

**MOLEKULARNE
MECHANIZMY
REGULACJI HORMONALNEJ**

Andrzej Klein

**MOLEKULARNE
MECHANIZMY
REGULACJI HORMONALNEJ**

Książka dofinansowana przez Uniwersytet Jagielloński ze środków na badania własne, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz Zakład Biochemii

Recenzent

Prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda

Projekt okładki

Jadwiga Burek

© Copyright by Andrzej Klein & Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Wydanie I, Kraków 2010
All rights reserved

Książka, ani żaden jej fragment, nie może być przedrukowywana bez pisemnej zgody Wydawcy. W sprawie zezwoleń na przedruk należy zwracać się do Wydawnictwa Uniwersytetu Jagiellońskiego.

ISBN 978-83-233-2959-6



www.wuj.pl

Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Redakcja: ul. Michałowskiego 9/2, 31-126 Kraków
tel. 12 631-18-80, 12 631-18-82, fax 12 631-18-83
Dystrybucja: tel. 12 631-01-97, tel./fax 12 631-01-98
tel. kom. 0506-006-674, e-mail: sprzedaz@wuj.pl
Konto: PEKAO SA, 80 1240 4722 1111 0000 4856 3325

Spis treści

Od autora.....	7
Wstęp	9

Część I. Cząsteczki sygnałowe

1. Cząsteczki przenoszące informację biologiczną między komórkami organizmów wielokomórkowych.....	13
1.1. Pochodne amin i aminokwasów	15
1.2. Ikozanoidy	16
1.3. Hormony steroidowe i inne małowczątkowe związki lipofilne.....	18
1.4. Oligo- i polipeptydy.....	20
2. Receptory	27
2.1. Receptory wewnątrzkomórkowe (jądrowe).....	30
2.2. Receptory błonowe	35
2.2.1. Receptory jonotropowe.....	39
2.2.2. Receptory związane z białkami G	42
2.2.3. Receptory o aktywności enzymatycznej.....	44
2.2.4. Receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi	52
2.2.5. Receptory podobne do białka Toll	56
2.2.6. Receptory z domeną śmierci i receptory pułapki	58
2.2.7. Receptory Notch	61
2.2.8. Receptory rozpuszczalne	64
2.2.9. Koreceptory	65
2.2.10. Rozmowa receptorów	68
3. Białka adaptorowe, kotwiczące i dokujące	75
3.1. Domeny białkowe	75
3.2. Białka adaptorowe	81
3.3. Białka kotwiczące	84
3.4. Białka dokujące	85
4. Białka G, cyklazy i cykliczne nukleotydy	89
4.1. Duże białka G	90
4.2. Superrodzina białek Ras	94
4.3. Cyklazy nukleotydowe	100
4.4. Tlenek azotu	102
5. Kinazy białkowe niereceptorowe.....	107
5.1. Kinazy białkowe serynowo-treoninowe	108
5.1.1. Kinazy białkowe AGC.....	108
5.1.2. Kinazy białkowe aktywowane mitogenami.....	115
5.1.3. Kinazy regulujące cykl komórkowy.....	118
5.1.4. Białka mTOR.....	123

5.1.5. Kinazy białkowe zależne od Ca ²⁺ /kalmoduliny	127
5.2. Kinazy białkowe tyrozynowe	128
5.2.1. Kinazy Janusa	129
5.2.2. Kinazy Src	131
5.2.3. Kinazy Abl	133
6. Fosfatazy, fosfolipazy i kinaza PI3K	137
6.1. Fosfatazy serynowo-treoninowe	137
6.2. Fosfatazy tyrozynowe	139
6.3. Fosfatydyloinozytole w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej	141
6.3.1. Kinaza 3-fosfoinozytydów (PI3K) i fosfataza PTEN	141
6.3.2. Fosfolipaza C	143
7. Białka wiążące wapń	147
7.1. Kalmodulina	149
7.2. Aneksyny	151
8. Czynniki transkrypcyjne	153
8.1. NF-κB	154
8.2. Białka STAT	155
8.3. Białka Smad	157
8.4. NF-AT	158
8.5. NICD (wewnątrzkomórkowa część receptorów Notch)	160
8.6. AP-1	161
8.7. Myc	162
8.8. Czynniki transkrypcyjne E2F	163
8.9. Rodzina białka p53	164
9. Kaspazy, białka Bcl-2 i inhibitory apoptozy	169
9.1. Kaspazy	169
9.2. Inhibitory apoptozy	172
9.3. Białka Bcl-2	174

Część II. Sygnały życia i sygnały śmierci

1. Hormonalna regulacja syntezy i rozkładu glikogenu	181
2. Sygnalizacja mitogenna	187
2.1. Aktywacja receptorów czynników wzrostowych	188
2.2. Przekaz sygnału mitogennego	190
2.3. Inhibicja sygnału mitogennego na poziomie receptorów GF	193
3. Molekularne mechanizmy działania transformującego czynnika wzrostowego typu β (TGFβ)	197
3.1. Uwalnianie aktywnego TGFβ z kompleksu latentnego	199
3.2. Mechanizm aktywacji receptorów TGFβ i sygnalizacja z udziałem białek Smad	200
4. Stymulowana cytokinami transmisja sygnału wewnątrzkomórkowego	207
5. Apoptoza zależna i niezależna od receptorów	215
Zakończenie	221
Indeks	225

Od autora

Jednym z trudniejszych do rozwiązania problemów biologii i medycyny jest poznanie mechanizmów wymiany informacji między komórkami organizmów wielokomórkowych i zrozumienie mechanizmów odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe. Złożoność tej odpowiedzi, nawet na poziomie pojedynczej komórki, jest zdumiewająca. Nic więc dziwnego, że jest to obecnie jedno z ważniejszych i najintensywniej badanych zagadnień biologii molekularnej i komórkowej.

Wyjaśnienie podstaw sygnalizacji zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej ma zasadnicze znaczenie do zrozumienia funkcjonowania organizmów wielokomórkowych, w tym także człowieka. Niniejsze opracowanie przedstawia wybór informacji, które mogą stanowić podstawę do zrozumienia trudnych i niejednokrotnie w sposób niewystarczający opisanych w piśmiennictwie polskim zagadnień z tego zakresu. Monografia ta w założeniu autora powinna także umożliwić zainteresowanym dalsze własne studia nad tym problemem.

Doniesienia literaturowe na temat „sygnalizacji”, których liczba w czasopismach o zasięgu międzynarodowym przekracza kilkanaście tysięcy rocznie, potwierdzają wagę problemu. Niniejsze opracowanie jest uzupełnionym o nowe fakty doświadczalne i nowe hipotezy rozwinięciem moich wykładów, opracowanych w formie monografii pt. *Molekularne podstawy regulacji hormonalnej*, opublikowanej w roku 2002.

Minęło zaledwie 8 lat od napisania przeze mnie ww. monografii, ale w tej dziedzinie nauki to dużo. Dlatego postanowiłem napisać na nowo niektóre z rozdziałów prezentowanych poprzednio i dodać te, które powinny się znaleźć w opracowaniu typu podręcznikowego.

Należy wyraźnie podkreślić, że niniejsze opracowanie zawiera podstawowe informacje na temat związków uczestniczących w przenoszeniu informacji biologicznej między komórkami tego samego organizmu, jej odbiorze przez komórki docelowe i drogach sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Obszerniejsze omówienia problemów „sygnalizacji” znajdują czytelnicy w literaturze fachowej (wyłącznie prace przeglądowe), cytowanej na końcu każdego rozdziału. Opracowanie podzielone jest na dwie części, z których pierwsza (cząsteczki sygnałowe) opisuje budowę i właściwości cząsteczek przenoszących sygnał na zewnątrz i wewnątrz komórki. W dziewięciu rozdziałach omówiono różne rodziny związków, które odgrywają podstawową rolę w sygnalizacji hormonalnej, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów, bo to one decydują o drogach przenoszenia sygnału wewnątrzkomórkowego. Ta część pracy jest obszernym wprowadzeniem do kilku przykładów kaskad sygnalizacyjnych, opisanych w części drugiej poświęconej wybranym procesom regulującym metabolizm, proliferację i programowaną śmierć komórki.

Mam nadzieję, że monografia ta przybliży czytelnikowi procesy leżące u podstaw molekularnych szeroko pojętej regulacji hormonalnej i ułatwi korzystanie z bardzo bogatej literatury fachowej tego przedmiotu.

Andrzej Klein

Wstęp

Mechanizmy regulacji hormonalnej na poziomie cząsteczkowym są częścią dużej i skomplikowanej dziedziny biologii molekularnej, określanej mianem sygnalizacji komórkowej. Przesłanie i odbiór informacji zewnątrzkomórkowej (sygnalizacja międzykomórkowa) oraz mechanizmy związane ze swoistą odpowiedzią komórki na dany sygnał (sygnalizacja wewnątrzkomórkowa) stanowią dziś odrębną dziedzinę wiedzy.

Każda komórka eukariotyczna ma zdolność do odbioru, selekcji, analizy i odpowiedzi na sygnały odbierane ze środowiska, także od innych komórek w przypadku organizmów wielokomórkowych. Sygnalizacja międzykomórkowa jest procesem niezbędnym do funkcjonalnej integracji organizmów wielokomórkowych. Każdy aspekt funkcjonowania komórek w obrębie tych organizmów, takich jak regulacja metabolizmu, przeżycie, proliferacja, różnicowanie i śmierć, jest zależny od właściwie funkcjonujących układów uczestniczących w sygnalizacji komórkowej. Cząsteczki chemiczne (głównie białka) przenoszące informację odgrywają ważną rolę w synchronizacji procesów życiowych całego organizmu.

Odbiór sygnałów zewnątrzkomórkowych jest możliwy m.in. dzięki istnieniu wyspecjalizowanych struktur białkowych, określanych mianem receptorów. Białka te posiadają nie tylko zdolność odbioru sygnału, lecz także umiejętność tłumaczenia i przekazywania zawartej w nim informacji do wewnątrzkomórkowych układów efektorowych, realizujących poprzez bardziej lub mniej skomplikowane szlaki metaboliczne swoistą odpowiedź komórki. Sposób przekazywania sygnałów zewnątrzkomórkowych zależy głównie od struktury receptorów i ich możliwości funkcjonalnych. Zróżnicowanie strukturalne receptorów pozwala na odbiór informacji przez sygnały tak różne, jak promieniowanie elektromagnetyczne (fotoreceptory), bodźce mechaniczne (mechanoreceptory) i określone związki chemiczne (receptory hormonów, neurotransmiterów, cytokin, czynników wzrostowych itp.). Zazwyczaj wyróżnia się odpowiedź komórkową szybką (jeśli liczba etapów pośrednich jest niewielka) i wolną, jeśli ostateczna odpowiedź komórki wymaga przeprowadzenia przez nią setek reakcji chemicznych. Jeśli ograniczymy się do jednego typu sygnału, stymulacji hormonalnej, przykładem odpowiedzi szybkiej może być hormonalna regulacja metabolizmu glikogenu, natomiast przykładem odpowiedzi wolnej (odległej w czasie) – proliferacja komórek, stymulowana działaniem czynników wzrostowych. Receptory uczestniczące w odbiorze sygnału zewnątrzkomórkowego mogą być zlokalizowane w błonie komórkowej, jeśli cząsteczka niosąca sygnał nie może pokonać bariery błony komórkowej (receptory błonowe), lub we wnętrzu komórki, jeśli cząsteczka niosąca informację może przenikać strukturę błony (receptory wewnątrzkomórkowe). Jednym z najważniejszych problemów sygnalizacji międzykomórkowej jest przekaz sygnału przez błonę komórkową i związane z tym mechanizmy molekularne, określane mianem sygnalizacji transbłonowej (lub transdukcji sygnału

zewnątrzkomórkowego). Duża liczba cząsteczek niosących informację (ligandów) i swoistych dla nich receptorów mogłaby angażować wiele unikalnych (niepowtarzalnych) mechanizmów przekazu informacji, wynikających ze swoistej, jednoznacznej odpowiedzi komórki na działanie poszczególnych ligandów. Takie założenie nie znajduje jednak potwierdzenia w badaniach doświadczalnych. Stosunkowo niewielka, znana liczba układów efektorowych, stymulowanych tymi ligandami, powinna ograniczać możliwość całkowicie zróżnicowanej odpowiedzi komórki, ale i to jest niezgodne z danymi doświadczalnymi. Wy tłumaczeniem tych sprzeczności jest, z jednej strony, wykorzystywanie przez różne cząsteczki sygnalizacyjne podobnej drogi przekazania sygnału (mechanizmu przekazania sygnału przez receptor). Z drugiej strony, duża liczba izoform tych samych układów efektorowych (np. różnych izoform jednego enzymu) daje możliwość selekcji odbieranego sygnału i przekazywania go na różne cząsteczki docelowe. Ponadto zróżnicowaniu odpowiedzi biologicznej komórek sprzyja także wewnątrzkomórkowa dyskryminacja, wzmocnienie i/lub zróżnicowanie sygnału, indukowanego ligandami homo- i heterologicznymi.

Przeniesienie sygnału od receptora do wnętrza komórki obejmuje bardzo wiele wzajemnie na siebie oddziałujących molekularnych kaskad i łańcuchów reakcji, które jeśli funkcjonują poprawnie, zapewniają prawidłowe funkcjonowanie komórek i organizmów. Zaburzenia na poszczególnych etapach przekazywania sygnału prowadzą do stanów patologicznych, a wiele chorób wynika z dysfunkcji określonych szlaków sygnalizacji zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowej. Dlatego poznanie mechanizmu regulacji hormonalnej na poziomie molekularnym jest nadzieją na opracowanie właściwej terapii wielu jednostek chorobowych.

