55. Counis R, Bouamond N, Lerrant Y, Starzec A, Moumni M, Kottler M L, Garrel G, Berault A, Bergametti F (1993) *Contracept Fertil Sex* **21**: 773-779
56. Lemay A, Deschenes M, Lemaire S, Poirier G, Poulin L, Labrie F (1974) *J Biol Chem* **249**: 332-328
57. Vallee R (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3206-3210
58. Carr D W, Hausken Z E, Fraser J D C, Stofko-Hann R E, Scott, J D (1992) *J Biol Chem* **267**: 13376-13392
59. Hirsch A H, Glantz S B, Li Y, You Y, Rubin C S (1992) *J Biol Chem* **267**: 2131-2134
60. Pimplikar S W, Simons K (1994) *J Biol Chem* **269**: 19054-19059
61. Kurashima K, Yu F H, Cabado A G, Szabo E Z, Grinstein S, Orlowski J (1997) *J Biol Chem* **272**: 28672-28679
62. Ostrowska A (1987) *Acta Physiol Pol* **38**: Supl 29, 1-16
63. McKnight S G, Clegg C H, Uhler M D, Chrivia J C, Cadd G G, Correll L A, Otten A D (1988) *Rec Progr Hormone Res* **4**: 307-335
64. Soderling T R (1990) *J Biol Chem* **265**: 1823-1826
65. Taylor S S, Buechler J A, Yonemoto W (1990) *Annu Rev Biochem* **59**: 971-1005
66. Gibson M R, Buechler V J, Taylor S S (1997) *J Biol Chem* **272**: 16343-16350
67. Gibson R M, Taylor S S (1997) *J Biol Chem* **272**: 31998-32005
68. Guthrie C R, Skalhogg B S, McKnight G S (1997) *J Biol Chem* **272**: 29560-29565
69. Dostmann W R G, Taylor S S (1991) *Biochemistry* **30**: 8710-8716
70. Knighton D R, Zheng J, Ten Eyck L F, Ashford V A, Xoung N H, Taylor S S, Sowadski J M (1991) *Science* **253**: 407-420
71. Taylor S S, Knighton D R, Zheng J, Ten Eyck L F, Sowadski J M (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**: 429-462
72. Adams J A, McGlone M L, Gibson R, Taylor S S (1995) *Biochemistry* **34**: 2447-2454
73. Taylor S S, Bubis J, Toner-Webb J, Saraswat L D, First E A, Buechler J A, Knighton D R, Sowadski J (1988) *FASEB J* **2**: 2677-2685
74. Cox S, Taylor S S (1994) *J Biol Chem* **269**: 22614-22622
75. Taussing R, Gilman A G (1995) *J Biol Chem* **270**: 1-4
76. Daaka Y, Luttrell L M, Lefkowitz R J (1997) *Nature (Lond)* **390**: 88-91.
77. Bayewitch M L, Avidor-Reiss T, Levy R, Pfeuffer T, Nevo I, Simonds W F, Vogel Z (1998) *J Biol Chem* **273**: 2273-2276
78. Nigg E A, Schafer G, Hilz H, Eppenberger H M (1985) *Cell* **41**: 1039-1051
79. Luo Z, Shafit-Zagardo B, Erlichman J (1990) *J Biol Chem* **265**: 21804-21810
80. Meinkoth J L, Ji Y, Taylor S S, Feramisco J R (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9595-9599
81. Coghlan V M, Langeberg L K, Fernandez A, Lamb N J C, Scott J D (1994) *J Biol Chem* **269**: 7658-7665
82. Skalhogg B S, Tasken K, Hansson V, Huitfeldt H S, Jahnsen T, Lea T (1994) *Science* **263**: 84-87
83. Faux M C, Scott J D (1996) *Cell* **85**: 9-12
84. Dell'Acqua M I, Scott J D (1997) *J Biol Chem* **272**: 12881-12884
85. Doxey S (1998) *Nature Genet* **20**: 104-106
86. Theurkauf W E, Vallee R B (1982) *J Biol Chem* **257**: 3284-3290
87. Leiser M, Rubin C S, Erlichman J (1986) *J Biol Chem* **261**: 1904-1908
88. Lohmann S M, De Camilli P, Walter U (1988) W: Colowick S P, Kaplan N O (red) *Methods in Enzymology* **159** str 183-193
89. Chen Q, Liu R Y, Rubin C S (1997) *J Biol Chem* **272**: 15247-15257
90. Hausken, Z E, Coghlan, V M, Schafer-Hastings, C A, Reimann, E M, Scott J D (1994) *J Biol Chem* **269**: 24245-24251
91. Li Y, Rubin C S (1995) *J Biol Chem* **270**: 1935-1944
92. Knutsen H K, Tasken K A, Eskild W, Jahnsen T, Hansson V (1991) *Endocrinology* **129**: 2496-2502
93. Ostrowska A (1994) *Biol Cell* **18**: 223-226
94. De Manno D A, Hunzicker-Dunn M (1991) *Mol Cell Endocrinol* **80**: 91-104
95. Hedin L H, McKnight G S, Lifka J, Durica, J M, Richards J S (1987) *Endocrinology* **120**: 1928-1935
96. Ratoosh S L, Lifka J, Hedin L, Jahnsen T, Richards J S (1987) *J Biol Chem* **262**: 7306-7313
97. Schwoech G, Freimann A (1986) *FEBS Lett* **197**: 143-148
98. Landmark B F, Fauske B, Eskild W, Skalhogg B, Lohmann S M, Hansson V, Jahnsen T, Beebe S J (1991) *Endocrinology* **129**: 2345-2354
99. Otten A D, Parenteau L A, Doskeland S, McKnight G S (1991) *J Biol Chem* **266**: 23074-23082
100. Srivastava R K, Lee Y N, Noguchi K, Park Y G, Ellis M J C, Jeong J S, Kim S N, Cho-Chung Y S (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6687-6692
101. Oyen O, Eskild W, Beebe S J, Hansson V, Jahnsen T (1988) *Mol Endocrinol* **2**: 1070-1076
102. Garrel G, Lerrant Y, Ribot G, Counis R (1993) *Endocrinology* **133**: 1010-1019
103. Singh I S, Luo Z, Eng A, Erlichman J (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 221-226
104. Kurten R C, Levy L O, Shey J, Durica J M, Richards J S (1992) *Mol Endocrinol* **6**: 536-550

Synapsyny — wewnątrzkomórkowe receptory ATP w procesach wydzielania przekaźników nerwowych

Synapsins as intracellular receptors for ATP in neurotransmitter release

RENATA BUŚ¹, SŁAWOMIR PIKUŁA²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Synapsyny jako białka wiążące ATP
 - II-1. Oddziaływanie synapsyn z błoną pęcherzyków synaptycznych
 - II-2. Regulacja funkcji synapsyn przez procesy fosforylacji i kalmodulinę
 - II-3. Wpływ jonów wapnia na oddziaływanie synapsyn z ATP
- III. Oddziaływanie synapsyn z innymi białkami wiążącymi ATP
- IV. Uwagi końcowe

I. Wstęp

Wyniki badań prowadzonych na zwierzętach transgenicznym wskazują, że w procesie wydzielania przekaźników nerwowych ważne funkcje pełnią różnego rodzaju białka regulacyjne, w tym białka wiążące nukleotydy, do których należą m. in. synapsyny. Niniejszy artykuł omawia właściwości biochemiczne synapsyn oraz przedstawia hipotezę, że ATP mogłoby uczestniczyć w regulacji wydzielania przekaźników nerwowych, wiążąc się z synapsynami, białkami opłaszczającymi pęcherzyki synaptyczne.

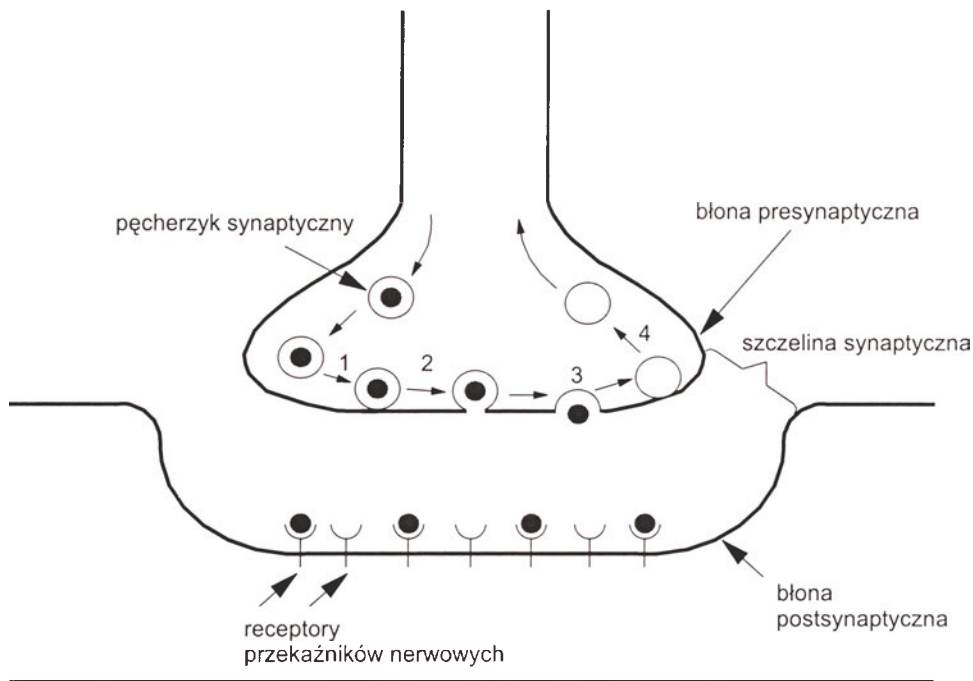
Komórki nerwowe kontaktują się ze sobą, m.in. wydzielając do środowiska przekaźniki nerwowe. Związana z tym odpowiedź komórek stanowi podstawę tak ważnych procesów, jak zapamiętywanie i uczenie się [1, 2]. Wydzielanie przekaźników nerwowych zachodzi w wyspecjalizowanych strukturach, synapsach nerwowych, zlokalizowanych w zakończeniach nerwowych (jeden z typów synaps wystę-

Contents:

- I. Introduction
- II. Synapsins as ATP-binding proteins
 - II-1. Interaction of synapsins with synaptic vesicles
 - II-2. Regulation of synapsin function by phosphorylation and by calmodulin
 - II-3. Influence of calcium ions on interaction of synapsins with ATP
- III. Interaction between synapsins and other ATP-binding proteins
- IV. Concluding remarks

pujących w komórkach nerwowych, tzw. synapsę chemiczną, pokazano na rycinie 1). W wyniku pobudzenia komórki nerwowej fala potencjału czynnościowego dociera do błony zakończenia nerwowego, co powoduje otwarcie specyficznych dla jonów wapnia kanałów zależnych od potencjału błonowego i wzrost stężenia Ca^{2+} w cytosolu. Wzrost ten wywołuje fuzję pewnej liczby pęcherzyków synaptycznych, zawierających przekaźniki nerwowe, z błoną zakończenia nerwowego (w tzw. aktywnym rejonie błony) i uwolnienie ich zawartości do szczeliny synaptycznej. Wyrzut przekaźników nerwowych poprzedzony jest następującymi procesami: biogenezą pęcherzyków, gromadzeniem się w ich wnętrzu przekaźników nerwowych, transportem pęcherzyków do zakończenia nerwowego, zakotwiczeniem pęcherzyków na błonie presynaptycznej i fuzją pęcherzyków z tą błoną [3, 4]. Pęcherzyki synaptyczne, po uwolnieniu przekaźników nerwowych, mogą ulegać recykliczacji na drodze endocytozy, w której zaangażowane są klatryna i filamenty aktynowe. Zarówno w komórkach nerwowych, jak i w komórkach sekrecyjnych, proces odzyskiwania pęcherzyków po egzocytozie jest bardzo szybki [5].