Część I
Cząsteczki sygnałowe

1. Cząsteczki przenoszące informację biologiczną między komórkami organizmów wielokomórkowych

W roku 1902 Ernest H. Starling i William M. Bayliss (London University College) postawili hipotezę przenoszenia informacji między narządami poprzez cząsteczki chemiczne. Udowodnili przekaz sygnału na drodze pozanerwowej między jelitem czczym a trzustką psa. Starling uznał, że sygnał ten jest przekazywany przez krew, co potwierdził, wstrzykując filtrat ekstraktu jelita do żyły szyjnej, na co trzustka odpowiedziała wzmożoną sekrecją soku trzustkowego. W tym samym roku Bayliss i Starling nazwali badany czynnik jelitowy „sekretyną”, poprawnie wnioskując, że czynnik ten występuje i jest przechowywany w błonie śluzowej jelita jako nieaktywna prosekretyna. Starling wprowadził nazwę hormon (grec. *ορμαω* – poruszam, pobudzam) w celu opisania substancji przenoszonych przez krew (chemiczny posłaniec), które inicjują określoną odpowiedź organizmu. Ustalenie, że nerwowa i hormonalna kontrola sekrecji w przewodzie pokarmowym są układami komplementarnymi, dało początek nowej dyscyplinie nauki – endokrynologii.

Nazwa ta zaproponowana została przez E.H. Starlinga na Zjeździe Stowarzyszenia Niemieckich Przyrodników i Lekarzy w Stuttgarcie w 1905 roku i nie straciła nic ze swojej precyzji, mimo że poznano do dziś setki związków o aktywności hormonalnej. Przyjęta powszechnie definicja hormonów jako związków syntetyzowanych przez wyspecjalizowane komórki wydzielania wewnętrznego, przenoszonych przez krew do tkanek docelowych, ma dzisiaj znaczenie historyczne i odnosi się głównie do hormonów dokrewnych. Obecnie wiadomo, że większość substancji o aktywności hormonalnej może być syntetyzowana przez wiele różnych komórek, a i sposób ich przenoszenia od komórek syntetyzujących hormony do komórek docelowych może być różny. Dlatego, bez względu na różnice w strukturze, aktywności i nazewnictwie (hormony, neurotransmitery, czynniki wzrostowe czy cytokiny), wszystkie cząsteczki przenoszące informację biologiczną między komórkami tego samego organizmu zaliczane są do tzw. cząsteczek sygnałowych.

Chociaż sekretyna jest nadal uważana za pierwszy odkryty hormon, to naprawdę pierwsza była adrenalina, odkryta w 1901 roku jako hormon gruczołu „suprarenkowego”, znanego obecnie jako nadnercze. W następnych latach opisano wiele związków o aktywności hormonalnej, chociaż większość hormonów peptydowych nie była znana do lat 50., a budowę receptorów hormonów peptydowych poznano dopiero w latach 70. Pierwszym hormonem peptydowym, którego sekwencję określił w roku 1951 Fred Sanger, była insulina, odkryta przez Fredericka Granta Bantinga i Charlesa Besta z laboratorium Uniwersytetu w Toronto w roku 1921.

Procesy związane z prawidłowym funkcjonowaniem organizmów wielokomórkowych regulowane są za pośrednictwem cząsteczek sygnałowych, przenoszących informację między komórkami organizmów wielokomórkowych. Zwierzęce

organizmy wielokomórkowe (*Metazoa*) mają poważny problem, który nie dotyczy organizmów jednokomórkowych (*Protista* i *procaryota*) – jak integrować komórki organizmu, kontrolować rozwój i funkcjonowanie poszczególnych tkanek oraz organów tworzących cały organizm. Ważnym elementem jest kontrola przez ośrodkowy układ nerwowy, aczkolwiek wiele procesów życiowych, takich jak wzrost, reprodukcja, wykorzystanie składników odżywczych i energii, obrona immunologiczna i wiele innych, jest regulowanych na drodze hormonalnej. Szeroka definicja „sygnalizacji komórkowej” (ang. *cell signalling*) obejmuje: wytwarzanie i międzykomórkowy przekaz sygnału przez określone związki chemiczne, odbiór sygnału przez receptory komórkowe i propagację sygnału wewnątrz komórki przez wtórne przekaźniki, kaskady enzymatyczne itp. Transdukcja sygnału jest procesem, w którym sygnał zewnątrzkomórkowy jest przetwarzany w różne formy sygnału (sygnałów) wewnątrzkomórkowego. Transdukcja sygnału jest zazwyczaj połączona z jego amplifikacją, a sygnał wewnątrzkomórkowy jest często plejotropowy (wielokierunkowy). Pierwsze przekaźniki to substancje chemiczne przekazujące sygnał między komórkami tego samego organizmu (hormony, neurotransmitery, cytokiny, czynniki wzrostu itp.), a w wyjątkowych wypadkach między organizmami zwierzęcymi (np. feromony). Wtórne (drugie) przekaźniki to substancje uczestniczące w przekazie sygnału wewnątrz komórki, syntetyzowane na drodze enzymatycznej (cAMP, cGMP, DAG, IP₃) lub uwalniane z magazynów wewnątrzkomórkowych (Ca²⁺).

Pierwszym poznany wtórny przekaźnik informacji hormonalnej był cAMP. W roku 1955 Earl Sutherland oraz Jacques Berhet i Theodore Rall prowadzili serię eksperymentów mających wyjaśnić, jak adrenalina i glukagon aktywują fosforylaze glikogenu.

Pomocny w określeniu struktury tego przekaźnika okazał się fakt, że był on ciepłostabilny, a więc nie był białkiem, co w krótkim czasie pozwoliło na jego oczyszczenie, krystalizację i poznanie budowy.

W drugiej połowie lat 50. XX wieku Edwin Krebs i Ed Fischer prowadzili doświadczenia nad konwersją mięśniowej fosforylazy glikogenu b w fosforylaze glikogenu a. Wyizolowali oni enzym konwertujący, który w obecności ATP i jonów wapnia przekształcał nieaktywną formę b do aktywnej formy a. Równocześnie ATP był defosforylowany do ADP, co wskazywało, że aktywacja może być wynikiem fosforylacji fosforylazy glikogenu. Enzym konwertujący okazał się kinazą fosforylazy glikogenu, pierwszą odkrytą kinazą białkową. Odkrycia te były milowymi krokami na drodze poznania molekularnych mechanizmów sygnalizacji komórkowej.

Uwzględniając różnice w budowie chemicznej, wyróżnia się zwykle cztery główne typy cząsteczek sygnałowych przenoszących informację w organizmach zwierzęcych: aminy, aminokwasy i ich pochodne (np. aminy katecholowe, aminy biogenne, acetylocholina, kwas γ -aminomasłowy itp.), pochodne steranu (hormony steroidowe) i inne związki lipofilne (hormony tarczycy oraz kwasy retinowe), pochodne 20-węglowych kwasów tłuszczowych (ikozanoidy) oraz oligo- i polipeptydy (hormony peptydowe, czynniki wzrostowe, cytokiny). Mechanizm odbioru sygnału niesionego przez wymienione cząsteczki sygnałowe różni się w zależności od lokalizacji komórkowej ich receptorów. Hormony steroidowe, hormony tarczycy i kwasy retinowe (retinoidy), zdolne do przenikania podwójnej warstwy lipidowej błony komórkowej,

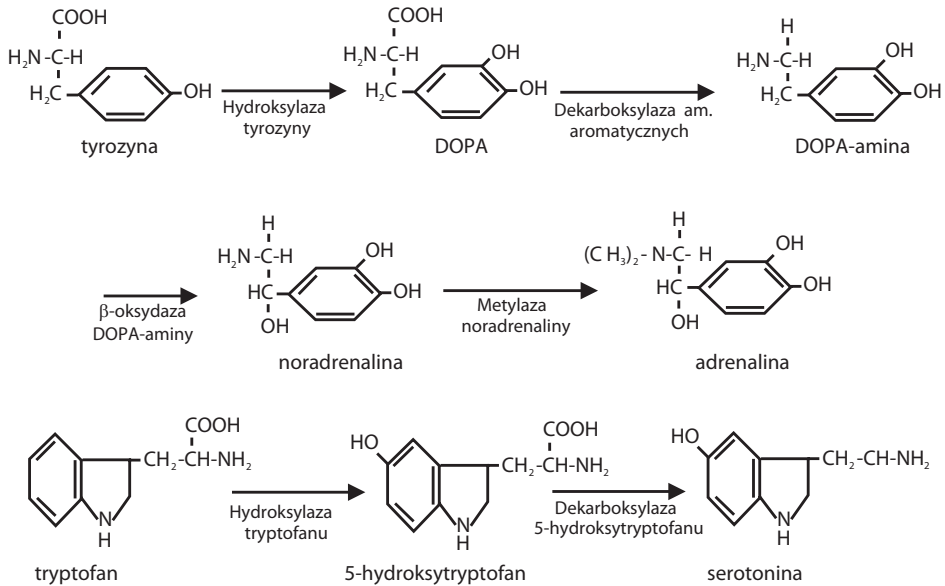
mają receptory wewnątrz komórki docelowej (w większości w jądrze komórkowym), pozostałe (niezdolne do wnikania do komórki) działają przez receptory ulokowane w błonie komórkowej (receptory błonowe).

Ze względu na różnice w znajomości mechanizmów działania hormonów roślinnych i zwierzęcych w niniejszym opracowaniu omówiono wyłącznie podstawy molekularne działania hormonów zwierzęcych. Zainteresowanych sygnalizacją w organizmach roślinnych odsyłam do artykułów opublikowanych w „Postęпах Biologii Komórki” przez K. Trębacza (1999, 26 (supl.13), 95–108), S. Józefowskiego (2000, 27, 609–623 i 623–632), A. Jakubowską i S. Kowalczyka (2000, 27, 633–656), E. Zielińską i S. Kowalczyka (2000, 27, 155–184) oraz w „Postęпах Biochemii” przez J. Barańską (1998, 44, 201–207), M. Gacko, A. Worowską, A. Woźniaka, M. Jedynaka, B. Panek, R. Łapińskiego (2005, 51, 171–187), S. Kowalczyka, E. Hadowską, A. Piekarską (2005, 51, 1888–197), M. Jasińskiego, M. Figlarowicz (2006, 52, 303–312) i A. Jakubowską, M. Orłowskiego i S. Kowalczyka (2007, 53, 133–142).

1.1. Pochodne amin i aminokwasów

Do tej grupy związków zalicza się zarówno cząsteczki o charakterze klasycznych neurotransmiterów (acetylocholina, kwas γ -aminomasłowy), jak i hormonów (histamina, serotonina, melatonina, tyroksyna, dopamina, adrenalina, noradrenalina). Regulują różne procesy fizjologiczne, jak: przekąźnictwo nerwowe, pobudzenie sekrecji komórkowej, regulacja ciśnienia krwi, skurcze mięśni gładkich, metabolizm węglowodanów i tłuszczów, gospodarka mineralna oraz wodna, procesy dojrzewania i inne.

Hormony te syntetyzowane są z odpowiednich aminokwasów: histydyny (histamina), tryptofanu (serotonina, melatonina), tyrozyny (trijodotyronina, tyroksyna, dopamina, adrenalina, noradrenalina) lub z amin, np. z choliny (acetylocholina) na drodze enzymatycznej (Rys. 1.1). Histamina powstaje z histydyny po odszczepieniu grupy karboksylowej w reakcji katalizowanej przez dekarboksylazę histydynową, a źródłem i magazynem tego hormonu są komórki tuczne. Serotonina (5-hydroksytryptamina) syntetyzowana jest z tryptofanu w dwu etapach: w pierwszym – wskutek działania hydroksylazy tryptofanu powstaje 5-hydroksytryptofan, a z niego pod działaniem dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych serotonina. Kluczowym enzymem regulującym syntezę melatoniny (N-acetylo-5-metoksytryptaminy) jest N-acetylotransferaza przekształcająca serotoninę w N-acetyloserotoninę, a z niej wskutek działania transferazy hydroksyindoilo-O-metylowej powstaje melatonina, główny hormon szyszynki. Hormony jodotyroninowe (syntetyzowane przez tarczycę), podobnie jak hormony katecholaminowe (syntetyzowane głównie przez rdzeń nadnerczy i zakończenia nerwowe układu współczulnego), powstają z tyrozyny. 3,5,3'-trijodotyronina i 3,5,3',5'-tetrajodotyronina (tyroksyna) syntetyzowane są w tyreocytach, gdzie najpierw jod jest wbudowywany w tyrozinę, tworząc 3-monojodotyroninę i 3,5-dijodotyroninę, których połączenie prowadzi do powstania trijodotyroniny. Połączenie dwóch cząsteczek diiodotyroniny daje tyroksynę. Dihydroksyfenyloalanina (DOPA), dopamina, noradrenalina i adrenalina



Rys. 1.1. Synteza katecholamin i serotoniny

powstają z tyrozyny na drodze kolejnych reakcji enzymatycznych katalizowanych przez hydroksylazę fenyloalaninową, dekarboksylazę dihydroksyfenyloalaninową, β -hydroksylazę dopaminową i N-metylotransferazę fenyloalaninową.

Wymienione wyżej hormony przenoszone są od komórek je syntetyzujących do komórek docelowych głównie na drodze endokrynej i parakrynej (neuroparakrynej). Działają za pośrednictwem receptorów błonowych, przede wszystkim receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR, ang. **G-protein coupled receptors**) lub jonotropowych (kanałów jonowych bramkowanych ligandem).

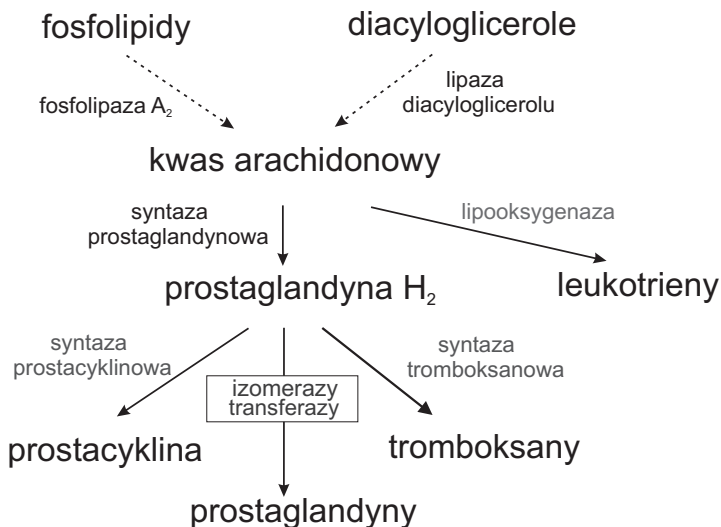
1.2. Ikozanoidy

Nazwa ikozanoidy (eikozanoidy) została wprowadzona przez E.J. Coreya w roku 1980. Ikozanoidy są produktami utlenienia 20-węglowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, u człowieka głównie kwasu arachidonowego. Wyróżnia się cztery podstawowe grupy tych związków: prostaglandyny, tromboksany, leukotrieny i prostacyklinę. Prócz tego do ikozanoidów zalicza się także kwasy: hydroperoksy- i hydroksyeikozanowe oraz epoksyeikozatetraenowe. Ikozanoidy są związkami o aktywności hormonalnej, a ich receptory są zlokalizowane w błonach wielu różnych komórek. Związki te występują zarówno w komórkach zwierzęcych, jak i roślinnych. Obecność ich stwierdzono praktycznie we wszystkich tkankach zwierzęcych. Poziom ikozanoidów jest regulowany głównie ilością kwasu arachidonowego, powstającego przede wszystkim w reakcjach enzymatycznej degradacji fosfolipidów

i ich pochodnych lub syntetyzowanego z kwasu linolowego. Natomiast o poziomie syntezy poszczególnych grup ikozanoidów decyduje zapotrzebowanie organizmu na te związki i aktywność zaangażowanych w ich powstawanie enzymów.

Biosynteza głównych grup ikozanoidów przebiega w tkankach ssaków przy udziale enzymów: syntazy prostaglandynowej i lipooksygenazy (Rys. 1.2). Syntaza prostaglandynowa katalizuje reakcję syntezy nietrwałej prostaglandyny H_2 (PGH_2), z której pod wpływem odpowiednich izomeraz i transferaz powstają inne prostaglandyny. PGH_2 jest także substratem w syntezie prostacykliny i tromboksanów. Natomiast lipooksygenaza uczestniczy w syntezie leukotrienów z kwasu arachidonowego. Ikozanoidy wykazują bardzo szeroki i zróżnicowany zakres aktywności biologicznej.

Najliczniejszą i najlepiej poznaną grupą ikozanoidów są prostaglandyny. Obecnie stosowana nomenklatura traktuje prostaglandyny (PG) naturalne jako pochodne kwasu prostanowego, posiadające przy węglu C15 grupę hydroksylową i w zależności od rodzaju pierścienia pięciowęglowego wyróżnia się prostaglandyny: E (PGE), F (PGF), D (PGD), A (PGA) i B (PGB). Indeksy 1, 2, 3 oznaczają odpowiednio: jedno (prostaglandyny monoenowe, PG_1), dwa (prostaglandyny dienowe, PG_2) lub trzy (prostaglandyny trienowe, PG_3) wiązania podwójne w cząsteczce. Skrót PGE_2 oznacza, że prostaglandyna ta zawiera pierścień typu E, grupę hydroksylową przy C15 oraz dwa wiązania podwójne: Δ^{13} (trans) i Δ^5 (cis). Substratem w syntezie prostaglandyn monoenowych jest kwas dihomo- γ -linolenowy, prostaglandyn dienowych jest kwas arachidonowy, a prostaglandyn trienowych jest kwas eikozapentaenowy. Substratem w biosyntezie prostaglandyn u ludzi jest głównie kwas arachidonowy. Reakcję syntezy katalizuje kompleks syntazy prostaglandynowej, w którego skład wchodzi: cyklooksygenaza i hydroperoksydaza. Wynikiem działania cyklooksygenazy jest synteza PGG_2 , która pod wpływem hydroperoksydazy zostaje przekształcona w PGH_2 . Ta z kolei jest niestabilnym endonadtenkiem przekształcanym do innych prostaglandyn, tromboksanów



Rys. 1.2. Ogólny schemat syntezy ikozanoidów

lub prostacykliny. Z PGH_2 pod działaniem odpowiednich izomeraz powstają PGE_2 i PGD_2 , natomiast transferaza-S-glutationu przekształca PGH_2 w $\text{PGF}_{2\alpha}$. PGE_2 może być przekształcana dalej w PGA_2 i PGB_2 . Aktywność biologiczna zależy zarówno od typu prostaglandyny, jak i od rodzaju komórek docelowych. Działają głównie na drodze parakrynej lub autokrynej, rzadziej na endokrynej. Stymulują stany zapalne, regulują przepływ krwi, stymulują chemotaksję, kontrolują transport. Prostacyklina PGI_2 jest syntetyzowana z prostaglandyny H_2 w reakcji katalizowanej przez syntazę prostacyklinową. Aktywność biologiczna prostacykliny jest podobnie jak innych ikozanoidów zależna od rodzaju komórek docelowych. Szczególnie istotne fizjologicznie wydaje się jej działanie hipotensyjne, ponieważ jest głównym metabolitem kwasu arachidonowego wytwarzanym przez śródbłonek naczyń krwionośnych.

Leukotrieny są syntetyzowane u ludzi głównie z kwasu arachidonowego przy udziale 5-lipooksygenazy. Pierwotnym produktem jest kwas 5-hydroperoksy-6,8,11,14-eikozatetraenowy (5-HPETE), z którego powstaje leukotrien A_4 (LTA_4), a z niego inne. Przez hydroksylację LTA_4 powstaje nieczynny biologicznie LTB_4 , a przez dołączenie glutationu do LTA_4 powstaje LTC_4 . Leukotrieny D_4 i E_4 powstają z LTC_4 przez kolejne odszczepienie kwasu glutaminowego i glicyny. Wykazują silne działanie prozapalne. Są m.in. chemoatraktantami (głównie LTB_4) w stosunku do leukocytów obojętnochłonnych, kwasochłonnych i monocytów. Powodują ich agregację, degranulację i generację nadtlenków. LTC_4 , LTD_4 i LTE_4 są głównymi mediatorami zmian zapalnych dróg oddechowych w anafilaksji. Zwiększają przepuszczalność naczyń krwionośnych, a działanie to jest kilka tysięcy razy mocniejsze niż histaminy.

Tromboksany są jedną z grup ikozanoidów, syntetyzowanych podobnie jak prostaglandyny i prostacyklina ze wspólnego prekursora endonadtlenku, prostaglandyny H_2 . Reakcję tworzenia tromboksanu A_2 (TxA_2) z PGH_2 katalizuje syntaza tromboksanu. Największą aktywność tego enzymu stwierdzono w płytkach krwi. Z TxA_2 syntetyzowany jest tromboksan B_2 (TxB_2). Aktywność biologiczna tromboksanów zależna jest od rodzaju tkanki docelowej. Synteza znacznych ilości tromboksanów w płytkach krwi sugeruje udział tych związków w naprawie uszkodzonych naczyń krwionośnych. Wykazano, że TxA_2 uczestniczy w tworzeniu skrzepu oraz obkurczając miejscowo naczynia, przyczynia się do zatrzymania krwotoku. Zaburzenia syntezy tromboksanów związane są z chorobami układu krążenia (chorobą zakrzepową i zawałem serca).

Prawie wszystkie ikozanoidy (poza hydroksylowymi pochodnymi kwasu eikozatetraenowego i PGJ_2) działają przez receptory związane z białkami G. Degradacja ikozanoidów następuje głównie w wątrobie, płucach i nerkach, gdzie odpowiednie dehydrogenazy, oksigenazy, reduktazy i acetylazy przekształcają ikozanoidy w metabolicznie nieaktywne produkty, usuwane z organizmu.

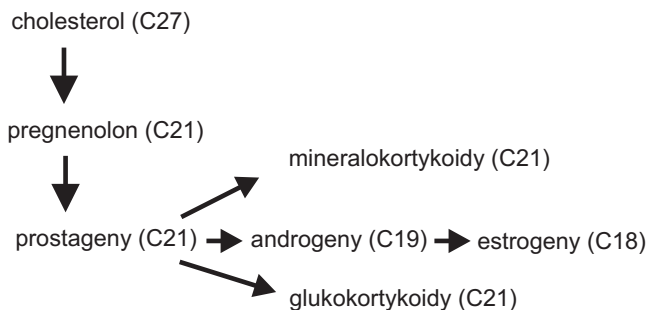
1.3. Hormony steroidowe i inne małowcząsteczkowe związki lipofilne

Hormony steroidowe są pochodnymi cyklopentanoperhydrofenantrenu (steranu), różniącymi się głównie liczbą wiązań nienasyconych w pierścieniu A oraz liczbą atomów węgla. Ze względu na pełnioną funkcję fizjologiczną wśród zwierzęcych i ludzkich hormonów steroidowych wyróżnia się: żeńskie (estrogeny) i męskie (androgeny)

hormony płciowe, progestageny, mineralokortykoidy i glukokortykoidy. Estrogeny (estron, estradiol, estriol), 18-węglowe hormony steroidowe syntetyzowane głównie przez jajniki stymulują rozwój żeńskich cech płciowych, cykl płciowy i owulację, podobnie jak najważniejszy z 21-węglowych progestagenów – progesteron warunkujący zmiany ciążowe w macicy. Androgeny (np. testosteron) produkowane przez komórki Leydiga jąder (i korę nadnerczy) są zbudowane z 19 atomów węgla i kontrolują rozwój męskich cech płciowych. Mineralokortykoidy i glukokortykoidy są 21-węglowymi steroidami. Mineralokortykoidy (głównie aldosteron) syntetyzowane są przez warstwę kłębkowatą kory nadnerczy, a regulują gospodarkę jonową i wodną, natomiast glukokortykoidy (np. kortyzol) syntetyzowane są przez warstwę pasmowatą kory nadnerczy i regulują metabolizm węglowodanów, lipidów oraz białek.

Hormony steroidowe syntetyzowane są z cholesterolu na drodze modyfikacji enzymatycznych, których pierwszym etapem jest odszczepienie sześciu węgla z łańcucha bocznego, prowadzące do powstania pregnenolonu. Utlenienie grupy 3-hydroksylowej tego steroidu do grupy ketonowej oraz izomeryzacja wiązania podwójnego Δ^5 do Δ^4 prowadzi do powstania progesteronu, a z niego i jego pochodnych są syntetyzowane wszystkie pozostałe hormony steroidowe (Rys. 1.3). W przypadku hormonów płciowych najpierw powstają androgeny (androstendion i testosteron), a z nich odpowiednio estron i estradiol. Wszystkie hormony steroidowe posiadają zdolność do przenikania przez błonę komórkową i wiążą się ze swoistymi receptorami w cytoplazmie lub jądrze komórkowym.

Obok ww. hormonów wiele innych związków może przekazywać informację za pośrednictwem receptorów wewnątrzkomórkowych. Są to zarówno związki strukturalnie podobne: hydroksysterole ($1\alpha,25$ -dihydrokalciferol, $22(R)$ -hydroksycholesterol, kwas chenodeoksycholowy), jak i cząsteczki o odmiennej budowie chemicznej: kwasy retinowe, hormony tarczycy, niektóre leukotrieny (8-HETE i 15-HETE) oraz prostaglandyna PGJ_2 . Każdy z tych związków odgrywa odmienną rolę biologiczną, a funkcja fizjologiczna niektórych z nich nie jest jeszcze ostatecznie ustalona. Kwasy retinowe uczestniczą w regulacji proliferacji i różnicowania komórek nerwowych, keratynocytów i komórek nabłonka oskrzeli. Wpływają na rozwój fotoreceptorów, kształtowanie siatkówki, soczewki i rogówki. Modulują działanie wielu hormonów poprzez regulację ekspresji genów ich receptorów (m.in. receptorów adrenaliny,



Rys. 1.3. Drogi syntezy hormonów steroidowych

insulinopodobnych czynników wzrostowych, dopaminy, neuropeptydu Y i niektórych interleukin). Regulują syntezę enzymów, takich jak: acetylotransferaza lizofosfatyd–retinol, transferaza glutationowa, glukokinaza, syntaza kwasów tłuszczowych. Aktywna forma witaminy D₃ (1 α ,25-dihydrokalcyferol) podtrzymuje homeostazę jonów wapnia, regulując ekspresję białek wiążących wapń, enzymów i hormonów zaangażowanych w ten proces. Wykazuje aktywność antyproliferacyjną i proróżnicującą. Hormony tarczycy (trijodotyronina i tyroksyna) są niezbędne do prawidłowego rozwoju organizmów i uczestniczą w regulacji wielu procesów metabolicznych. Między innymi w młodych organizmach stymulują syntezę hormonu wzrostu, a u osobników dorosłych regulują przemianę materii, zużycie tlenu oraz gospodarkę mineralną i wodną. Trijodotyronina jest hormonem niezbędnym do prawidłowego rozwoju układu nerwowego. Uczestniczy w regulacji wzrostu i dojrzewania neuronów, powstawaniu synaps i w procesach mielinizacji. Leukotrieny (8-HETE, 15-HETE) i PGJ₂ stymulują syntezę enzymów pośredniczących w przemianach lipidów, m.in. cytochromu P450, enzymów ω -oksydacji, karboksylazy fosfoenolopirogronianowej, dehydrogenazy acylo-CoA oraz regulują syntezę błonowego transportera kwasów tłuszczowych (FATP).