¹Mgr, ²Doc. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



Ryc. 1. Schemat przedstawiający synapsę chemiczną. Na rycinie pokazano zależność pomiędzy egzocytozą i endocytozą w procesie wydzielania przekaźników nerwowych. Etap 1 — zakotwiczenie pęcherzyka błonowego w rejonie aktywnym błony plazmatycznej; etap 2 — aktywacja pęcherzyka; etap 3 — fuzja pęcherzyka z błoną plazmatyczną i uwolnienie przekaźnika nerwowego do szczeliny postsynaptycznej; etap 4 — odzysk pęcherzyka na drodze endocytozy. Ze względu na skalę rysunku, nie zaznaczono na nim synapsyn związanych z pęcherzykami synaptycznymi.

II. Synapsyny jako białka wiążące ATP

Synapsyny¹ należą do rosnącej w liczbę grupy białek wiążących nukleotydy adeninowe [1, 6-9]. W ostatnich latach stwierdzono, że synapsyny wykazują wysokie powinowactwo do ATP, a niskie do ADP [10-12], jakkolwiek w ich cząsteczkach nie występują sekwencje aminokwasowe charakterystyczne dla białek wiążących ATP, np. motyw Walkera A i B [13-15]. Powinowactwo synapsyn do nukleotydów jest modulowane przez jony wapnia. Synapsyny należą zatem do rosnącej w liczbę grupy białek, dla których ATP, oprócz klasycznej funkcji jaką pełni w komórce, czyli nośnika energii w procesach metabolicznych i transporcie, może odgrywać również rolę swoistego przekaźnika informacji [16, 17] lub fizjologicznego ligandu wpływającego na funkcję białek. ATP uwalniany jest z zakończeń komórek nerwowych, a jego stężenie na zewnątrz komórki jest regulowane przez ekto-ATPazy [18, 19]. Zewnątrzkomórkowy ATP działa na purynoreceptory (P2X i P2Y) zlokalizowane w błonie plazmatycznej, odgrywające rolę w przekazywaniu sygnałów w układzie nerwowym; w wyniku pobudzenia tych receptorów

następują zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [17]. ATP wiąże się w komórce z różnymi białkami enzymatycznymi, regulacyjnymi i strukturalnymi, takimi m.in. jak kanały potasowe zależne od ATP, kanały uwalniające jony wapnia z cystrern sarkoplazmatycznego retikulum, niektóre aneksyny i synapsyny [17-20].

Synapsyny stanowią 7-9% wszystkich białek pęcherzyków synaptycznych. Wzmoczona ekspresja synapsyn zachodzi w czasie synaptogenezy [21-23]. W dojrzałej komórce nerwowej synapsyny występują przede wszystkim w zakończeniach nerwowych [24].

Mimo nagromadzenia dużej liczby danych doświadczalnych, fizjologiczna funkcja synapsyn pozostaje nadal niezdefiniowana. Funkcję tę trudno wydedukować ze struktury pierwszorzędowej synapsyn, gdyż struktura ta nie odpowiada strukturze białek o poznanych już funkcjach. Synapsyny wykazują zdolność wiązania się z różnorodnymi strukturami wewnątrzkomórkowymi, takimi jak filamety aktynowe, mikrotubule, neurofilamety, a także z białkami: spektryną, kalmoduliną, aneksyną VI, białkami MARKS i Grb2 [10, 25]. Wykazano rów-

1 Synapsynom poświęcono artykuł przeglądowy opublikowany w *Postęпах Biochemii*, Hrabec Z, Lachowicz L (1991) Synapsyny — endogenne substraty kinaz białkowych, *Post. Biochem.* 37, 133-138.

niez, że obecność synapsyn jest nieodzowna dla zachowania integralności pęcherzyków synaptycznych [26-28].

W układzie nerwowym ulegają ekspresji przede wszystkim cztery homologiczne białka: Ia, Ib, określane jako synapsyny I (odpowiednio 704-706 i 668-670 reszt aminokwasowych), oraz IIa i IIb, określane jako synapsyny II (odpowiednio 584 i 479 reszt aminokwasowych). Izoforny te powstają dzięki zjawisku różnicowego cięcia i składania mRNA [29, 30]. Niedawno sklonowano i scharakteryzowano nową synapsynę, tzw. synapsynę III i jej izofornę IIIa (581 reszt aminokwasowych) [31]. Geny kodujące poszczególne synapsyny zlokalizowano na chromosomach 10 [32], 3 [33, 34] i 22 [31].

Wszystkie synapsyny mają budowę domenową. W N-końcowym rejonie ich cząsteczek występuje krótka domena A, domena B bogata w reszty alaniny i seryny (odznacza się dużym podobieństwem pomiędzy synapsynami I i II) oraz domena C (78% wzajemnej identyczności) [29]. Domena C, bogata w reszty aminokwasowe o charakterze hydrofobowym, wykazuje wysoki stopień podobieństwa pomiędzy synapsynami pochodzącymi z różnych gatunków kręgowców i bezkręgowców, co może świadczyć, że jest to podstawowa domena funkcjonalna tych białek [11]. C-końcowy rejon cząsteczek synapsyn jest bardziej zróżnicowany, a wzajemne podobieństwa międzygatunkowe są dużo mniejsze [11]. Na przykład, domena D występuje jedynie w synapsynach I i jest bogata w reszty aminokwasów zasadowych. Struktura synapsyny IIIa jest niemal identyczna ze strukturą

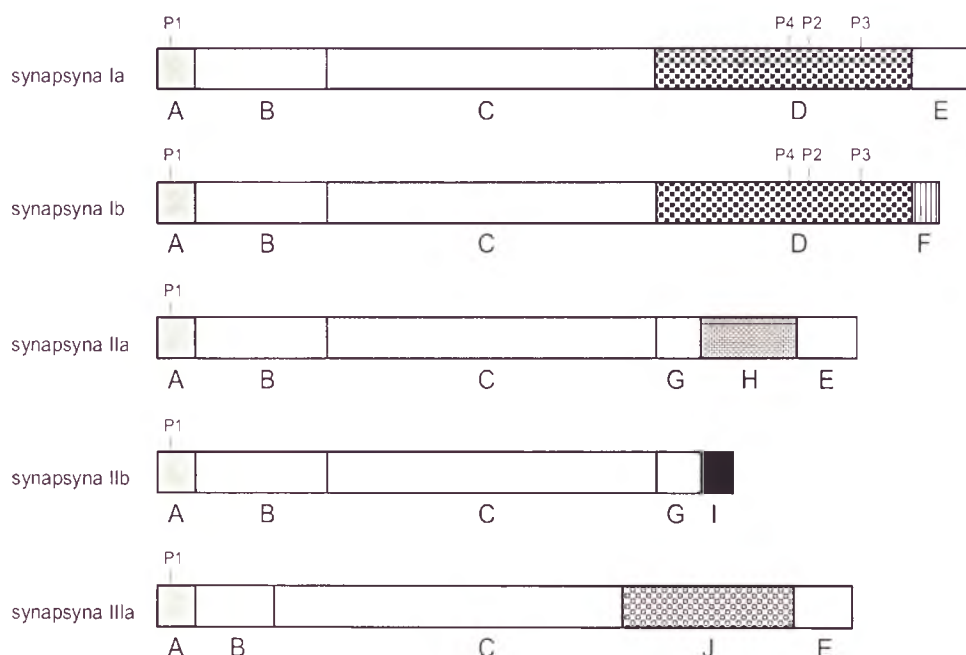
synapsyn I i II, jakkolwiek, białko to zawiera dodatkową domenę J, zlokalizowaną pomiędzy domenami C i E (Ryc. 2).

Podobieństwa między synapsynami w organizacji domen, poziomie ekspresji tych białek w różnych typach komórek nerwowych i ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji sugerują, że synapsyny biorą udział w regulacji transportu i uwalniania przekaźników nerwowych [10]; w procesach tych istotną rolę odgrywają oddziaływania synapsyn z błoną pęcherzyków synaptycznych, które są regulowane przez procesy fosforylacji, jony wapnia i prawdopodobnie przez ATP.

II-1. Oddziaływanie synapsyn z błoną pęcherzyków synaptycznych

W komórce nerwowej synapsyny są zasocjowane z błoną pęcherzyków synaptycznych [35]. Synapsyny Ia i Ib, w formie zdefosforylowanej, wiążą się *in vitro* z pęcherzykami synaptycznymi z wysokim powinowactwem (K_d 10 nM w 40 mM NaCl) i dużą wydajnością, co pozostaje w zgodzie z ilością endogennych synapsyn ulegających współocyszczeniu z pęcherzykami synaptycznymi [36]. W wyniku fosforylacji np. synapsyny I w miejscach P2 i P3 przez kinazę białkową II zależną od kalmoduliny (CaMPKII), następuje kilkukrotny spadek powinowactwa białka do pęcherzyków synaptycznych [36, 37].

Wiązanie wszystkich rodzajów synapsyn z błoną pęcherzyków synaptycznych jest wypadkową oddziaływań tych białek z fosfolipidami i z białkami



Ryc. 2. Domenowa budowa synapsyn. Literami A-J oznaczono domeny w cząsteczkach białek, zaś symbole P1-P4 oznaczają miejsca fosforylacji. Inne wyjaśnienia w tekście.

błonowymi [37]. Zaobserwowano bowiem, że wiązanie synapsyn z liposomami o określonym składzie lipidowym nie zmienia się pod wpływem fosforylacji. Wiązanie to jest specyficzne w stosunku do kwaśnych fosfolipidów: fosfatydyloseryny i fosfatydyloinozytolu. W wiązaniu bierze udział N-końcowa część białka. C-koniec cząsteczki, nie jest w stanie wiązać fosfolipidów, co sugeruje, że oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami aminokwasów w tym rejonie cząsteczki i ujemnie naładowanymi cząsteczkami kwaśnych fosfolipidów, nie są w tym przypadku wystarczające [37, 38]. Za to w oddziaływaniach synapsyn z białkami błonowymi bierze udział przede wszystkim C-końcowy rejon cząsteczki. Zaobserwowano, że oddziaływania białko-białko są w znacznym stopniu zahamowane w wyniku fosforylacji miejsc P1 i P3 w cząsteczkach synapsyn I [37, 38]. Wynika z tego, że procesy fosforylacji synapsyn odgrywają ważną rolę w regulacji ich aktywności biologicznej.

II-2. Regulacja funkcji synapsyn przez procesy fosforylacji i kalmodulinę

Zauważono, że w wyniku fizjologicznej lub farmakologicznej stymulacji komórki nerwowej, uwalnianie przekaźników nerwowych zależne od jonów wapnia zachodzi równolegle z regulowaną przez jony wapnia fosforylacją synapsyn [1, 39]. Synapsyny ulegają kilku cyklom fosforylacji i defosforylacji w obrębie zakończeń nerwowych, które są skorelowane z cyklami polaryzacji i depolaryzacji błony presynaptycznej [1]. Stwierdzono, że białka te są substratami kinazy białkowej A (PKA) i kinazy białkowej I zależnej od kalmoduliny (CaMPKI), które fosforylują resztę seryny w N-końcowym rejonie cząsteczek synapsyn (miejsce P1). Dodatkowo, synapsyny I są substratami kinazy CaMPKII, która fosforyluje dwie reszty seryny w C-końcowym rejonie cząsteczki (miejsca P2 i P3) [40] oraz kinazy białkowej MAP (MAPK), fosforylującej dwie reszty seryny w rejonie N-końcowym białka (miejsca P4 i P5) i jedną resztę seryny w rejonie C-końcowym (miejsce P6) [41]. Miejsca fosforylacji dla kinazy CaMPKII zlokalizowane są również w domenie J synapsyny IIIa [31].

Podatność synapsyn na fosforylację pozwala przypuszczać, że białka te biorą udział nie tylko w formowaniu i stabilizacji pęcherzyków synaptycznych, ale także w stabilizacji synaps oraz w procesie egzocytozy. Egzocytoza jest bowiem regulowana przez jony wapnia, ATP i procesy fosforylacji. Ważną cząsteczką efektorową dla Ca^{2+} w egzo-

cytozie jest m.in. kalmodulina. Regulacyjne działanie kalmoduliny polega na wiązaniu się tego białka z innymi, takimi jak kinazy białkowe, fosfatazy, białka cytoszkieletu i białka zasocjowane z pęcherzykami synaptycznymi oraz z błoną plazmatyczną. Głównym substratem kinaz białkowych zależnych od Ca^{2+} i kalmoduliny są synapsyny I. Kinazy białkowe ulegają aktywacji w wyniku depolaryzacji błony zakończeń nerwowych. Fosforylując różne białka, wpływają w ten sposób na rodzaj połączeń pomiędzy pęcherzykami synaptycznymi a cytoszkieletem [42-44]. Na inny mechanizm regulacji egzocytozy przez kalmodulinę wskazują wyniki badań, w których zaobserwowano bezpośrednie wiązanie kalmoduliny z synapsynami I. Wiązanie to zachodzi w obrębie N-końca cząsteczek synapsyn I, gdzie znaleziono dwa miejsca wiążące kalmodulinę o różnym powinowactwie do tego białka [45, 46]. Miejsce wiązania kalmoduliny zlokalizowano również w cząsteczkach synapsyn II [46]. Można na tej podstawie wysunąć przypuszczenie, że oddziaływania kalmodulina-synapsyny odgrywają rolę w regulacji aktywności biologicznej synapsyn. Jeszcze inny mechanizm regulacji aktywności tych białek może wynikać ze zdolności synapsyn do wiązania z ATP.

II-3. Wpływ jonów wapnia na oddziaływanie synapsyn z ATP

Analiza trzecio- i czwartorzędowej struktury domeny C synapsyn (na podstawie struktury krystalicznej [40]) dowodzi, że białka te są blisko spokrewnione z różnymi białkami zależnymi od ATP. Domena C synapsyn przypomina odpowiednie rejony w cząsteczkach niektórych enzymów wykorzystujących ATP, m.in. syntetazy glutationowej, ligazy D-alanina:D-alanina, karboksylazy biotynowej (łańcuch α) oraz syntetazy sukcyńlo-CoA (łańcuch β) [47]. Wymienione białka wiążą ATP i katalizują reakcję przenoszenia reszty fosforanowej z ATP na specyficzny substrat. Wielu badaczy przypuszcza, że synapsyny są zdolne do katalizowania podobnej reakcji [10-12].

Domena C w cząsteczkach synapsyn I i II stanowi miejsce wiązania ATP z wysokim powinowactwem (K_d 0.11-0.14 mM) [12, 12]. Synapsyny różnią się jednak między sobą regulacją wiązania ATP przez Ca^{2+} . Wiązanie ATP z synapsynami I jest stymulowane przez wzrost stężenia jonów wapnia ($K_{1/2}$ 5-7 M), podczas gdy nie obserwowano takiej zależności w przypadku wiązania ATP z synapsynami II [11, 12]. W przypadku synapsyny IIIa wykazano, że wiązanie ATP, w przeciwieństwie do synapsyn I, ulega zahamowaniu przez jony wapnia [10, 11]. W

wiązaniu ATP do synapsyn I bierze udział m.in. reszta glutaminy (Glu373), która w synapsynach II jest zastąpiona przez resztę lizyny (Lys374). Wydaje się zatem, że pojedyncza mutacja Glu373→Lys374, jest odpowiedzialna za utratę zależności wiązania ATP od wapnia przez synapsyny II [11, 12]. Synapsyna IIIa, podobnie jak inne synapsyny, charakteryzuje się wysokim powinowactwem do ATP, a prawie stukrotnie niższym w stosunku do ADP [10, 11]. Zatem ADP, które mogłoby się wytworzyć z ATP w cyklu katalitycznym synapsyn, może być łatwo wypierane z cząsteczki białka przez nowoprzyłączoną cząsteczkę nukleotydu, co przemawia za koncepcją, że synapsyny są enzymami wykorzystującymi ATP.

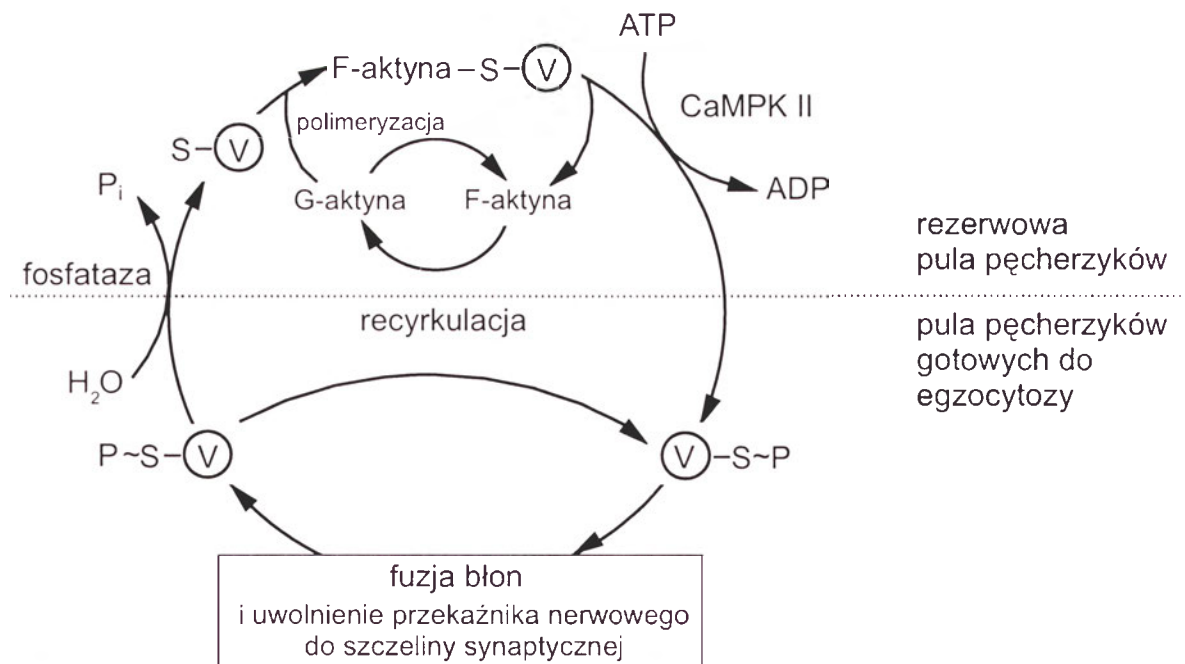
Różnice w regulacji aktywności synapsyn i wróżliwości tych białek na jony wapnia mogą świadczyć, że synapsyny, mimo dużych podobieństw budowy, nabyły w trakcie ewolucji zdolność do różnego reagowania na zmiany stężenia Ca^{2+} w komórkach nerwowych [10].

III. Oddziaływanie synapsyn z innymi białkami wiążącymi ATP

Inne mechanizmy regulacji aktywności synapsyn wynikają z ich zdolności do oddziaływania z białkami wiążącymi ATP. Zdefosforylowana forma synapsyn I wykazuje wysokie powinowactwo w stosunku do aktyny, wpływając na polimeryzację mono-

merów aktynowych, tworzenie filamentów i ich łączenie w wiązki [48, 49]. W wyniku fosforylacji miejsc P2 i P3 w cząsteczkach synapsyn I przez CaMPKII lub miejsc P1 i P4 przez PKA i MAPK zdolność ta zanika [50]. Efektem fosforylacji synapsyn I jest oddysocjowanie pęcherzyków synaptycznych od utrzymującego je cytoszkieletu [51, 52], co świadczy, że białka te mogą być odpowiedzialne za regulację ilości pęcherzyków synaptycznych pozostających w puli rezerwowej i tych które są przygotowane do uwolnienia swojej zawartości do szczeliny synaptycznej w trakcie egzocytozy [53] (Ryc. 3). Z zastosowaniem mikroskopii elektronowej wykazano, że synapsyny I mogą *in vitro* oddziaływać również z mikrotubulami, a miejsca wiązania tych struktur w cząsteczce białka zlokalizowano zarówno w N-, jak i C-końcowym rejonie synapsyn I [54].