1.4. Oligo- i polipeptydy

Oligo- lub polipeptydy, przekazujące informację pomiędzy komórkami tego samego organizmu, stanowią najliczniejszą grupę związków o aktywności hormonalnej. Do peptydów sygnałowych zalicza się kilkaset związków, różniących się strukturą i aktywnością biologiczną. Zazwyczaj wyróżnia się hormony dokrewne i tkankowe, chociaż nie są to nazwy ścisłe, większość hormonów może być syntetyzowana przez różne komórki zwierzęce i ludzkie oraz rozprowadzana w obrębie organizmu zarówno przez krew, jak i na drodze dyfuzji międzykomórkowej. Dominująca liczba peptydowych hormonów dokrewnych jest syntetyzowana przez wyspecjalizowane gruczoły wydzielania wewnętrznego, takie jak podwzgórze, przysadka mózgową, trzustka itd. Bardzo wiele hormonów peptydowych jest syntetyzowanych przez różne rodzaje komórek, a praktycznie wszystkie komórki mają potencjalną zdolność syntezy wielu hormonów peptydowych. W stanach patologicznych objawia się to syntezą hormonów (ektopowych) przez tkanki dla nich niespecyficzne. Wszystkie peptydy sygnałowe oddziałują poprzez interakcję ze swoistymi receptorami błonowymi, ale mechanizm ich działania jest zróżnicowany.

Nie sposób wymienić wszystkich związków peptydowych o aktywności hormonalnej. Należą do nich m.in. hormony dokrewne (endokrynne) syntetyzowane w podwzgórze: czynniki stymulujące (RH, ang. *releasing hormone*) i hamujące (IH, ang. *inhibiting hormone*) wydzielanie hormonów – gonadotropiny (GRH), kortykotropiny (CRH), hormonu wzrostu (GHRH i GHIH), prolaktyny (PRH i PIH), tyreotropiny (TRH). Hormony peptydowe są także syntetyzowane w przysadce: hormon wzrostu (GH), prolaktyna (PRL), hormon adenokortykotropowy (ACTH), hormon stymulujący pęcherzyki Graafa (FSH), hormon luteinizujący (LH), tyreotropina (TSH), melanotropina, oksytocyna, wazopresyna, w trzustce: insulina, glukagon, polipeptyd

trzustkowy, somatostatyna, i w przewodzie pokarmowym: gastryna, sekretyna, peptyd hamujący gastrynę, motylina, peptydy koniczynkowe lub peptydy regulujące ciśnienie krwi (kininy, angiotensyna II). Duże znaczenie fizjologiczne posiadają neuropeptydy regulujące wiele funkcji organizmów zwierzęcych, zarówno w układzie nerwowym, jak i poza nim. Są to nie tylko typowe neurotransmitery i neuromodulatory (substancja P, neurotensyna, enkefaliny, dynorfiny, endorfiny), lecz także hormony wielofunkcyjne, takie jak wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) i przysadkowy polipeptyd aktywujący cyklazę adenylanową (PACAP) o aktywności immunomodulacyjnej. Jeszcze inne neuropeptydy, jak oreksyny, peptydy CART (ang. *cocaine and amphetamine regulated peptides*), rodzina galaniny, neuropeptyd Y (PY) i peptyd YY (PYY), regulują wiele procesów biologicznych, m.in. łaknienie, i wpływają na homeostazę energetyczną organizmu oraz pośredniczą w procesach czuciowych, reakcjach stresowych i kontroli wydzielania endokrynnego.

Osobną grupę stanowią peptydy natriuretyczne (NPs, ang. *natriuretic peptides* lub NF, ang. *natriuretic factors*), o m.cz. około 10 kDa, występujące powszechnie w tkankach kręgowców. NPs utrzymują homeostazę jonową (bilans sodu i potasu) oraz wodną. W zależności od pełnionej funkcji fizjologicznej wyróżnia się: przedsiódkowy (ANP), komorowy (VNP), mózgowy (BNP), nerkowy (RNP) oraz peptyd natriuretyczny typu C (CNP). ANP, VNP i BNP są produkowane w sercu i wydzielane do krążenia. CNP jest syntetyzowany w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, RNP zaś w nerkach. Działają przez receptory o aktywności cyklazy guanylanowej.

Niektóre z wymienionych peptydów mogą być produkowane przez różne tkanki organizmu i pełnić odmienne funkcje biologiczne. Przykładem może być somatostatyna (GHIH), która występuje nie tylko w podwzgórzu, lecz także w innych obszarach układu nerwowego, oraz w tarczycy, przewodzie pokarmowym i trzustce. Prócz zapisanej w jej nazwie aktywności hamowania sekrecji hormonu wzrostu (somatotropiny) somatostatyna reguluje także wydzielanie tyreotropiny, prolaktyny, insuliny, glukagonu, gastryny i hormonów tarczycy.

Peptydy zaliczane do tzw. hormonów tkankowych to przede wszystkim związki o bardzo szerokim spektrum aktywności, zależnym od rodzaju komórek docelowych, określane często jako hormony plejotropowe. Wśród nich wyróżnia się dwie duże grupy polipeptydów, czynniki wzrostowe (GF) i cytokiny, z których każda liczy po kilkadziesiąt związków (Tabela 1). Obecnie, kiedy znamy już sekwencję około 100 różnych peptydów plejotropowych, możemy wśród nich wyróżnić rodziny czynników o podobnej budowie chemicznej (EGF-, PDGF-, HGF, FGF-, VEGF- i insulino-podobnych), tzw. klasycznych czynników wzrostowych lub peptydów o określonej aktywności biologicznej, np. hematopoetycznej (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, SCF, EPO, TPO), limfocytotroficznej (interleukiny), chemotaktycznej (chemokiny), przeciwwirusowej (interferony) itd. Peptydy należące do superrodziny transformującego czynnika wzrostowego typu β stanowią grupę około 30 peptydów, łączącą właściwości typowe dla regulatorów wzrostu i różnicowania oraz cytokin. Rodziny CTGF nie można zaliczyć ani do klasycznych czynników wzrostowych, ani do cytokin. Obecnie uważa się, że są to białka, które pośredniczą w sygnalizacji inicjowanej składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej i/lub modulują aktywność czynników wzrostowych, hormonów lub cytokin.

Tabela 1. Peptydowe czynniki wzrostowe i cytokiny

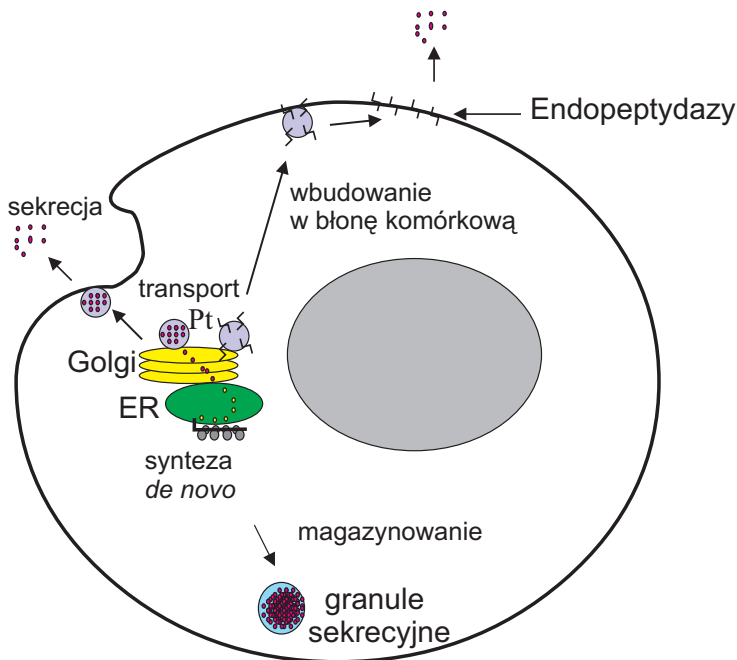
Rodzina	Przedstawiciele
Płytkopochodnego czynnika wzrostowego	PDGF (AA, AB, BB, CC, DD)
Epidermalnego czynnika wzrostowego	EGF , TGF α , AR, HB-EGF, BTC, ER, HRG (1–4)
Insulinopodobnych czynników wzrostowych	IGFI (I i II)
Fibroblastycznych czynników wzrostowych	FGF (1–23)
Czynnika wzrostowego hepatocytów	HGF
Czynnika wzrostowego naczyń i komórek epitelialnych	VEGF (A–E), PIGF
Czynnika wzrostu nerwu	NGF , BDNF, NT-3, NT-4/5
Glejpochodnego czynnika wzrostowego	GDNF , NRTN, PSPN, ARTN
Transformującego czynnika wzrostowego typu β	TGFβ (1–3)
Czynników wzrostowych komórek krwi	CSF (G, M, GM), SCF, EPO, TPO
Interleukin	IL (1–32*)
Czynnika nekrozy nowotworu	TNF , Lt α , Lt β
Interferonów	INF (23 typu I, 1 typu II)
Chemokin	Ch (około 40)
Endotelin	Et (1–5)
Czynnika wzrostowego tkanki łącznej	CTGF , Cyr61

AR – *amphiregulin*, ARTN – *artemin*, BDNF – *brain-derived growth factor*, BTC – *betacellulin*, Ch – *chemokine*, CSF – *colony stimulating factor*, CTGF – *connective tissue growth factor*, Cyr – *cysteine rich*, EGF – *epidermal growth factor*, EPO – *erythropoietin*, ER – *epiregulin*, Et – *endothelin*, FGF – *fibroblast growth factor*, G – *granulocyte*, GDNF – *glial cell derived growth factor*, GM – *granulocyte-macrophage*, HB-EGF – *heparin binding-epidermal growth factor*, HGF – *hepatocyte growth factor*, HRG – *heuregulin*, IGF – *insulin-like growth factor*, IL – *interleukin*, INF – *interferon*, M – *macrophage*, NGF – *nerve growth factor*, NRTN – *neurturin*, NT – *neurotrophin*, PDGF – *platelet-derived growth factor*, PIGF – *placenta growth factor*, PSPN – *persephin*, SCF – *stem cell factor*, TGF – *transforming growth factor*, TNF – *tumor necrosis factor*, TPO – *trombopoietin*, VEGF – *vascular endothelial growth factor*

* do interleukin zaliczane są ponadto także peptydy, których nazwy nie odzwierciedlają ich przynależności do tej rodziny (OSM, LIF, CTNF, CT-1).

Trudno podać precyzyjną definicję peptydowych czynników wzrostowych ze względu na dość szeroki, zależny od tkanki docelowej, zakres ich aktywności biologicznej. Zgodnie z propozycją Jamesa i Bradshawa czynnikami wzrostowymi nazywamy peptydy inicjujące w komórkach docelowych swoistą odpowiedź hipertroficzną lub hiperplastyczną i działające poprzez określony mechanizm receptorowy. Definicja ta pasuje do klasycznych czynników wzrostowych i nie zawęża pojęcia czynnika wzrostowego do peptydów o aktywności mitogennej. Warto także podkreślić, że wszystkie klasyczne czynniki wzrostowe działają przez ten sam typ receptorów błonowych o aktywności kinazy tyrozynowej. Peptydy zaliczane do superrodziny TGF β łączą zdolność do regulacji różnicowania komórkowego z aktywnością immunomodulacyjną i wszystkie przekazują sygnał przez receptory o aktywności kinazy serynowo-treoninowej. Cytokiny to duża grupa polipeptydów o bardzo szerokim zakresie działania. Nie są typowymi czynnikami wzrostowymi i działają przez różne typy receptorów. Większość z nich (poza chemokinami) ma zdolność regulacji wzrostu i/lub różnicowania komórek określonego typu.