W przypadku synapsyn II ilość informacji na temat aktywności biologicznej tych białek jest mniejsza, niż w przypadku synapsyn I. Wiąże się to z trudnościami podczas izolowania tych białek z tkanki nerwowej, a następnie ich oczyszczania. Trudności te wynikają z hydrofobowości synapsyn i ich podatności na proteolizę. Problem ten został ominięty przez nadekspresję synapsyny IIa w komórkach eukariotycznych, transfekowanych genem kodującym synapsynę IIa [55]. W wyniku tego zabiegu stwierdzono, że synapsyna IIa silnie wiąże się z pęcherzykami synaptycznymi [55] i filamentami aktynowymi



Ryc. 3. Schemat obrazujący udział synapsyn w kształtowaniu rezerwowej puli pęcherzyków synaptycznych i w regulacji procesu wymiany pęcherzyków pomiędzy rezerwową pulą pęcherzyków a pulą gotową do egzocytozy. Fosforylacja synapsyny (S-P) przez kinazę CaMPKII wywołuje dysocjację kompleksu tego białka (S) z F-aktyną oraz błoną pęcherzyka synaptycznego (V), i dezintegrację cytoszkieletu. Pęcherzyki pozbawione cytoszkieletu przechodzą z puli rezerwowej do puli pęcherzyków przygotowanych do egzocytozy. Defosforylacja synapsyny przez fosfatazę wywołuje odwrotny efekt. Powinowactwo synapsyny w stosunku do G-aktyny wzrasta, synapsyna wiąże się z aktyną, stymulując polimeryzację monomerów aktynowych (F-aktyna) i powstawanie wiązek filamentów aktynowych. Inne wyjaśnienia w tekście pracy.

[56]. W formie zdefosforylowanej synapsyna IIa stymuluje polimeryzację G-aktyny [43]. Fosforylacja synapsyny IIa przez PKA wywołuje zahamowanie oddziaływań tego białka z aktyną [43].

Inną rodziną białek, które są zdolne do wiązania z synapsynami I w sposób zależny od stężenia jonów wapnia, są aneksyny. Aneksyny charakteryzują się podobnym schematem budowy. Rdzeń tych białek (część C-końcowa), o zachowanej w ewolucji sekwencji aminokwasowej, tworzą powtarzające się domeny zbudowane z 72 reszt aminokwasowych, w obrębie których znajdują się 17-aminokwasowe sekwencje odpowiedzialne za wiązanie aneksyn z fosfolipidami i Ca^{2+} . Domena N-końcowa pełni funkcję regulatorową [57]. W mózgu ssaków zidentyfikowano trzy aneksyny: p68, p34 i p32 [58, 59]. Jedną z nich, aneksyna VI (p68), stanowi 0,3% wszystkich białek występujących w mózgu i zlokalizowana jest na cytoplazmatycznej powierzchni błony plazmatycznej komórek nerwowych [58]. Ostatnio wykazano, że zależne od jonów wapnia oddziaływanie aneksyny VI z F-aktyną [60] i z błonami [61] jest *in vitro* modulowane przez ATP w stężeniach fizjologicznych. Obserwacja ta sugeruje, że ATP może mieć szczególne znaczenie w regulacji funkcji aneksyny VI *in vivo* [17-19]. Aneksyna VI wiąże się z N-końcowym rejonem cząsteczki synapsyny I [62]. Wiązanie aneksyny VI z synapsyną ulega zahamowaniu w wyniku fosforylacji synapsyny przez kinazę białkową zależną od cAMP i przez kinazę CaMPKII [62].

Znaczenie oddziaływań aneksyny VI i synapsyn jest niejasne. Ponieważ synapsyny I odznaczają się zdolnością wiązania ze spektryną [63, 64], mikrotybulami [64, 65] i neurofilamentami [66], wysunięto przypuszczenie, że aneksyna VI odgrywa rolę w oddziaływaniach synapsyn z wymienionymi białkami i strukturami komórkowymi w zakończeniach nerwowych. Inną możliwością jest modulacja przez aneksynę VI aktywności zlokalizowanej w cytosolu synapsyny I jako kinazy diacyloglicerolowej [67].

IV. Uwagi końcowe

Obecnie prowadzone badania nad strukturą i właściwościami biochemicznymi synapsyn mają na celu wyjaśnienie molekularnego mechanizmu ich aktywności biologicznej. Jenym z kierunków rozwijanych obecnie na świecie reprezentują badania właściwości domeny C2 w cząsteczce synapsyn. Stwierdzono np., że domena C2 odpowiada za tworzenie homo- i heterodimerów synapsyn w komórce nerwowej [68]. W celu poznania funkcji, jakie pełnią

te białka, wyhodowano również myszy "knock-out", u których brak jest syntezy albo synapsyn I, albo synapsyn II, albo obu rodzajów białek jednocześnie [28]. Tak otrzymane zwierzęta są płodne i zdolne do życia, ale stwierdza się u nich występowanie ataków epilepsji. Mózgi tych zwierząt odznaczają się normalnym kształtem, rozmiarem i strukturą. Jednak na poziomie molekularnym zaobserwowano znaczny spadek białek w pęcherzykach synaptycznych i 50% spadek liczby tych pęcherzyków [28].

W podsumowaniu należy wyrazić przekonanie, że w przyszłości badania synapsyn doprowadzą do wyjaśnienia fizjologicznej roli tych białek w układzie nerwowym. Dotychczas zgromadzone dane doświadczalne pozwalają na stwierdzenie, że synapsyny są białkami receptorowymi dla ATP w komórkach nerwowych, w różny sposób regulowanymi przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, odgrywającymi rolę w procesie wydzielania przekaźników nerwowych. Wyjaśnienia wymaga problem, czy synapsyny są enzymami biorącymi udział w przenoszeniu reszty fosforanowej na określone substraty oraz identyfikacja tych substratów.

Podziękowanie

Praca dofinansowana z grantu KBN 6 P04A 027 14.

Artykuł otrzymano 25 lutego 1999 r.

Zaakceptowano do druku 16 czerwca 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Südhof (1995) *Nature (Londyn)* **375**: 645-653
2. Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1998) *Acta Biochim Polon* **43**: 721-733
3. Burgoyne R D, Morgan A (1995) *Trends Neurosci* **18**: 191-196
4. Martin T F J (1997) *Trends Cell Biol* **7**: 271-276
5. Cremona O, De Camilli P (1997) *Curr Opin Neurobiol* **7**: 323-330
6. Litwa M, Bandorowicz-Pikuła J (1997) *Kosmos* **46**: 587-595
7. Edwards F A (1994) *Curr Opin Neurobiol* **4**: 347-352
8. Zimmermann H (1994) *Trends Neurosci* **17**: 420-426
9. Conigrave A D, Jiang L (1995) *Cell Calcium* **17**: 111-119
10. Esser L, Wang C R, Hosaka M, Smagula S, Südhof T, Deisenhofer J (1998) *EMBO J* **4**: 977-984
11. Hosaka M, Südhof T C (1998) *J Biol Chem* **273**: 1425-1429
12. Hosaka M, Südhof T C (1998) *J Biol Chem* **273**: 13371-13374
13. Walker J E, Saraste M, Runswick M J, Gay N J (1982) *EMBO J* **1**: 945-951
14. Schultz G E (1992) *Curr Opin Struct Biol* **2**: 61-67
15. Traut T W (1994) *Eur J Biochem* **222**: 9-19
16. Hilgemann D W (1997) *Annu Rev Physiol* **59**: 193-220
17. Szezechy A, Pikuła S (1998) *Biochim Biophys Acta* **1365**: 333-353
18. Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1997) *Post Biochem* **43**: 111-119

19. Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1998) *Acta Biochim Polon* **43**: 735-744
20. Pollard H B, Caohuy H, Minton A P, Srivastava M (1998) *Adv Pharmacol* **42**: 81-87
21. Ferreira A, Han H Q, Greengard P, Kosik K S (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9225-9229
22. Takei Y, Harada A, Takeda S, Kobayashi K, Terada S, Noda T, Takahashi T, Hirokawa N (1995) *J Cell Biol* **131**: 1789-1800
23. Lu B, Czernik A J, Popov S, Wang T, Poo M M, Greengard P (1996) *Neuroscience* **74**: 1087-1097
24. Fletcher T, Cameron P, De Camilli P, Banker G (1991) *J Neurosci* **11**: 1617-1626
25. Greengard P, Valtorta F, Czernik A J, Benfenati F (1993) *Science* **259**: 780-785
26. Rosahl T W, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer R E, Malenka R C, Südhof T C (1993) *Cell* **75**: 661-670
27. Rosahl T W, Spillane D, Missler M, Herz J, Seelig D K, Wolff J R, Hammer R E, Malenka R C, Südhof T C (1995) *Nature (Londyn)* **375**: 488-493
28. Ryan T A, Li L, Chin L S, Greengard P, Smith S J (1996) *J Cell Biol* **134**: 1219-1227
29. Südhof T C, Czernik A J, Kao H, Takei K, Johnston P A, Horiuchi A, Wagner M, Kanazir S D, Perin M, DeCamilli P, Greengard P (1989) *Science* **245**: 1474-1480
30. Südhof T C (1990) *J Biol Chem* **265**: 7849-7852
31. Kao H T, Porton B, Czernik A J, Feng J, Yiu G, Haring M, Benfenati M, Greengard P (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4667-4672
32. Yang-Feng T L, De Gennaro L J, Francke U (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8679-8683
33. Li X, Rosahl T W, Südhof T C, Francke U (1985) *Cytogenet Cell Genet* **71**: 301-305
34. Li L, Chin L-S, Greengard P, Copeland N G, Gilbert D J, Jenkins N A (1995) *Genomics* **28**: 365-366
35. Ho M F, Bahler M, Czernik A J, Schiebler W, Kezdy F J, Kaiseer E T, Greengard P (1991) *J Biol Chem* **266**: 5600-5607
36. Valtorta F, Benfenati F, Greengard P (1992) *J Biol Chem* **267**: 7195-7198
37. Benfenati F, Valtorta F, Rubenstein J L, Grelllick F S, Greengard P, Czernik A J (1992) *Nature (Londyn)* **359**: 417-420
38. Benfenati F, Greengard P, Brunner J, Böhler M (1989) *J Cell Biol* **108**: 1851-1862
39. Liu J P (1997) *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**: 611-618
40. De Camilli P, Benfenati F, Valtorta F, Greengard P (1990) *Annu Rev Cell Biol* **6**: 433-460
41. Jovanovic J N, Benfenati F, Siow Y L, Sihra T S, Sanghera J S, Pelech S L, Greengard P, Czernik A J (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3679-3683
42. Iwata S I, Hewlett G H, Ferrell S T, Kantor L, Gnegy M E (1997) *J Pharmacol Exp Ther* **283**: 1445-1452
43. Niclander H B, Onofri F, Schaeffer E, Menegon A, Fesce R, Valtorta F, Greengard P, Benfenati F (1997) *Eur J Neurosci* **9**: 2712-2722
44. Sihag R K (1998) *J Neurochem* **71**: 2220-2228
45. Goold R, Baines A J (1994) *Eur J Biochem* **224**: 229-240
46. Nicol S, Rahman D, Baines A J (1997) *Biochemistry* **36**: 11487-11495
47. Wang W, Kappock T J, Stubbe J, Ealick S E (1998) *Biochemistry* **37**: 15647-15662
48. Benfenati F, Valtorta F, Chieriegatti E, Greengard P (1992) *Neuron* **8**: 377-386
49. Qualmann B, Roos J, DiGregorio P J, Kelly R B (1999) *Mol Biol Cell* **10**: 501-513
50. Valtorta F, Greengard P, Fesce R, Chieriegatti E, Benfenati F (1992) *J Biol Chem* **267**: 11281-11288
51. Benfenati F, Valtorta F, Rossi M C, Onofri F, Sihra T, Greengard P (1993) *J Cell Biol* **123**: 1845-1855
52. Ceccaldi P-E, Grohovaz F, Benfenati F, Chieriegatti E, Greengard P (1995) *J Cell Biol* **128**: 905-912
53. Sheridan K M, Maltese W A (1998) *J Mol Neurosci* **10**: 121-128
54. Bennett A F, Hayes N V, Baines A J (1991) *Biochem J* **276**: 793-799
55. Siow Y L, Chilcote T J, Benfenati F, Greengard P, Thiel G (1992) *Biochemistry* **31**: 4268-4275
56. Chilcote T J, Siow Y L, Schaeffer E, Greengard P, Thiel G (1994) *J Neurochem* **63**: 1568-1571
57. Gerke V, Moss S E (1997) *Biochim Biophys Acta* **1357**: 129-154
58. Woolgar J A, Boustead C M, Walker J H (1990) *J Neurochem* **54**: 62-71
59. Bazzi M D, Nelsetsuen G L (1991) *Biochemistry* **30**: 971-979
60. Bandorowicz-Pikuła J, Awasthi Y C (1997) *FEBS Lett* **409**: 300-306
61. Bandorowicz-Pikuła J, Pikuła S (1998) *Biochimie* **80**: 613-620
62. Inui M, Watanabe T, Sobue K (1994) *J Neurochem* **63**: 1917-1923
63. Baines A J, Bennett V (1985) *Nature (Londyn)* **315**: 410-413
64. Okabe T, Sobue K (1987) *FEBS Lett* **213**: 184-188
65. Baines A J, Bennett V (1986) *Nature (Londyn)* **319**: 145-147
66. Steiner J P, Ling E, Bennett V (1987) *J Biol Chem* **262**: 905-914
67. Kahn D N, Besterman J M (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6137-6141
68. Hosaka M, Südhof T C (1999) *J Biol Chem* **274**: 16747-16753

Zaburzenia budowy i funkcji receptora leptyny — jedna z przyczyn otyłości ?

Disorders of the leptin receptor structure and function — one of the causes of obesity ?

ARETA PANKIEWICZ¹, JULIAN ŚWIERCZYŃSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Budowa receptora leptyny
- III. Lokalizacja narządowa
- IV. Sygnalizacja z udziałem receptora leptyny (Ob-R)/kinaz tyrozynowych Janusa (JAK)/czynn timerów transkrypcyjnych aktywowanych przez kinazy tyrozynowe Janusa (STAT)
- V. Receptor leptyny a otyłość

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of the leptin receptor
- III. Organ localization
- IV. Mechanism of leptin receptor function — signalization through leptin receptor (Ob-R) / Janus tyrosine kinase (JAK) / signal transducer and activator of transcription (STAT) participation
- V. Leptin receptor and obesity

Wykaz stosowanych skrótów: Ob-R — receptor leptyny; JAK — kinaza tyrozynowa Janusa (*ang. Janus protein kinase*); STAT — czynn timerów transkrypcyjne aktywowane w wyniku fosforylacji przez kinazy JAK (*ang. signal transducer and activator of transcription*); CHO — komórki jajnika chomika chińskiego (*ang. Chinese hamster ovary*); IL-6 — interleukina-6; G-CSF — czynn timerów stymulujący kolonie granulocytów (*ang. granulocyte colony stimulating factor*); EPO-R — receptor erytropoetyny (*ang. erythropoietin receptor*); GH-R — receptor hormonu wzrostu (*ang. growth hormone receptor*); CK — receptor cytokin (*ang. cytokine receptor*); F3 — fibronektyna typu 3 (*ang. fibronectin type 3*); cDNA — komplementarny DNA; SGLT1 — zależny od jonów sodowych transporter glukozy 1 (*ang. sodium glucose transporter 1*).

I. Wstęp

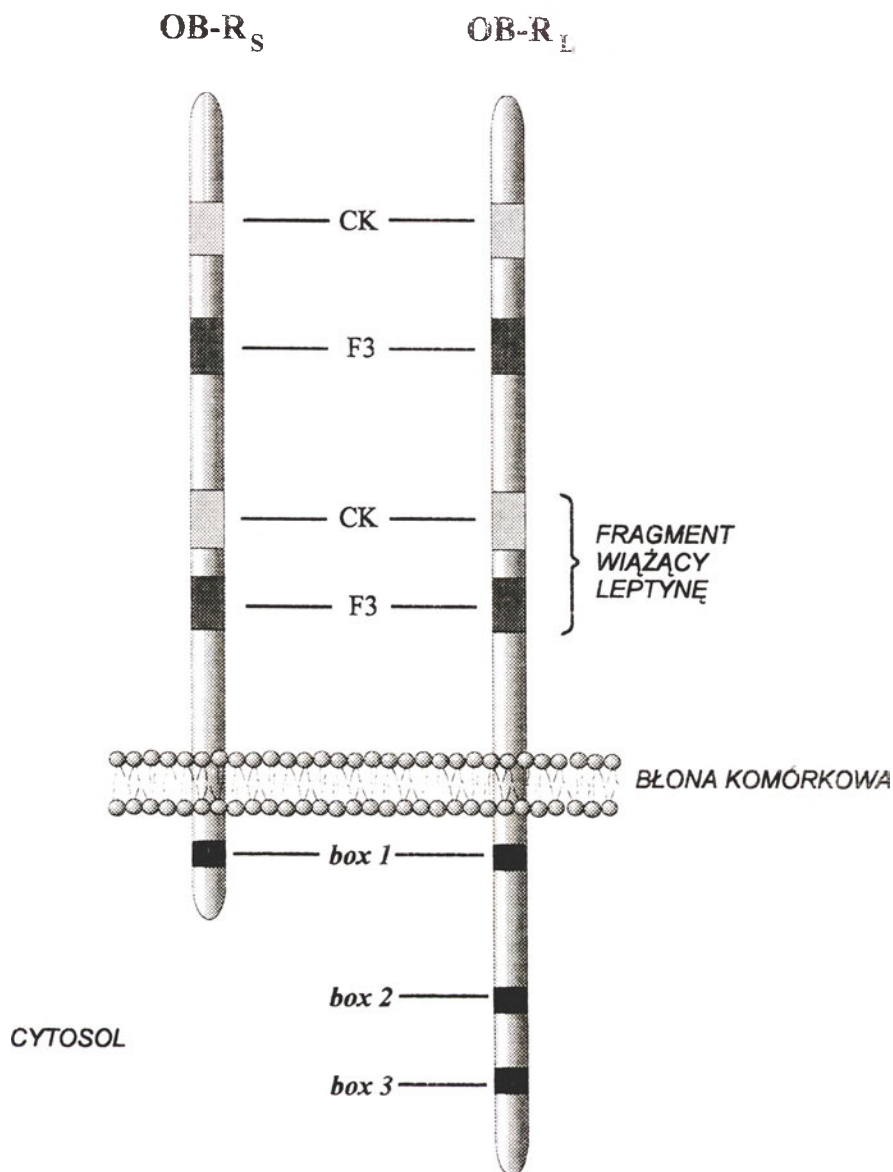
Otyłość jest wynikiem braku równowagi pomiędzy ilością energii pobieranej przez organizm, a ilością energii przez niego wydatkowanej. Przy długotrwałym dodatnim bilansie energetycznym nadmiar pobranej energii jest gromadzony w postaci tłuszczu. Stan ten warunkowany jest przez wiele czynników, jednak jego przyczyną jest najczęściej niewłaściwa dieta i brak ruchu. Otyłość ma także podłoże genetyczne.

Rewolucją w badaniach nad otyłością było odkrycie leptyny. Hormon ten odgrywa istotną rolę w kontrolowaniu zapasów tłuszczu w organizmie, regulacji apetytu i wydatkowania energii [1, 2]. Leptyna jest białkiem o masie cząsteczkowej około 16 kDa, kodowanym przez gen *ob* [3]. Wydzielana przez tkankę tłuszczową do krwi jest transportowana do mózgu. Tam, działając na podwzgórze, powoduje zahamowanie syntezy i sekrecji neuropeptydu Y co obniża łaknienie [4-7] i może doprowadzić do spadku masy ciała. Mutacja w genie *ob* jest przyczyną niedoboru leptyny, nadprodukcji neuropeptydu Y, zwiększenia łaknienia, wzmożonego spożycia pokarmu, a w konsekwencji wzrostu masy ciała. Podanie leptyny otyłym myszom *ob/ob* odwraca te efekty [5, 6, 8]. Jednak nie we wszystkich przypadkach otyłości u myszy takie postępowanie jest skuteczne. Podobnie jest u szczurów *fa/fa* i u niektórych ludzi. Podanie im leptyny nie przynosi pożądanych skutków [5, 9, 10]. Powodem tego mogą być zaburzenia w budowie i działaniu receptora leptyny.

II. Budowa receptora leptyny

W 1995 r. Tartaglia i wsp. [11] stosując białko fuzyjne, będące połączeniem leptyny i alkalicznej fosfatazy, odkryli w splocie naczyńiówkowym myszy „miejsca” wiążące leptynę. Po skonstruowaniu biblioteki cDNA z tego narządu zidentyfikowali oni receptor leptyny, Ob-R (LR).