Cytokiny to duża rodzina mediatorów białkowych obejmująca: interleukiny (ILs), chemokiny (Chs), interferony (INFs), czynniki różnicowania komórek krwi oraz czynniki martwicy nowotworu (TNFs). Przez niektórych autorów do rodziny cytokin zaliczane są także endoteliny. Cytokiny są m.in. głównymi regulatorami układu immunologicznego i hematopoetycznego (krwiotwórczego). Cytokiny hematopoetyczne, odpowiedzialne za utrzymanie „steady-state” układu krwiotwórczego,



Rys. 1.4. Synteza, sekrecja i magazynowanie peptydów sygnałowych

produkowane są ciągle w niewielkich ilościach, przede wszystkim przez komórki stromalne, endotelialne i fibroblasty. Natomiast cytokiny produkowane przez aktywowane limfocyty, makrofagi i komórki tuczne uczestniczą głównie w odpowiedzi immunologicznej i zapalnej organizmu. Dwie podstawowe właściwości cytokin to ich funkcjonalna plejotropia i redundancja, co oznacza, że każda cytokina oddziałuje z różnymi typami komórek, a szereg różnych cytokin może inicjować podobną odpowiedź biologiczną tej samej komórki. W przeciwieństwie do czynników wzrostowych cytokiny działają przez różne strukturalnie i funkcjonalnie typy receptorów, poczynając od receptorów asocjujących z białkami G (chemokiny), przez receptory o aktywności kinazy tyrozynowej (SCF, G-CSF, M-CSF) i receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi (większość ILs), na receptorach z domeną śmierci (TNF, L α) i receptorach Toll-podobnych (IL-1, IL-18) kończąc.

Podobnie jak wszystkie białka, peptydy sygnałowe syntetyzowane są na matrycy mRNA, co ma szczególne znaczenie dla dokładności i swoistości niesionej przez nie informacji. Także podobny do innych białek syntetyzowanych na rybosomach związanych z siateczką endoplazmatyczną jest sposób ich sekrecji. Probiałka posiadające sekwencję sygnałową na N-końcu cząsteczki, translokowane w całości do światła retikulum endoplazmatycznego (RE), po odcięciu sekwencji sygnałowej i obróbce potranslacyjnej, pakowane są do pęcherzyków transportujących i wydzielane na zewnątrz komórki (Rys. 1.4). Peptydy zakotwiczone w błonie RE są wbudowywane w błonę plazmatyczną i mogą przekazywać informację na drodze jukstakrynej (przez ich część zewnątrzkomórkową) lub ulegać cięciu proteolitycznemu, w wyniku którego część zewnątrzkomórkowa zostaje uwolniona w postaci rozpuszczalnego hormonu. Niektóre z peptydów sygnałowych (np. PDGF, HGF, TGF β) są gromadzone wewnątrz komórek je syntetyzujących w specjalnych granulach sekrecyjnych (np. w α -granulach płytek krwi) i wydzielane na zewnątrz po aktywacji tych komórek.

Literatura uzupełniająca

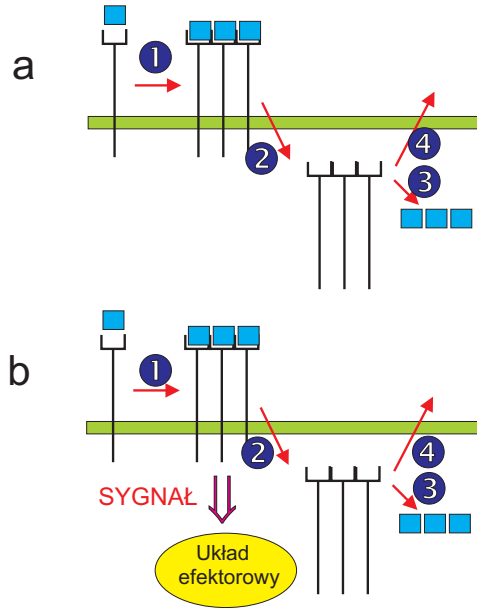
- 5th International Symposium on VIP, PACAP, secretin, glucagon and related peptides. Regul. Peptides 2001, 102, 49–68.
- Bassett J.H.D., Harvey C.B., Williams G.R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specified nuclear and extra nuclear actions. Mol. Cell Endocrinol. 2003, 213, 1–11.
- Ben-Jonathan N., Hugo E.R., Brandebourg T.D., LaPensee C.R. Focus on prolactin as a metabolic hormone. Trends Endocrinol. Met. 2006, 17, 110–116.
- Brash A.R. Arachidonic acid as a bioactive molecule. J. Clin. Invest. 2001, 107, 1339–1345.
- Brook C.G.D., Marshall N.J. Podstawy endokrynologii. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2000.
- Brooks A.J., Wool J.W., Tunny K.A., Waters M.J. Growth hormone receptor; mechanism of action. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2008, 40, 1984–1889.
- Cai X.J., Liu X.H., Evans M., Clapham J.C., Wilson S., Arch J.R.S., Morris R., Williams G. Orexins and feeding: special occasions or everyday occurrence? Regul. Peptides 2002, 104, 1–9.
- Cox H.M. Peptide YY: a neuroendocrine neighbor of note. Peptides 2007, 28, 345–351.
- De Vriese C., Delporte C. Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2008, 40, 1420–1424.

- Fitzpatrick F.A., Soberman R. Regulated formation of eicosanoids. *J. Clin. Invest.* 2001, 107, 1347–1351.
- Gensure R.C., Gardella T.J., Juppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 328, 666–678.
- Harizi H., Corcuff J.-B., Gualda N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol. Med.* 2008, 14, 461–469.
- Hokfelt T., Tatemoto K. Galanin – 25 years with a multi talented neuropeptide. *Cell Mol. Life Sci.* 2008, 65, 1793–1795.
- Huang L., Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res.* 2000, 10, 81–92.
- Kaletha K., Chodorowski Z., Dutka P., Nagle-Starczynowska G. Endoteliny – w dekadę po ich odkryciu. *Post. Biochem.* 1999, 45, 193–201.
- Klein A. Peptydy regulujące wzrost komórkowy. Czynniki wzrostowe i cytokiny. Red. A. Dubin, *Seria wydawnicza Wydziału Biotechnologii UJ*, ISBN 83-88519-96-4, Kraków 2006, 1–137.
- Kuhar M.J., Adams L.D., Hunter R.G., Dall Vechia S., Smith Y. CART peptides. *Regul. Peptides* 2000, 89, 1–6.
- Kumar T.R. Mouse models for gonadotropins: a 15-year Saga. *Mol. Cell Endocrinol.* 2007, 260–262, 249–254.
- Leibiger I.B., Leibiger B., Berggren P.O. Insulin feedback action on pancreatic β -cell function. *FEBS Lett.* 2002, 532, 1–6.
- Lichanska A.M., Waters M.J. How growth hormone controls growth, obesity and sexual dimorphism. *Trends Gen.* 2008, 24, 41–47.
- Meth R.D., Thompson E.B. Hormonal regulation of physiological cell turnover and apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000, 301, 101–124.
- Michael D.J., Cai H, Xiong W., Ouyang J., Chow R.H. Mechanisms of peptide hormone secretion. *Trends Endocrinol. Met.* 2006, 17, 408–415.
- Moran T.H. Pancreatic polypeptide: more than just another gut hormone? *Gastroenterology* 2003, 124, 1542–1544.
- Nauman J. Trijodotyronina i jej receptory jądrowe w procesie nowotworzenia. *Post. Biol. Kom.* 2001, 28, 183–196.
- Pedrazzini T., Pralong F., Grouzmann E. Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cell Mol. Life Sci.* 2003, 60, 350–377.
- Perry J.K., Emerald B.S., Mertani H.C., Lobie P.E. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Horm. IGF Res.* 2006, 16, 277–289.
- Ptak K., Lewandowski M.H., Monteau R. Neurokinin i ich receptory. *Post. Biol. Kom.* 2000, 27, 273–285.
- Tato C.M., Cua D.J. SnapsShot: Cytokines I. *Cell* 2008, 132, 324.e1–324.e2.
- Tato C.M., Cua D.J. SnapsShot: Cytokines II. *Cell* 2008, 132, 500.e1–500.e2.
- Tato C.M., Cua D.J. SnapsShot: Cytokines III. *Cell* 2008, 132, 900.e1–900.e2.
- Tato C.M., Cua D.J. SnapsShot: Cytokines IV. *Cell* 2008, 132, 1062.e1–1062.e2.
- Tengholm A, Gylfe E. Oscillatory control of insulin secretion. *Mol. Cell Endocrinol.* 2009, 297, 58–72.
- Toppari J., Kaleva M., Virtanen H.E., Main K.M., Skakkebaek N.E. Luteinizing hormone in testicular descent. *Mol. Cell Endocrinol.* 2007, 269, 34–37.
- Watt H.L., Kharmate G., Kumar U. Biology of somatostatin in breast cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* 2008, 286, 251–261.
- Williams G.R., Wright N.A. Trefoil factor family domain peptides. *Virchows Arch.* 1997, 431, 299–304.
- Zdanov A., Wlodawer A. A new look at cytokine signaling. *Cell* 2008, 132, 179–180.

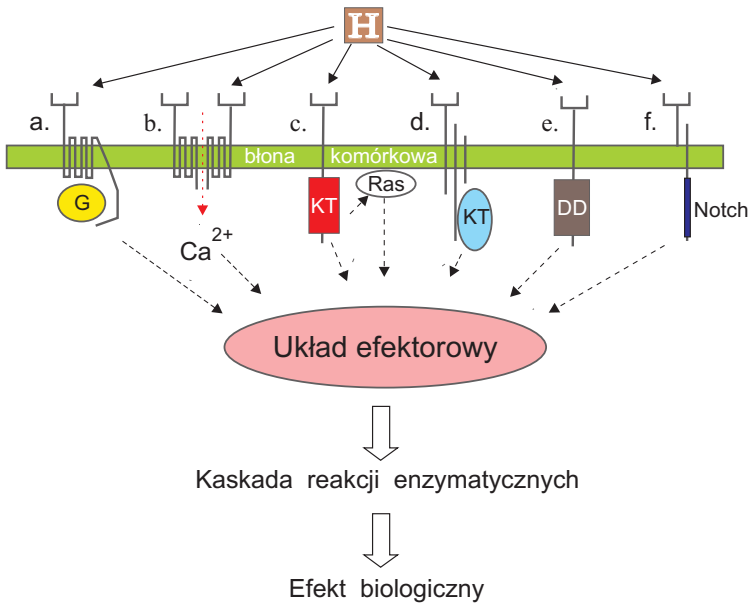
2. Receptory

Procesy biochemiczne zaangażowane w odbiór i przekaz informacji niesionej przez chemiczne lub fizyczne czynniki zewnątrzkomórkowe (jony, metabolity, hormony, neurotransmitery, czynniki wzrostowe, substancje zapachowe, światło) na wewnątrzkomórkowe układy enzymatyczne określane są nazwą sygnalizacji transbłonowej. Aczkolwiek podstawową rolą błony komórkowej jest stworzenie bariery odgradzającej wewnątrz komórki od środowiska zewnątrzkomórkowego, istnieje wiele różnych sposobów przenoszenia informacji przez błonę komórkową. Jednym z najprostszych jest selektywny transport jonów lub metabolitów przez wyspecjalizowane struktury białkowe określane jako pompy, kanały jonowe lub transportery błonowe. Energia potrzebna do transportu tych związków do wnętrza lub na zewnątrz komórki może pochodzić z różnic potencjału elektrochemicznego po obu stronach błony (transport bierny) lub jest dostarczana przez sprzężone z kanałami układy enzymatyczne (np. ATP-azy). W obu przypadkach jon lub metabolit jest posłańcem (pierwotnym przekazywaczem informacji), który powoduje określoną odpowiedź metaboliczną komórki. W wielu wypadkach substancje przenoszące informację zewnątrzkomórkową są zasocjowane z białkami transportującymi (np. cholesterol z lipoproteinami osocza, żelazo z transferyną), które z kolei wiążą się ze swoistymi białkami błonowymi (odpowiednio, z receptorami lipoprotein o niskiej gęstości, LDL i receptorami transferyny), odpowiedzialnymi za endocytozę kompleksów ligand–receptor. Receptory te, określane także jako receptory typu „cargo” (ang. ładunek w sensie towaru), funkcjonują jako swoiste przenośniki określonych związków z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórki (Rys. 2.1a). Podobnie jak w przypadku kanałów jonowych przenoszony związek jest posłańcem przekazującym informację do wnętrza komórki. Białka transportujące i białka wiążące same nie generują sygnału. W przeciwieństwie do receptorów typu „cargo” receptory hormonów mają nie tylko właściwość selektywnego rozpoznawania liganda, lecz także zdolność w połączeniu z nim do generowania i wzmacniania sygnału przekazywanego do wnętrza komórki (Rys. 2.1b). Są to wyspecjalizowane struktury białkowe, usytuowane we wnętrzu komórek (receptory wewnątrzkomórkowe) lub w błonie komórkowej (receptory błonowe) organizmów żywych, przystosowane do odbioru informacji niesionej przez różnorodne grupy związków biologicznie ważnych, takie jak: substancje zapachowe, opiaty, hormony, neurotransmitery, czynniki wzrostowe, cytokiny itp.

Osobną grupę białek pośredniczących w modulacji (ale nie w przekazie) sygnałów zewnątrzkomórkowych stanowią tzw. receptory rozpuszczalne, będące odcięciami enzymatycznie częścią zewnątrzkomórkową receptorów błonowych. Receptor hormonu oznacza cząsteczkę białka, która poprzez zmianę swojej konformacji aktywnie uczestniczy w przekazaniu sygnału, niezależnie od losów liganda. W tym znaczeniu internalizacja liganda jest procesem nieistotnym dla przekazania sygnału, chociaż



Rys. 2.1. Mechanizm przekazu sygnału przez receptory typu „cargo” (a) i receptory hormonalne (b). 1 – oligomeryzacja receptorów, 2 – endocytoza kompleksów ligand–receptor, 3 – uwolnienie liganda, 4 – recyrkulacja receptorów



Rys. 2.2. Wybrane receptory błonowe, różniące się mechanizmem przekazu sygnału

pojawia się coraz więcej dowodów na to, że zależna od receptorów endocytoza niektórych czynników wzrostowych i hormonów (np. NGF, EGF, insuliny) jest niezbędna do pełnej odpowiedzi biologicznej komórki.

Większość receptorów to białka mozaikowe, w których wyróżnia się strukturalnie i funkcjonalnie zdefiniowane sekwencje aminokwasowe, określane jako moduły lub domeny, powtarzające się w co najmniej kilku białkach. Poszczególne moduły mogą występować pojedynczo lub powtarzać się wielokrotnie (nawet ponad 50 razy) w jednej cząsteczce białka, tworząc zdefiniowane struktury w białkach pełniących odmienne funkcje biologiczne. Obecnie znanych jest kilkaset różnych białek mozaikowych, nie licząc izoform tkankowych i gatunkowych. Funkcja fizjologiczna białek mozaikowych jest ogromnie zróżnicowana, poczynając od ich udziału w adhezji komórkowej (białka adhezyjne), przez regulację hormonalną (czynniki wzrostowe, cytokiny i ich receptory), na regulacji ekspresji genów (czynniki transkrypcyjne) kończąc. Białka mozaikowe występują głównie pozakomórkowo lub wbudowane są w błonę plazmatyczną. Należą do nich, poza receptorami, takie białka jak: fibronektyna, laminina, selektyny, kolagen i plazminogen. Występują powszechnie u zwierząt i sporadycznie u roślin (np. witronektyna). Pojedyncze moduły odnaleziono również w białkach bakteryjnych (np. w celulazie) i wirusowych (np. w prekursorze czynnika wzrostowego wirusa krowianki). Znana jest sekwencja aminokwasowa i struktura trzeciorzędowa wielu różnych modułów znalezionych w części zewnątrzkomórkowej receptorów błonowych. Najlepiej poznane to moduły podobne do: epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF), przeciwciał (Ig-podobne), białek dopełniacza (CCP), precla (moduły K, ang. *kringle*) oraz moduły fibronektynowe (F) i moduły bogate w cysteinę. Charakterystyczną cechą konformacji tych modułów jest przewaga struktur typu β -harmonijki, w odróżnieniu od modułów uczestniczących w interakcji białko–DNA, w których przeważa struktura α -helisy. Typowymi przedstawicielami tych ostatnich są motywy: palca cynkowego (ang. *zinc finger*), zamka leucynowego (ang. *leucine zipper*) i helisa–skręt–helisa (ang. *helix–turn–helix*).

Mimo że wszystkie receptory błonowe są białkami integralnymi, ich struktura i mechanizm przeniesienia sygnału przez błonę komórkową są różne i zależne przede wszystkim od rodzaju informacji (struktury cząsteczki niosącej informację). Wyróżnia się kilka podstawowych sposobów przekazywania informacji zewnątrzkomórkowej z udziałem receptorów błonowych: a) regulowaną ligandem aktywację białek G, b) modulowaną ligandem aktywację kanału jonowego, c) stymulowaną ligandem aktywację aktywności enzymatycznej, zlokalizowanej w wewnątrzkomórkowej części receptora, d) stymulowaną ligandem aktywację niereceptorowych kinaz tyrozynowych, e) regulowaną ligandem asocjację białek zawierających „domeny śmierci” i f) sygnalizację typu Notch (Rys. 2.2).

Każdy z tych typów receptorów jest inaczej zbudowany i każdy z nich przenosi informację przez błonę komórkową w inny sposób. Oprócz możliwości przedstawionych na rysunku 2.2, opisano mechanizmy przekazu sygnału charakterystyczne dla nielicznej grupy receptorów, odmienne od opisanych wyżej, m.in. obejmujące stymulowaną przyłączeniem liganda aktywację enzymów zlokalizowanych przy wewnętrznej powierzchni błony komórkowej (np. fosfolipazy A_2 , fosfolipazy fosfocholinowej) lub kompleksu białek TRAIL. Niezależnie od różnic w mechanizmie

przeniesienia (przetworzenia) sygnału przez błonę komórkową receptory błonowe inicjują szereg zdarzeń wewnątrzkomórkowych, obejmujących aktywację lub dezaktywację określonych układów efektorowych, tworzenie wtórnych przekaźników i stymulację wielu enzymów, określaną mianem kaskad enzymatycznych. Podstawą chemiczną przekazu sygnału inicjowanego związaniem liganda z jego receptorem jest interakcja białko–białko. Odpowiedź biologiczna komórki na sygnał przekazany przez błonę komórkową jest wypadkową wszystkich szlaków metabolicznych, inicjowanych przyłączeniem liganda do jego receptora. Poznano dotąd strukturę kilkuset białek transbłonowych pełniących funkcje receptorowe. W wypadku wielu z nich nieznane są dotąd swoiste ligandy i dlatego receptory te zaliczane są do tzw. receptorów sierocych.

Przez ostatnie dekady staraliśmy się poznać mechanizmy, które umożliwiają przesłanie sygnału od receptora błonowego do cytoplazmatycznych lub jądrowych układów docelowych. Zrozumienie mechanizmu przenoszenia sygnału w sensie ogólnym to wiedza pozwalająca odpowiedzieć na serię pytań, m.in.: a) czy różne związki przenoszące informację wykorzystują podobne mechanizmy molekularne do kontroli zachowania się komórki docelowej?, b) jak receptory błonowe oddziałują na poszczególne układy efektorowe i jak poszczególne szlaki przekazu informacji są wzajemnie od siebie odseparowane lub z sobą powiązane?, c) w jaki sposób różne drogi sygnalizacji wewnątrzkomórkowej współdziałają z sobą? Odpowiedź na to ostatnie pytanie jest niezwykle ważna, ponieważ komórka musi funkcjonować jako jednostka, której różne elementy odpowiadają w sposób zsynchronizowany na stymulację zewnętrzną, ale wyjaśnienie mechanizmów współdziałania nie jest łatwe. Chociaż potencjalnie duża część genomu jest zaangażowana w regulację transdukcji sygnału, jest wciąż niezrozumiałe, jak stosunkowo niewielka liczba hormonów może kontrolować swoistą i bardzo zróżnicowaną odpowiedź wielu różnych typów komórek. Sugeruje to współzależność funkcjonalną cząsteczek sygnałowych oraz niesłychaną złożoność i elastyczność mechanizmów odpowiedzi komórkowej.

2.1. Receptory wewnątrzkomórkowe (jądrowe)

Receptory wewnątrzkomórkowe nazywane często receptorami jądrowymi są to białka o charakterze czynników transkrypcyjnych, zlokalizowane głównie w jądrze komórki, wiążące swoiście małe ligandy o charakterze lipofilnym, które mają zdolność przenikania podwójnej warstwy lipidowej błony komórkowej. Do rodziny receptorów wewnątrzkomórkowych należą receptory steroidów: glukokortykoidów, mineralokortykoidów, progesteronu, androgenów, estrogenów, 1,25-dihydroksycholekalcyferolu, kwasów dezoksyżółciowych i oksysteroli oraz kwasów retinowych, hormonów tarczycy, leukotrienów 8-HETE i 15-HETE, prostaglandyny PGI_2 (Tabela 2). Dużą grupę receptorów jądrowych stanowią receptory sieroce, w tym także te, które wykazują aktywność transaktywacyjną w nieobecności ligandów.

Receptory wewnątrzkomórkowe stanowią jedną z najstarszych ewolucyjnie grup czynników transkrypcyjnych, przekazujących sygnał zewnątrzkomórkowy bezpośrednio do jądra komórki. Czynniki transkrypcyjne są białkami, które oddziałują

Tabela 2. Rodzaje receptorów wewnątrzkomórkowych (jądrowych)

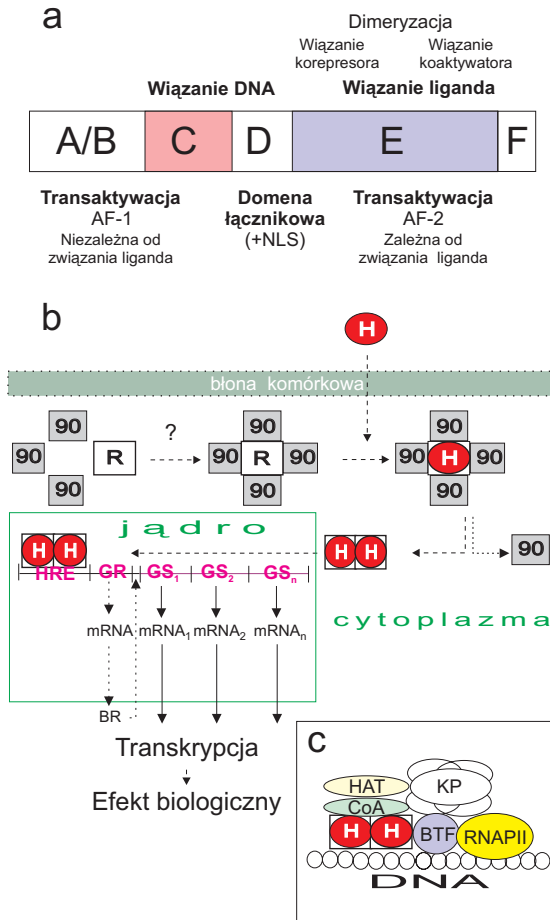
1. Receptory hormonów steroidowych: glukokortykoidów (GR, α i β), mineralokortykoidów (MR), progesteronu (PR, A i B), androgenów (AR), estrogenów (ER, α i β)
2. Receptory innych pochodnych steroidów: 1,25-dihydroksycholekalcyferolu (VDR), kwasów dezoksyżółciowych (FXR) i oksysteroli (LXR)
3. Receptory kwasów retinowych (retinowych) (RAR; α , β i γ ; RXR; α , β i γ)
4. Receptory hormonów tarczycy (TR)
5. Receptory kwasów tłuszczowych (PPAR; α , β i γ)
6. Receptory sieroce (ROR, COUP-TF, HNF-4 i inne)

z sekwencjami promotorowymi i/lub wzmacniającymi DNA, modulując szybkość transkrypcji genów. Nazwa „receptory jądrowe”, chociaż powszechnie używana, może być myląca, przynajmniej w przypadku niektórych z tych białek. Przykładowo, poziom receptora hormonów tarczycy (TR β) w nieobecności liganda jest podobny w cytoplazmie i w jądrze komórki. Dopiero w obecności trijodotyroniny stężenie tego receptora w jądrze wzrasta i jest ponad 5-krotnie większe niż w cytoplazmie. Ze

Tabela 3. Lokalizacja i formy molekularne receptorów wewnątrzkomórkowych

Klasa i typ receptora	Receptor związany z ligandem		Dominująca forma receptora	
	Lokalizacja	Wiązanie z Hsp		
Klasa I				
Sieroce	jądro/cytoplazma	?	monomer	monomer
Klasa II				
GR	cytoplazma	+	homodimer	
ER	jądro	+	homodimer	
PR	jądro	+	homodimer	
Klasa III				
VDR	jądro	-		heterodimer z RXR
TR	jądro	-		heterodimer z RXR
RAR	jądro	-		heterodimer z RXR
PPAR	jądro	-		heterodimer z RXR

względem na sposób wiązania do sekwencji HRE wyróżnia się trzy klasy receptorów wewnątrzkomórkowych (Tabela 3). Do klasy I zalicza się niektóre receptory sieroce, które wiążą się z DNA w formie monomerycznej, do klasy II – głównie receptory steroidów, wiążące się z DNA w formie homodimerów, a do klasy III receptory tworzące heterodimery z receptorem RXR (m.in. receptory: RAR, TR, VDR, PPAR).



Rys. 2.3. Domenowa budowa receptorów wewnątrzkomórkowych (a), schemat sygnalizacji inicjowanej związaniem hormonu z receptorem (b) oraz kompleks inicjujący transkrypcję (c). HRE – element wiążący hormon, GR – gen regulatorowy, GS – geny strukturalne, BR – białko regulujące transkrypcję GS, R – receptor, H – hormon steroidowy, 90 (Hsp90) – białko szoku termicznego, CoA – koaktywator transkrypcji, KP – kompleks pośredniczący, BTF – podstawowe czynniki transkrypcyjne, RNAPII – polimeraza II RNA, DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy, HAT – acetylotransferaza histonów

Wszystkie receptory wewnątrzkomórkowe mają podobną budowę domenową, mimo różnic w wielkości ich cząsteczek. Zazwyczaj wyróżnia się pięć–sześć domen, oznaczonych literami od A do F, z których każda oddzielnie lub w kooperacji z innymi domenami pełni określoną funkcję biologiczną (Rys. 2.3a). Na N-końcu cząsteczki receptora zlokalizowane są domeny A i B, oznaczane często jako jedna domena A/B. Jest to różnej długości sekwencja aminokwasowa (od 23 aa dla receptora VDR do 602 aa dla receptora aldosteronu), pełniąca funkcję niezależnej od przyłączenia liganda aktywacji transkrypcji, (AF-1, ang. *activation function 1*). Domena ta posiada zróżnicowaną budowę w zależności od typu komórki oraz zdolność wiązania do określonych sekwencji promotora/enhancera. Konserwatywna ewolucyjnie domena C (DBD, ang. *DNA binding domain*) zbudowana jest z 66 reszt aminokwasowych, zawierających 8 reszt cysteinowych w pozycjach: 1, 4, 18, 21, 37, 43, 53 i 56, wiążących koordynacyjnie dwa jony Zn^{2+} , tworząc charakterystyczną strukturę tzw. palców cynkowych. Domena ta jest odpowiedzialna za dimeryzację i przyłączenie receptora do DNA, a właściwie do odcinka regulatorowego genu, określanego ogólnie jako HRE (ang. *hormone response element*). W elemencie HRE w większości receptorów wewnątrzkomórkowych wyróżnia się dwa „półmiejsca”, określone sekwencje nukleotydów wiążących monomer receptora. Są to dwie sekwencje sześcioklebotydowe, oddzielone kilkoma (1–5) nukleotydami, których liczba decyduje o swoistości wiązania receptora. Obie sekwencje mogą być ułożone jako proste powtórzenia lub palindromowo. Dlatego, z wyjątkiem niektórych receptorów sierocych, wszystkie pozostałe są aktywne biologicznie tylko w postaci homo- lub heterodimerów, czyli tylko dimery są zdolne do transaktywacji (stymulacji lub inhibicji transkrypcji) określonych genów.