¹Mgr, ²Prof. dr hab., Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk



Ryc. 1. Schemat budowy receptora leptyny.

Ob-R jest jednym z receptorów rodziny cytokin klasy I [11, 12]. Kodowany jest przez gen *db*, u myszy zlokalizowany w chromosomie 4, a u ludzi w chromosomie 1 [11, 13]. U szczurów gen *ten*, zwany genem *fa*, położony jest w chromosomie 5 [9, 14]. Strukturalnie receptor leptyny podobny jest między innymi do podjednostki gp130 receptora IL-6, oraz receptorów G-CSF, GH-R i EPO-R [11, 15, 16]. Do tej pory zidentyfikowano kilka izoform Ob-R, które powstają w wyniku alternatywnego składania transkryptu. Jedną z nich, oznaczaną jako forma Ob-R_L (czasem jako Ob-R_B lub LR-LF, *leptin receptor-long form*), zawiera cytoplazmatyczny fragment zbudowany z 303 aminokwasów. W przypadku pozostałych izoform, zwanych Ob-R_{S1, 2, 3} (inaczej Ob-R_{A, C, D} lub LR-IF, *leptin receptor-intermediate form*), fragment ten jest zbudowany z 34 aminokwasów. Występuje on w receptorach leptyny Ob-R_L i Ob-R_{S1,2,3} a jego struktura I-rzędowa jest identyczna (Ryc. 1). Ob-R_L i Ob-R_S mają również identyczny

zwnętrzkomórkowy fragment zbudowany z 816 aminokwasów, w którym znajduje się miejsce wiążące leptynę (Ryc. 1). Podobnie jak i w innych receptorach cytokin klasy I za wiązanie leptyny odpowiedzialne są dwie, następujące po sobie sekwencje aminokwasowe określone jako CK i F3 [17]. Domeny te zawierają odpowiednio: cztery reszty cysteino-we oraz motyw aminokwasowy WSXWS. Cechą charakterystyczną receptora leptyny jest obecność dwóch układów domen CK-F3, przy czym za wiązanie liganda odpowiada ten znajdujący się bliżej błony plazmatycznej. Pozostałe receptory należące do tej klasy zawierają po jednej sekwencji CK-F3 [17]. Wszystkie izoformy receptora leptyny zawierają jedną sekwencję transbłonową. Wyjątkiem jest tzw. forma rozpuszczalna receptora (Ob-R_E lub LR-SF, *leptin receptor-short form*). Tylko Ob-R_L ma wszystkie elementy niezbędne do przekazywania sygnału do wnętrza komórki [11, 12, 18]. Funkcja pozostałych izoform nie jest dotąd poznana. Występo-

wanie tak wielu form receptora może sugerować iż spełniają one wiele różnych funkcji fizjologicznych.

Przedstawione powyżej dane dotyczą receptorów leptyny u myszy. Stwierdzono jednak wysoki stopień homologii międzygatunkowej receptorów leptyny. Wynosi on przykładowo 71% dla domen cytoplazmatycznych i 78% dla domen zewnątrzkomórkowych receptorów Ob-R_L człowieka i myszy [11, 19].

III. Lokalizacja narządowa receptorów leptyny

Obecność mRNA receptora leptyny wykryto w wielu narządach [11, 12, 20-24] (Tabela 1). Najwyższy stosunek ilości mRNA OB-R_L / mRNA Ob-R_{S1} występuje w podwzgórzu, jednak największa ilość bezwzględna mRNA Ob-R_L znajduje się w płucach [22]. Leptyna wywołuje różną odpowiedź fizjologiczną w komórkach tkanki tłuszczowej (zarówno brunatnej jak i żółtej) [25, 26] oraz takich narządów jak trzustka [27 — 31], układ krwiotwórczy [32], wątroba [33], jelito [24]. W żółtej tkance tłuszczowej (zwanej także białą tkanką tłuszczową, WAT od *ang. white adipose tissue*) leptyna stymuluje hamowaną przez insulinę lipolizę, hamuje lipogenezę poprzez wpływ na ekspresję genu karboksylazy acetylo-CoA, hamuje kinazę białkową A oraz transport glukozy [25, 26, 34]. W komórkach brunatnej tkanki tłuszczowej zwiększa stymulowane insuliną zużycie glukozy oraz ekspresję genów kodujących enzym jableczanowy i lipazę lipoproteinową [26]. Wpływa na proliferację komórek β wysp Langerhansa trzustki i hamuje wydzielanie przez nie insuliny [27 — 31]. W nadnerczach hamuje wydzielanie kortyzolu i aldosteronu [35, 36]. W wątrobie oraz układzie krwiotwórczym efekty działania leptyny przypomi-

nają te wywoływane przez IL-6. Są to odpowiednio: w wątrobie indukcja ekspresji białek ostrej fazy, a w układzie krwiotwórczym proliferacja i różnicowanie komórek [32]. W dojrzałych makrofagach stymuluje produkcję cytokin oraz nasila fagocytozę [33]. Za pośrednictwem receptora na powierzchni komórek śródbłonka naczyń krwionośnych leptyna stymuluje angiogenezę [37]. Powoduje także zahamowanie ekspresji genu apolipoproteiny AIV w komórkach nabłonka jelita [38]. W izolowanych fragmentach jelita po podaniu leptyny do środowiska inkubacyjnego następuje zahamowanie transportu węglowodanów (galaktozy) do wnętrza enterocytów. Leptyna stymuluje w makrofagach produkcję cytokin, które prawdopodobnie pośredniczą w zahamowaniu aktywności transportera SGLT1 odpowiedzialnego za pobieranie węglowodanów przez enterocyty [24]. Leptyna wpływa więc na metabolizm energetyczny nie tylko za pośrednictwem układu nerwowego ale także działając bezpośrednio na wiele narządów i tkanek. Nie wiadomo jednak dokładnie, który z receptorów leptyny bierze udział w wyżej opisanych procesach, ani jaki jest związek tych oddziaływań z utrzymywaniem równowagi energetycznej organizmu.

Najmniej informacji ukazało się na temat rozpuszczalnej formy receptora leptyny. Wiadomo, że jest to glikoproteina zbudowana z 805 aminokwasów. Strukturalnie odpowiada domenie zewnątrzkomórkowej form Ob-R_L i Ob-R_S receptora leptyny [12, 21]. Prawdopodobnie powstaje jako produkt translacji odpowiedniego mRNA, a nie proteolizy innych form Ob-R [22]. Największe ilości tego receptora występują w osoczu, a syntetyzowany jest on w wielu narządach. Przypuszcza się, że rozpuszczalna forma receptora leptyny odpowiada za transport leptyny

Tabela 1

Izofomy receptora leptyny i ich lokalizacja narządowa

Izofорма	Nazewnictwo	Lokalizacja narządowa
długa	OB-R _L ; OB-R _B ; LR-LF	Podwzgórze, spłot naczyńiówkowy, węzły chłonne, płuca, tkanka tłuszczowa, nerki, wątroba, łożysko, nadnercza
krótka	OB-R _{S1, 2 lub 3} OB-R _{A, C lub D} ; LR-IF	Podwzgórze, spłot naczyńiówkowy, węzły chłonne, płuca, tkanka tłuszczowa, nerki, wątroba, łożysko, nadnercza, śledziona, jelito, trzustka, kora mózgowa, jelito, serce, komórki układu krwiotwórczego, komórki śródbłonka naczyń krwionośnych
rozpuszczalna	OB-R _L ; LR-SF	Osocze

we krwi [12, 22, 39]. Syntetyzowana przez komórki tłuszczowe leptyna jest uwalniana do krwi, gdzie wiąże się ze specyficznymi białkami. Proponuje się, że białka te to właśnie rozpuszczalne formy receptora leptyny, a związanie leptyny powoduje zahamowanie jej biologicznej aktywności. [39, 40]. U osób otyłych obserwuje się wzmożone wydzielanie leptyny do krwi. Jest jej wówczas zbyt dużo by cała pula mogła zostać związana z białkami, więc nadmiar pozostaje w formie wolnej (aktywnej). U osób szczupłych stężenie leptyny we krwi jest niskie. W takiej sytuacji praktycznie cała pula hormonu występuje we krwi w postaci związanej, a więc nieaktywnej. Nieaktywna leptyna nie może hamować produkcji neuropeptydu Y przez neurony podwzgórza [39].

Wraz z krwią hormon transportowany jest do mózgu. Tu, aby mógł związać się z receptorami w podwzgórzu, musi przedostać się przez barierę krew-mózg. Ponieważ w mózgu nie wykryto mRNA leptyny, prawdopodobnie cała jej pula pochodzi z poza centralnego układu nerwowego [41]. Rozważa się dwie możliwości transportu leptyny do płynu mózgowo-rdzeniowego. Jedną z nich to transport za pomocą receptorów zlokalizowanych w śplocie naczyniówkowym i oponach miękkich. Są to receptory typu Ob-R_{S1} [11, 12]. Drugą to transport z krwi do mózgu poprzez śródbłonek naczyń włosowatych, prawdopodobnie również za pośrednictwem receptora leptyny [42]. Po przedostaniu się przez barierę krew-mózg leptyna może działać bezpośrednio na neurony podwzgórza. Obecność mRNA receptorów leptyny, głównie Ob-R_L, stwierdzono we wszystkich rejonach podwzgórza odpowiedzialnych za utrzymywanie homeostazy energetycznej. Dotyczy to zwłaszcza jądra łukowatego, którego neurony produkują neuropeptyd Y [43].

IV. Mechanizm działania receptora leptyny — sygnalizacja z udziałem receptora leptyny (Ob-R_L)/kinaz tyrozynowych Janusa (JAK)/czynn timerów transkrypcyjnych aktywowanych przez kinazy tyrozynowe Janusa (STAT)

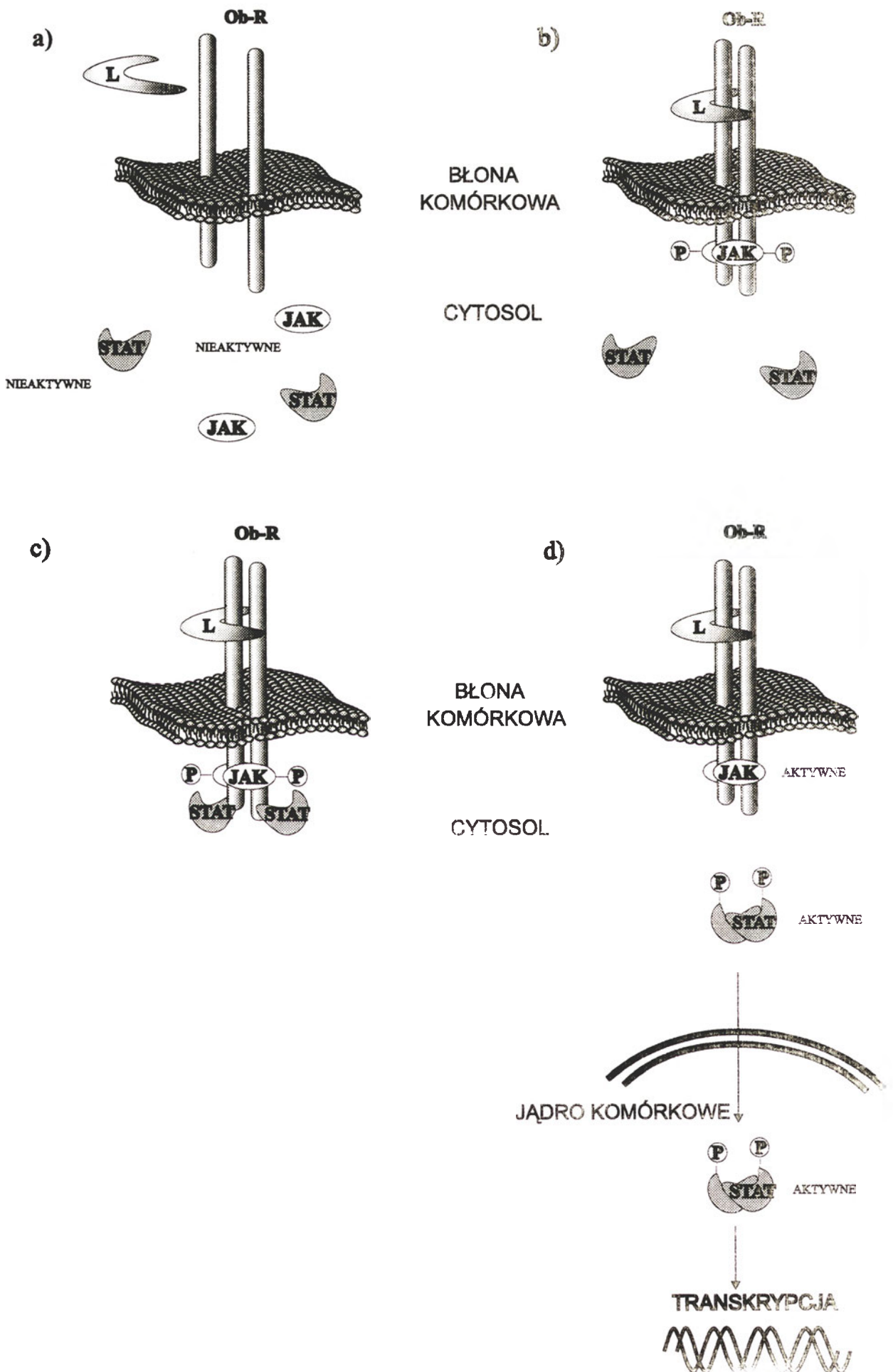
Z względu na zdolność przekazywania sygnałów do wnętrza komórek najwięcej uwagi poświęca się receptorowi Ob-R_L. Podobnie jak wiele innych receptorów cytokin klasy I, nie wykazuje on własnej wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej. Pewne fragmenty cząsteczki receptora wykazują jednak zdolność wiązania kinaz JAK. Fragmenty te określane są jako *box1* i *box2* (Ryc. 1) [44]. *box1* znajduje się w domenie wewnątrzkomórkowej, w części

położonej blisko błony cytoplazmatycznej w związku z tym obecny jest formach Ob-R_L i Ob-R_{S1,2,3}. *box2* położony jest bliżej końca C i obecny jest tylko w receptorze Ob-R_L.

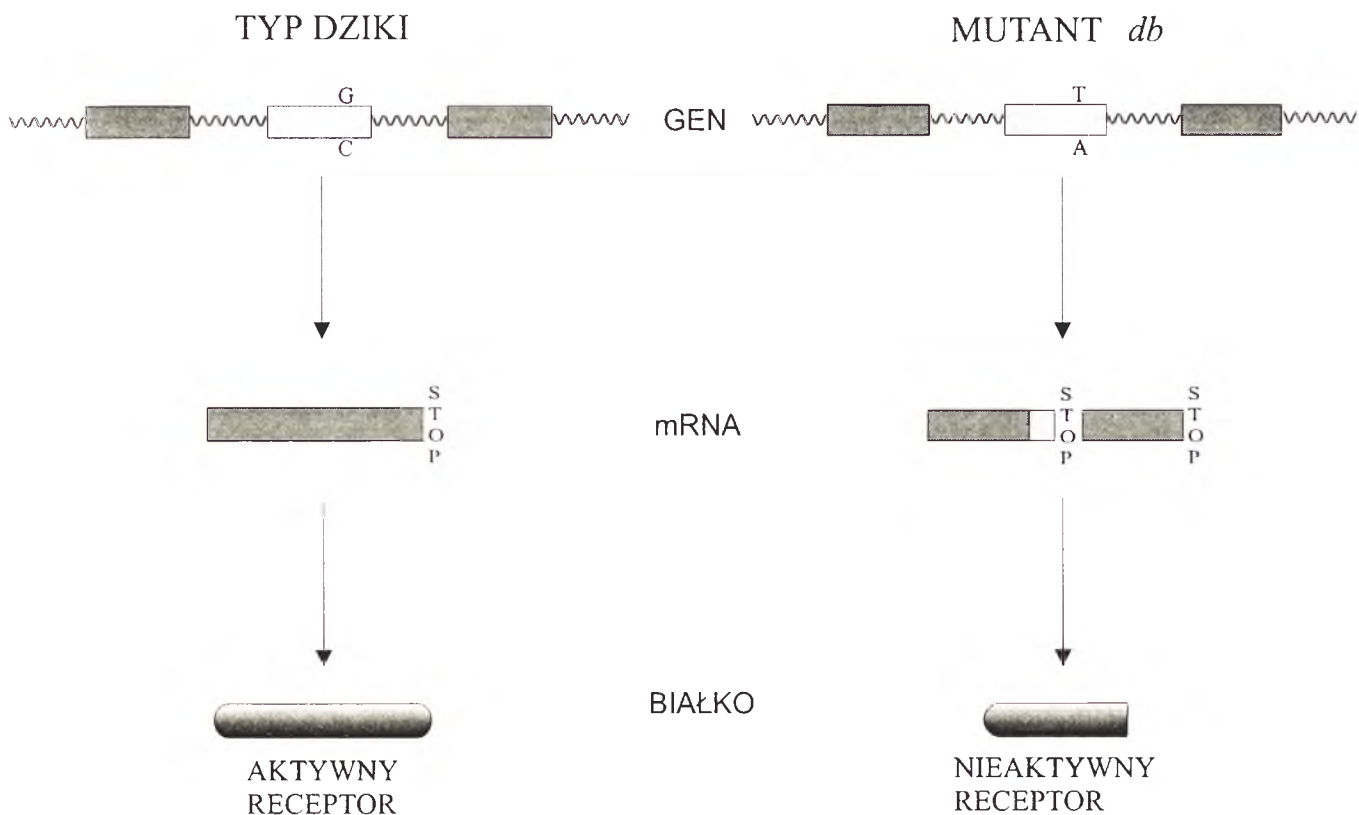
Proponuje się następujący przebieg procesu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej z udziałem Ob-R/JAK/STAT, który schematycznie przedstawiono na rycinie 2. Związaniu leptyny przez receptor towarzyszy multimeryzacja (prawdopodobnie homodimeryzacja) jego cząsteczek [45] (Ryc. 2a, 2b), przyłączenie cząsteczek kinaz JAK oraz ich aktywacja (Ryc. 2b). Zaktywowane kinazy fosforylują następnie reszty tyrozynowe znajdujące się w obrębie sekwencji *box3* w cząsteczkach receptora [46]. Stwarza to możliwość dołączenia do tych sekwencji aktywatorów transkrypcji, z rodziny białek STAT (Ryc. 2c). Białka te również ulegają fosforylacji przez kinazy JAK, a następnie tak zaktywowane, w formie homodimerów przemieszczają się do jądra komórkowego tam regulując proces transkrypcji (Ryc. 2d). Dotyczy to czynników STAT 1, 3, 5, 6 [15, 44, 46, 47]. Przedstawiony powyżej mechanizm działania nie jest jedynym proponowanym przez badaczy. Według jednej z hipotez związanie leptyny przez receptor nie powoduje jego oligomeryzacji a zmianę konformacji już istniejącego multimeru [17]. Udział w sygnalizacji komórkowej przypisuje się głównie receptorowi Ob-R_L. Publikowane są też dane świadczące o możliwości aktywowania JAK także przez inne niż Ob-R_L formy receptora [48, 49].

V. Receptor leptyny a otyłość

Dowodzony został związek mutacji w kodującym leptynę genie *ob* u myszy [3], a ostatnio także i u ludzi [50] z występowaniem otyłości. Nie wszystkie przypadki otyłości można jednak wyjaśnić uszkodzeniem tego genu, co więcej wykazano istnienie innych genów odpowiedzialnych za regulację masy ciała [1, 2]. Jednym z nich jest gen kodujący receptor leptyny [11]. Odkryto występowanie wielu mutacji w tym genie, ale ich związek z rozwojem otyłości nie jest do końca jasny. Najlepiej poznana mutacją genu receptora leptyny jest mutacja *db* u myszy. U myszy *db/db* w eksonie kodującym fragment C-terminalny cząsteczki receptora Ob-R_L występuje transwersja G→T. Prowadzi to do powstania nowego miejsca składania eksonów w transkrypcie, a jednocześnie do powstania nowego kodonu zatrzymującego translację. Skutkiem tego jest przedwczesne zakończenie syntezy białka, a tym samym powstanie krótszego produktu (Ryc. 3). Taki receptor zawiera domenę cytoplazmatyczną zbudowaną z 34



Ryc. 2. Proponowany mechanizm przekazywania sygnałów z udziałem receptora leptyny (L — leptyna).



Ryc. 3. Składanie eksonów oraz powstawanie różnych produktów białkowych u myszy typu dzikiego i mutantów *db/db*.

aminokwasów, jest więc taki sam jak receptor typu Ob-R_{S1} i tak jak on nie wykazuje zdolności aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT. Fragmenty odpowiedzialne za wiązanie leptyny pozostają niezmienione [12, 18].