W wiązaniu do DNA współuczestniczy również domena łącznikowa D, która ponadto zawiera sekwencję NLS (ang. *nuclear localization signal*), odpowiedzialną za translokację receptorów do jądra komórkowego. Domena E (LBD, ang. *ligand binding domain*) receptorów różnych rodzajów hormonów, zbudowana z około 250 aa, odpowiedzialna za wiązanie receptora z ligandem, jest zróżnicowana pod względem sekwencji aminokwasów. Domena ta współdziała także z domeną C w procesie dimeryzacji receptorów oraz z domeną A/B w zależności od związania liganda aktywacji transkrypcji (AF-2). Domena ta ma także miejsca wiązania wielu partnerów białkowych, takich jak receptory homo- i heterologiczne (w procesie dimeryzacji), korepresory, koaktywatory i inne związki budujące kompleks transkrypcyjny. Niektóre receptory wewnątrzkomórkowe zawierają także domenę F o niesprecyzowanej funkcji biologicznej.

Znanych jest obecnie około 150 receptorów wewnątrzkomórkowych. Ze względu na różnice w m.cz. tych receptorów wyróżnia się zazwyczaj małe receptory wewnątrzkomórkowe (receptory: hormonów tarczycy, kwasów retinowych i witaminy D_3) oraz duże receptory (receptory hormonów steroidowych). Podobne strukturalnie białka znaleziono także u wielu gatunków roślin.

Klasyczna hipoteza opisująca mechanizm aktywacji receptorów wewnątrzkomórkowych zakłada, że receptory zlokalizowane w cytoplazmie są związane z białkami Hsp (głównie Hsp90), które utrzymują receptor w konformacji o dużym powinowactwie do liganda i małym do DNA. Aczkolwiek wielu autorów uważa, że

kompleksy receptor–białka Hsp, trwałe *in vitro*, niekoniecznie są stabilne w warunkach fizjologicznych. Związanie liganda (hormonu) z receptorem inicjuje serię zdarzeń wewnątrzkomórkowych obejmującą: dysocjację kompleksów receptor–Hsp, fosforylację receptora i dimeryzację kompleksów hormon–receptor. Cytoplazmatyczne kompleksy ligand–receptor wędrują do jądra komórkowego, gdzie wiążą się z sekwencjami HRE. Związanie kompleksu ligand–receptor z sekwencją HRE stymuluje ekspresję genu białka regulatorowego, które z kolei indukuje lub hamuje transkrypcję określonej grupy genów (zazwyczaj kilkudziesięciu), a zmiana profilu ekspresji tych genów determinuje swoistą odpowiedź komórkową (Rys. 2.3b). Aktywność transkrypcyjna receptorów wewnątrzkomórkowych jest regulowana na drodze fosforylacji reszt Ser przez kinazy MAP (w domenie A/B) oraz reszt tyrozyny prawdopodobnie przez kinazy tyrozynowe niereceptorowe z rodziny Src (w domenie E).

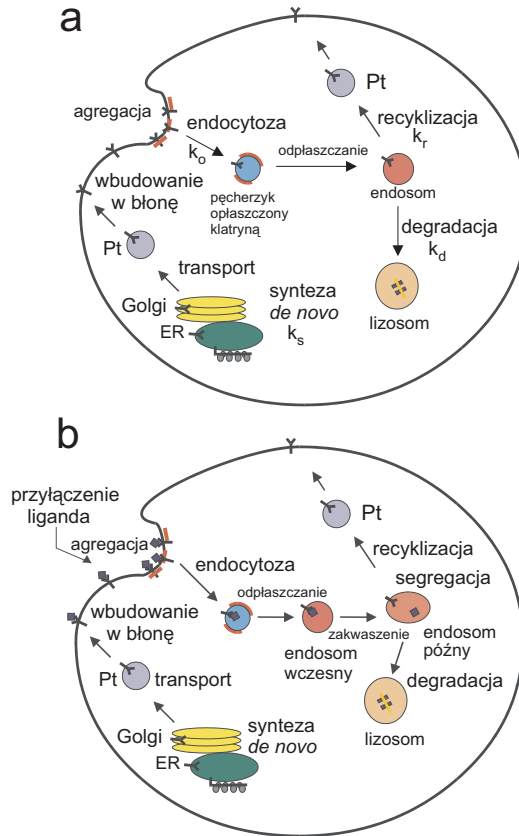
Ogólnie rzecz biorąc, aktywacja transkrypcji zachodzi przy współdziałaniu wielu czynników transkrypcyjnych i koaktywatorów transkrypcji. Sam aparat transkrypcyjny jest bardzo skomplikowany i oprócz ww. czynników i polimerazy II zawiera także olbrzymi (o masie cząsteczkowej rzędu megadaltonów) tzw. kompleks mediatora. Pomijając udział tego ostatniego, inicjacja transkrypcji wymaga utworzenia kompleksu preinicjującego, a sam proces regulowany jest przez grupę czynników transkrypcyjnych, oddziałujących z sekwencjami (elementami) DNA, usytuowanymi w obrębie promotorów i/lub enhancerów (wzmacniaczy) genów. Mechanizm aktywacji transkrypcji przy udziale receptorów wewnątrzkomórkowych jest procesem kilkustopniowym. Po związaniu liganda następuje asocjacja kompleksu ligand–receptor z DNA i z koaktywatorem transkrypcji (CoA) oraz z jednym lub kilkoma białkami o aktywności acetylotransferazy histonów (HAT). Pierwszymi opisanymi koaktywatorami były białka p160 (SRC1, TIF2, TRAM1) o słabej aktywności HAT, ale mające zdolność wiązania cząsteczek integrujących sygnał (CBP/p300, PCAF) o aktywności HAT. Zaktywowane transferazy histonów wspólnie z ATP-zależnymi czynnikami remodelacji chromatyny (np. SWI/SNF) powodują lokalne rozluźnienie chromatyny i utworzenie wspólnie z polimerazą RNA II (RNAPII) i tzw. podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi (TFII) kompleksu preinicjującego. Kompleks ten stabilizuje strukturę aparatu transkrypcyjnego i umożliwia inicjację transkrypcji. Inicjacja transkrypcji przez RNAPII (Rys. 2.3c) wymaga zsynchronizowanego działania przynajmniej sześciu podstawowych czynników transkrypcyjnych (BTF) z rodziny TFII (A, B, D, E, F i H). Mechanizm współdziałania między tymi czynnikami i receptorami jądrowymi jest niejasny, ale przynajmniej cztery różne polipeptydy, wchodzące w skład rodziny czynników TFII, są aktywowane bezpośrednio przez receptory wewnątrzkomórkowe (receptory hormonów steroidowych). Trzy z nich są podjednostkami kompleksu czynnika TFIID, zbudowanego z białka wiążącego „TATA box” (TBP) i co najmniej ośmiu ściśle z nim zasocjowanych peptydów (TAFs, ang. *transcriptional activation factors*). Czwartym polipeptydem jest czynnik TFIIB. Mimo że wiele faktów wyjaśniających proces aktywacji transkrypcji zostało już opisanych, dokładny mechanizm działania receptorów wewnątrzkomórkowych nie jest jeszcze do końca poznany.

2.2. Receptory błonowe

Receptory błonowe są to integralne białka błony komórkowej umożliwiające przeniesienie sygnału zewnątrzkomórkowego na wewnątrzkomórkowe, kluczowe układy enzymatyczne określane często mianem układów efektorowych. We wszystkich receptorach tego typu wyróżnia się części: zewnątrzkomórkową (akceptorową), transbłonową i wewnątrzkomórkową (efektorową). Część akceptorowa wiąże swoiście i odwracalnie ligand. Część transbłonowa (kilkanaście do dwudziestukilku aminokwasów) zakotwicza receptor w błonie komórkowej. Część efektorowa ma zdolność do generowania i amplifikacji (wzmocnienia) sygnału wewnątrz komórki. Na podstawie liczby i charakteru domen transbłonowych wyróżnia się trzy klasy receptorów błonowych. Klasę I stanowią receptory zbudowane z kilku podjednostek peptydowych otaczających kanał jonowy, z których każda wielokrotnie przebija błonę komórkową (receptory jonotropowe). Na klasę II składają się receptory zbudowane z jednego łańcucha peptydowego, penetrującego kilkakrotnie błonę komórkową, której typowym przykładem są receptory współpracujące z białkami G (receptory GPCR), siedmiokrotnie penetrujące błonę. Klasę III stanowią receptory jednokrotnie penetrujące błonę komórkową. Te ostatnie mogą mieć strukturę monomeryczną (receptory większości czynników wzrostowych) lub oligomeryczną (receptory insuliny i większości cytokin). Receptory klasy III mają w części efektorowej sekwencję aminokwasową określonego enzymu (receptory o aktywności enzymatycznej), asocjują z białkami o aktywności enzymatycznej (kinazy tyrozynowe niereceptorowe) albo zawierają tzw. domenę śmierci. Taki podział receptorów ze względu na ich strukturę chemiczną jest do zaakceptowania, ale nie jest propozycją najlepszą, m.in. dlatego, że klasa III obejmuje receptory o bardzo zróżnicowanych mechanizmach odpowiedzi komórkowej.

Siłę wiązania liganda przez dany receptor (powinowactwo liganda do receptora) charakteryzuje stała wiązania $K_d = [L][R] / [LR]$ (lub stała powinowactwa $K_a = 1/K_d$), gdzie $[L]$ – stężenie liganda, $[R]$ – stężenie receptora, $[LR]$ – stężenie kompleksu ligand–receptor. Powinowactwo wiązania swoistych ligandów przez receptory błonowe jest regulowane wewnątrzkomórkowo, zazwyczaj przez kowalencyjną modyfikację efektorowej części receptora (np. przez fosforylację określonych reszt aminokwasowych). Proces obniżania powinowactwa receptor–ligand określany jest mianem odczulenienia (ang. *desensitization*), a proces odzyskiwania zdolności do pełnej odpowiedzi receptorowej terminem ponownego uczulania receptora (ang. *resensitization*). Liczbę receptorów na powierzchni komórki określa stan równowagi między liczbą receptorów wbudowywanych w błonę plazmatyczną (syntetyzowanych *de novo* i podlegających recyklizacji) a liczbą receptorów ulegających endocytozie (Rys. 2.4a).

Endocytoza odgrywa kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych, takich jak: prezentacja antygenów, pobieranie składników odżywczych, wnikanie patogenów, transmisja synaptyczna oraz regulacja poziomu receptorów błonowych. Mechanizmy procesu endocytozy są różne i zależne przede wszystkim od rodzaju substancji ulegającej endocytozie. Podstawową rolę w tym procesie odgrywa rodzaj tworzonych pęcherzyków endocytarnych i ich przeznaczenie. Pierwszym etapem endocytozy jest tworzenie opłaszczonych wakuoli, przebiegający z udziałem swoistych kompleksów białkowych. Pęcherzyki te pośredniczą w transporcie



Rys. 2.4. Schemat syntezy, endocytozy i recykulacji receptorów transbłonowych w komórkach spoczynkowych (a) i aktywowanych wiązaniem liganda (b). Pt – pęcherzyk transportujący, ER – retikulum endoplazmatyczne, k – stałe szybkości odpowiednich procesów

pomiędzy wydzielonymi przez błony kompartmentami komórki. „Płaszcz” służy do deformowania wyjściowej błony i tworzenia opłaszczonych pęcherzyków, a także może uczestniczyć w selekcji ich zawartości.

Receptory błonowe są syntetyzowane na rybosomach związanych z retikulum endoplazmatycznym (ER) i wbudowywane w jego błony. Kolejno stają się składnikami błon aparatu Golgiego (G) i pęcherzyków transportujących (Pt), których błony ulegają „wycinaniu” i fuzji z błoną komórkową. W ten sposób wewnątrzkomórkowe części białek transbłonowych retikulum endoplazmatycznego (aparatu Golgiego i pęcherzyków transportujących) stają się zewnątrzkomórkowymi (akceptorowymi) fragmentami białek integralnych (m.in. receptorów) błony komórkowej.

Endocytoza receptorowo-zależna od przyłączenia ligandów spełnia wiele różnorodnych funkcji. Między innymi jest odpowiedzialna za transport transbłonowy metabolitów i jonów (np. receptory LDL i transferyny), pośredniczy w usuwaniu określonych białek z krążenia (receptory asialoglikoprotein – ASGP), uczestniczy w procesie

immunomodulacji (np. receptory immunoglobulin), pośredniczy w przenoszeniu wirusów i toksyn bakteryjnych oraz w procesach modulacji (a w przypadku niektórych hormonów przenoszenia) odpowiedzi hormonalnej komórek (receptory hormonów).