U szczurów gen kodujący receptor leptyny oznaczono jako *fa* [9, 51]. W genie *fa* odkryto transwersję AC prowadzącą do zmiany aminokwasu w sekwencji białka — Gln269Pro [52]. Mutacja ta może występować we wszystkich izoformach receptora leptyny u szczurów *fa/fa* i powodować zmianę struktury drugorzędowej białka. Nie zaobserwowano przy tym jednak ani istotnych zaburzeń ekspresji genu, ani też zmiany powinowactwa receptora do leptyny [52]. Sprawdzone także czy mutacja *fa* wpływa na ilość cząsteczek receptora leptyny w błonie komórkowej. Wprowadzenie genu *fa* do komórek COS1 spowodowało zmniejszenie ilości cząsteczek receptora na powierzchni tych komórek [53]. Jednak nie to prawdopodobnie jest przyczyną nieprawidłowego działania receptora. W komórkach CHO ze zmutowanym genem *fa*, pomimo nadprodukcji receptora leptyny, występują zaburzenia przekazywania sygnału. W związku z tym, że transwersja AC zlokalizowana jest we fragmencie genu kodującym domenę C-terminalną można przypuszczać, iż zaburza ona tworzenie

multimerów receptora, niezbędnych do prawidłowego jego działania [54].

Wyniki badań genu kodującego receptor leptyny u ludzi nie pozwalają wyciągnąć jednoznacznych wniosków dotyczących zależności pomiędzy zmianami w sekwencji nukleotydowej genu, a występowaniem otyłości. U osób otyłych można zaobserwować niższe stężenie leptyny w płynie mózgowo-rdzeniowym niż w surowicy krwi [55]. Świadczyć to może o zaburzeniach transportu leptyny przez barierę krew-mózg.

W trakcie badań struktury genu receptora leptyny odkryto kilka wariantów sekwencji nukleotydowej eksonów i intronów. Niektóre z nich prowadzą do zmian aminokwasów w leptynie. W żadnym wypadku nie wykazano jednak wpływu na jej działanie [56-58]. Nie znaleziono mutacji nonsensownych, przesunięcia ramy odczytu, delecji czy też insercji. Nie potwierdzono również wpływu żadnej z występujących mutacji punktowych na powstanie nowego miejsca składania eksonów, tak jak ma to miejsce u myszy *db/db*. Odkryte warianty alleliczne występują z niemal równą częstością u osób otyłych i szczupłych [57]. Powyższe dane sugerują, że otyłość u ludzi jest w niewielkim stopniu związana z mutacjami w genie kodującym receptor leptyny.

Podziękowania

Autorzy dziękują Panu Prof. dr hab. Mariuszowi M. Żydowo z Katedry i Zakładu Biochemii AMG za cenne wskazówki w czasie redagowania pracy. Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez KBN 4PO5D 08612.

Artykuł otrzymano 23 listopada 1998 r.
Zaakceptowano do druku 27 kwietnia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Friedman J M, Halaas J L (1998) *Nature* **395**: 763-770
2. Świerczyński J, Kochan Z, Karbowska J (1997) *Post Biochem* **43**: 174-182
3. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) *Nature* **372**: 425-432
4. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996) *J Clin Invest* **98**: 1101-1106
5. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) *Science* **269**: 546-549
6. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995) *Science* **269**: 543-546
7. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Buc-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, Mackeller W, Rosteck PR, Schoner B, Smith D, Tinsley FC, Zhang Y, Heiman M (1995) *Nature (London)* **377**: 530-532
8. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) *Science* **269**: 540-543
9. Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Lui SM, Tartaglia LA, Leibel RL (1996) *Science* **271**: 994-996
10. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV (1996) *Diabetes* **45**: 1455-1462
11. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wolf EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) *Cell* **83**: 1263-1271
12. Lee GHL, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JJ, Friedman JM (1996) *Nature (London)* **379**: 632-635
13. Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Leibel RL (1996) *Genome Res* **6**: 431-438
14. Truett GE, Bahary N, Friedman JM, Leibel RL (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7806-7809
15. Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim HK, Lai CF, Tartaglia LA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8374-8378
16. Tetsuya T, Kishimoto T (1997) *Annu Rev Immunol* **15**: 797-819
17. Fong TM, Huang RC, Tota MR, Mao C, Smith T, Varnerin J, Karpitskiy VV, Krause JE, Van der Ploeg LHT (1998) *Mol Pharmacol* **53**: 234-240
18. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996) *Cell* **84**: 491-495
19. Tartaglia LA (1997) *J Biol Chem* **272**: 6093-6096
20. Masuzaki H (1997) *Nat. Med.* **3**: 1029-1033
21. Gavrilova O, Barr V, Marcus-Samuels B, Reitman M (1997) *J Biol Chem* **272**: 30546-30551
22. Loellmann B, Grueninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 648-652
23. Hoggard N, Mercer J, Rayner DV, Moar K (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 383-387
24. Lostao PM, Urdaneta E, Martinez-Anso E, Barber A, Martinez JA (1998) *FEBS-Letters* **423**: 302-306
25. Fruehbeck G, Aguado M, Martinez JA (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 590-594
26. Siegriest-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanraud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA (1997) *J Clin Invest* **100**: 2858-2864
27. Emilsson V, Liu Y, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M (1997) *Diabetes* **46**: 313-316
28. Kieffer TJ, Heller RS, Habener JF (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 522-527
29. Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF (1997) *Diabetes* **46**: 1087-1093
30. Pallet AL, Morton NM, Cawthorne MA, Emilsson V (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 267-270
31. Islam MS, Morton NM, Hansson A, Emilsson V (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 851-855
32. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14564-14568
33. Wang Y, Kuropatwinski KK, White DW, Hawley TS, Hawley RG, Tartaglia LA, Baumann H (1997) *J Biol Chem* **272**: 16216-16223
34. Muller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G (1997) *J Biol Chem* **272**: 10585-10593
35. Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B, Gaillard RC (1998) *Endocrinology* **139**: 4264-4268
36. Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, Chrousos GP, Bernstein SR (1998) *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 4459-4466
37. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Basse R (1998) *Circ Res* **83**: 1059-1066
38. Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA (1998) *J Biol Chem* **273**: 26194-26201
39. Sinha MK, Opentanova I, Ohannessian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Wtphens TW, Caro J (1996) *J Clin Invest* **98**: 1277-1282
40. Diamond FB, Eichler DC, Duckett G, Jorgensen EV, Shulman D, Root AW (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **233**: 818-822
41. Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y (1995) *Diabetes* **44**: 855-858
42. Golden P, MacCagnan TJ, Partridge WM (1997) *J Clin Invest* **99**: 14-18
43. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996) *J Clin Invest* **98**: 1101-1106
44. Ihle JW (1995) *Nature (London)* **377**: 591-594
45. White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA (1997) *J Biol Chem* **272**: 4085-4071
46. Stahl N, Farrugella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE, Yancopoulos GD (1995) *Science* **267**: 1349-1353
47. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MII, Skoda RC (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6231-6235
48. Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M, Shima K (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **231**: 26-29
49. Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS (1997) *J Biol Chem* **272**: 32686-32695
50. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley

- AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997) *Nature (London)* **387**: 903-908
51. Murakami T, Shima K (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 944-952
52. Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Nakao K (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 75-83
53. Chua SC, White DW, Wu-Peng XS, Liu S, Okada N, Kershaw EE, Chung WK, Power-Keohoe L, Chua M, Tartaglia LA, Leibel RL (1996) *Diabetes* **45**: 1141-1143
54. Yamashita T, Murakami T, Iida M, Kuwajima M, Shima K (1997) *Diabetes* **46**: 1077-1080
55. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannessian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV (1996) *Lancet* **348**: 159-161
56. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF (1996) *Diabetes* **45**: 992-994
57. Chung WK, Power-Keohoe L, Chua M, Chu F, Aronne L, Huma Z, Sothorn M, Udall JN, Kahle B, Leibel RL (1997) *Diabetes* **46**: 1509-1511
58. Silver K, Walston J, Chung WK, Yao F, Parikh VV, Andersen R, Cheskin LJ, Elahi D, Muller D, Leibel RL, Shuldiner AR (1997) *Diabetes* **46**: 1898-1900

Krajowa Nagroda Naukowa z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego 1999

Rada Naukowa Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu ustanowiła Krajową Nagrodę Naukową z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego.

Ideą nagrody jest wyróżnianie młodych naukowców zajmujących się genetyką roślin i promowanie osiągnięć będących rezultatem badań prowadzonych w warunkach krajowych laboratoriów.

Nagroda przyznawana jest od 1994 roku corocznie, przez Kapitułę Nagrody, za oryginalne prace badawcze udokumentowane publikacją w krajowym lub zagranicznym czasopiśmie w okresie ostatnich trzech lat, dotychczas nienagradzane.

W roku 1999 Kapituła przyznała:

nagrodę I stopnia – dr JAROSŁAWOWI BURCZYKOWI (WSP, Bydgoszcz) za „Osiągnięcia w zakresie genetyki populacyjnej drzew iglastych”

nagrodę II stopnia – mgr PAWŁOWI FIEDOROWOWI (UAM Poznań) za „Oryginalny wkład do taksonomii molekularnej wątrobowców”

Sponsorami funduszu nagród byli: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Radzików, Hodowla Roślin „Danko” – Choryń, Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze „Polan” Sp. z o.o. – Kraków oraz Hodowla Roślin Szelejewo Sp. z o.o.

Wskazówki dla Autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające nowe osiągnięcia, koncepcje i kierunki badawcze w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych; publikuje też noty z historii biochemii, zasady polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje nadesłanych książek oraz sprawozdania ze zjazdów, konferencji i szkół, w których biorą udział członkowie Towarzystwa.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postępkach Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), mini-reviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie, podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie, np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenia zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako *.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny (około 30 wierszy na stronie i około 60 znaków w wierszu), z lewym marginesem około 4 cm. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie olówkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwiska (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail zakładów, w których pracują Autorzy, adres

do korespondencji, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska Autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

PIŚMIENNICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9-26]. Odnośniki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

1. Hildebrandt G R, Aronson N N (1980) *Biochim Biophys Acta* **631**: 499-502

2. Bostock C J, Summer A T (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam

3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg G F Von V B (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 541-553

4. Deleij J, Kesters K (1975) W: Florin M, Statz E H (red) *Comprehensive Biochemistry* 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 1-7

5. Franks N P, Lieb W R (1981) W: Knight C G (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 243-272

ILUSTRACJE: ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: *.tif, lub *.cdr, lub *.psd, lub *.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć olówkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (olówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przelać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