W komórkach spoczynkowych (niestymulowanych) zachodzi stale względnie powolny proces endocytozy receptorów. Receptory typu „cargo” (LDLR, TransfrR, ASGPR) są ciągle zagęszczane w opłaszczonych zagłębieniach i efektywnie internalizowane, niezależnie od wiązania liganda. Zawierają one w ich domenie cytoplazmatycznej tzw. motyw internalizacji, odpowiedzialny za proces endocytozy. Receptory hormonów po związaniu ligandów przyspieszają gwałtownie szybkość swojej endocytozy. Aktywowane receptory błonowe mogą być internalizowane w różny sposób: z udziałem klatryny, z udziałem kaweoliny, niezależnie od klatryny i kaweoliny bądź na drodze makropinocytozy. Nie ulega wątpliwości, że w przypadku endocytozy zależnej od receptorów najważniejsze są dwa mechanizmy: z udziałem klatryny lub z udziałem kaweoliny. Proces ten zachodzi w czasie od kilku do kilkunastu minut po przyłączeniu liganda do receptora, aczkolwiek mechanizm molekularny jest do dzisiaj niejasny. Proces endocytozy poprzedza tworzenie niewielkich (kilka–kilkanaście cząsteczek) skupisk receptorów (mikroagregacja), a następnie powstawanie dużych skupisk receptorów (makroagregacja) liczących nawet kilkaset cząsteczek. W miejscach tych następuje wpuklenie błony komórkowej i powstają pęcherzyki endocytarne, o różnym składzie lipidowym i białkowym.

Tworzenie endosomów opłaszczonych klatryną jest regulowane przez białka budujące kompleks AP-2 oraz dynaminy. Podstawowymi elementami kompleksu klatrynowego są klatryna i białka adaptorowe zasocjowane z klatryną, określane jako AP (ang. *assembly protein*). Dotychczas scharakteryzowano trzy tego typu białka: AP-1 (występujące w błonach aparatu Golgiego), AP-2 (zasocjowane z błoną plazmatyczną) i AP-180 (swoiste dla tkanek mózgowych). Wysokocząsteczkowy, heterotetrameryczny kompleks białek AP-2 z jednej strony wiąże klatrynę, a z drugiej cytoplazmatyczną domenę receptora i uczestniczy w pakowaniu kompleksów ligand–receptor do endosomów opłaszczonych klatryną. Dynaminy są rodziną dużych GTP-az (100 kDa), asocjujących z białkami AP-2 i ułatwiających tworzenie błon pęcherzyków endocytarnych. Płaszcz klatrynowy jest usuwany przy udziale enzymów należących do rodziny białek Hsp70 o aktywności ATP-azy. Po enzymatycznym usunięciu (rozobraaniu) płaszcz klatrynowego tworzą się duże (wtórne) endosomy, zazwyczaj w wyniku fuzji receptosomu z endosomem. W przypadku endocytozy samych receptorów większość z nich ulega recyrkulacji i ponownemu wbudowaniu w błonę komórkową, a część po fuzji endosomu z lizosomem ulega degradacji enzymatycznej (Rys. 2.4a). W przypadku endocytozy kompleksów ligand–receptor zachodzi dodatkowo proces sortowania (oddzielenia ligandów od receptorów). Ligandy ulegają degradacji enzymatycznej, a receptory procesom opisanym wyżej (Rys. 2.4b).

W wypadku receptorów o aktywności enzymatycznej przypuszcza się, że te białka transbłonowe zlokalizowane są w specjalnych miejscach błony plazmatycznej (mikrodomenach błonowych), określanymi jako tratwy lipidowe (ang. *lipid rafts*). Miejsca te charakteryzuje wysoki udział gangliozydów, sfingomielin, cholesterolu i specyficznych białek (np. kaweoliny). Kaweole mają charakterystyczny skład białkowy, całkowicie pozbawiony typowych białek powierzchniowych. Obecność tego

typu tratw lipidowych i zasocjowanych z nimi białek została potwierdzona wieloma różnymi metodami. Natomiast dyskutowane są nadal sposób ich powstawania, rozmiary, stabilność oraz skład lipidowy i białkowy.

Endocytoza była dotąd traktowana jako mechanizm kończący przekaz sygnału zewnątrzkomórkowego. Nowe dane wskazują, że sygnalizacja wewnątrzkomórkowa inicjowana aktywacją receptora błonowego może być bardziej skomplikowana, a specjalną rolę mogą odgrywać endosomy i związane z nimi białka sygnalizacyjne. Istnieją hipotezy, że proces endocytozy receptorów jest nie tylko sposobem na regulację liczby receptorów błonowych, lecz także współuczestniczy w przekazie sygnału. Koncepcje te oparte są głównie na założeniu, że internalizowane kompleksy ligand–receptor nadal przesyłają określony sygnał biologiczny. Aczkolwiek sygnalizacja endosomalna nie jest powszechnym zjawiskiem, nawet w obrębie jednego typu receptorów (głównie badano receptory o aktywności kinazy tyrozynowej). Co więcej, receptory tej samej rodziny ligandów, np. receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych, mogą być internalizowane w różny sposób. Spośród tej rodziny receptorów (ErbB1–ErbB4) tylko ErbB1 ulega szybkiej, stymulowanej ligandem internalizacji, chociaż wszystkie cztery charakteryzują się podobną szybkością endocytozy niezależnej od związania liganda (1–2% ogólnej liczby receptorów na minutę). Wydaje się prawdopodobne, że zjawiskiem decydującym o mechanizmie internalizacji receptorów ErbB jest proces ich heterooligomeryzacji (zob. rozdział 2.2.10). Przemawia za tym także zmiana intensywności sygnału w niektórych procesach patologicznych. Przykładowo, obserwowana w wielu nowotworach ludzkich hiperekspresja receptora ErbB2 hamowała enzymatyczną degradację receptora ErbB1 i jego wzmoczoną recykлизację, co powodowało нефизjologiczne wzmocnienie sygnału indukowanego ligandami EGF-podobnymi. W ogóle losy kompleksów ligand–ErbB w endosomach są bardzo zróżnicowane. Niektóre ligandy, jak TGF α , szybko oddysocjują od receptorów i są degradowane enzymatycznie w obrębie endosomów, inne, jak EGF, pozostają zasocjowane z receptorem i są odporne na proteolizę. Jeszcze większe różnice w mechanizmie generowania sygnału wykazano pomiędzy przedstawicielami różnych rodzin receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych. W przypadku receptorów neurotrofin stwierdzono, że endosomy uczestniczą w stabilizacji i wzmocnieniu sygnału (być może uczestniczą w przenoszeniu kompleksów ligand–receptor wzdłuż ciała komórek nerwowych). Natomiast w przypadku insuliny endosomy wygaszają szybko (≤ 1 minuty) sygnał generowany przez receptor poprzez degradację liganda realizowaną przez kwaśną insulinazę endosomalną.

Zmiana liczby receptorów błonowych w określonej jednostce czasu $[(dR_s/dt) = k_r \times R_e - k_e \times R_s + k_s]$ zależna jest od szybkości syntezy nowych receptorów (określanych stałą k_s), szybkości endocytozy receptorów błonowych ($k_e \times R_s$) oraz wydajności procesu recykliczacji receptorów ($k_r \times R_e$), gdzie R_e – liczba receptorów zlokalizowanych w endosomach, R_s – liczba receptorów na powierzchni komórki, a k_r i k_e odpowiednio: stałe szybkości recyrkulacji i endocytozy. Szybkość internalizacji receptorów (różnica między szybkością endocytozy a recyrkulacji) jest różna dla różnych receptorów (nawet tego samego typu) i zależna od rodzaju komórek. Przykładowo, stałe szybkości k_e i k_r receptora muskarynowego M4 w komórkach NG108–15 wynoszą odpowiednio 0,13 i 0,12 min^{-1} , a receptora EGF w komórkach B82 odpowiednio 0,16 i 0,06 min^{-1} .

Obniżenie liczby receptorów błonowych wynikające z różnicy między szybkością endocytozy a szybkością recykulacji jest miarą internalizacji receptorów. Obniżenie fizjologicznego poziomu receptorów błonowych, wynikające z utrzymującego się przez długi czas nadmiaru ligandów, określane jest mianem *down regulation* i jest obroną komórki przed zbyt intensywną, niefizjologiczną odpowiedzią na działanie danego liganda. Mechanizm tego procesu nie jest jeszcze dokładnie poznany, ale przypuszcza się, że podstawowe znaczenie ma ubikwitynacja internalizowanych kompleksów ligand–receptor i ich degradacja proteolityczna.

Nie ma dostatecznej liczby informacji do stwierdzenia, że wszystkie typy receptorów hormonów są internalizowane w sposób opisany powyżej.

2.2.1. Receptory jonotropowe

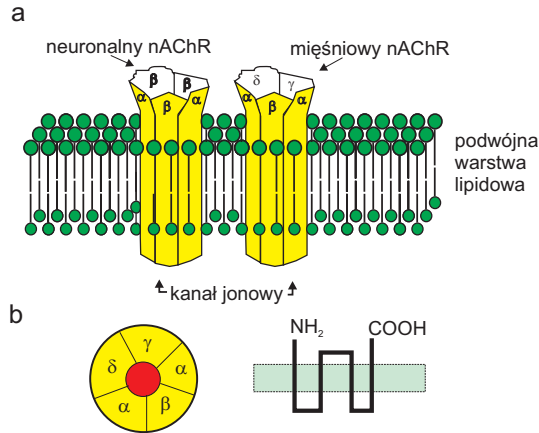
Organizm dorosłego człowieka zbudowany jest z około 10^{14} komórek. Błony zewnętrzkomórkowe wyodrębniają jedne komórki od drugich i komórki od środowiska zewnętrznego, a błony wewnętrzkomórkowe ograniczają poszczególne organelle, pełniące określone funkcje biologiczne (retikulum endoplazmatyczne, jądro, aparat Golgiego, mitochondria itd.). Dwuwarstwa lipidowa błon komórkowych jest praktycznie nieprzepuszczalna dla jonów i cząsteczek polarnych. Przenoszenie tych substancji przez błony umożliwiają trzy rodzaje struktur białkowych wbudowanych w warstwę lipidową: transportery błonowe, kanały i pompy. Kanały zbudowane z białek integralnych błon są jedną z najstarszych i najbardziej zróżnicowanych struktur, umożliwiających komunikację pomiędzy komórkami a środowiskiem zewnętrznym, pomiędzy komórkami i pomiędzy cytozolem a organellami wewnętrzkomórkowymi. Przedmiotem niniejszego opracowania są wyłącznie kanały jonowe zlokalizowane w błonie komórkowej i tylko kanały jonowe regulowane ligandami, pomijamy zaś kanały bramkowane napięciem.

Kanały jonowe są strukturami białkowymi przebijającymi podwójną warstwę lipidową błon komórkowych. Około 30% energii wytwarzanej przez komórkę jest zużywane do utrzymywania różnicy stężeń jonów na granicy błony komórkowej. Kanały jonowe są strukturami bardzo wydajnymi (pojedyncze otwarcie kanału pozwala na przepływ milionów jonów na sekundę) i dlatego ich liczba w błonie cytoplazmatycznej nie przekracza zazwyczaj kilku tysięcy na komórkę (wyjątkowo gęsto występują nikotynowe kanały acetylocholinowe ryb elektrycznych). Kanały jonowe są klasyfikowane w zależności od rodzaju jonów, które przepuszczają (sodowe, potasowe, wapniowe, chlorkowe), chociaż nie zawsze są absolutnie selektywne. Pomijając kanały aktywowane mechanicznie lub termicznie, otwarcie bądź zamknięcie kanałów jonowych może być regulowane: zewnątrzkomórkowym ligandem (bramkowane ligandem), zmianą potencjału transbłonowego (bramkowane napięciem) oraz wewnątrzkomórkowo. Kanały jonowe bramkowane ligandami są to receptory charakteryzujące się bardzo szybko, liczoną w milisekundach odpowiedzią układu efektorowego. Do receptorów tego typu należą różniące się budową chemiczną receptory aktywowane zewnątrzkomórkowo (jonotropowe), jak i wewnątrzkomórkowo (metabotropowe). Te ostatnie to m.in.: fotoreceptory, receptory węchowe, receptor ATP, receptor metabotropowy GABA-B itp.

Receptory jonotropowe dzieli się zazwyczaj na dwa typy w zależności od ich aktywności biologicznej. Do pierwszego typu zalicza się receptory pobudzające kanał: nikotynowy receptor acetylocholinowy (nAChR) i receptor serotoninowy (5-HT₃). Receptory te regulują przepływ kationów jedno- i dwuwartościowych, czego wynikiem jest depolaryzacja błony komórkowej. Do drugiego – receptory hamujące kanał: receptory GABA-A, glicynowy i glutaminianowy (GluR), umożliwiające regulację przepływu anionów. Ponieważ jony chlorkowe stanowią największą pulę anionów w komórkach zwierzęcych, receptory te nazywane są często kanałami chlorkowymi, chociaż mogą przepuszczać także inne aniony. Kanały chlorkowe występują powszechnie, praktycznie we wszystkich komórkach i regulują tak istotne procesy, jak: zmiana objętości komórki, zmiana pH wewnątrzkomórkowych pęcherzyków i organelli (endosomów, lizosomów i pęcherzyków synaptycznych) oraz stabilizacja potencjału membranowego i epitelialny transport NaCl.

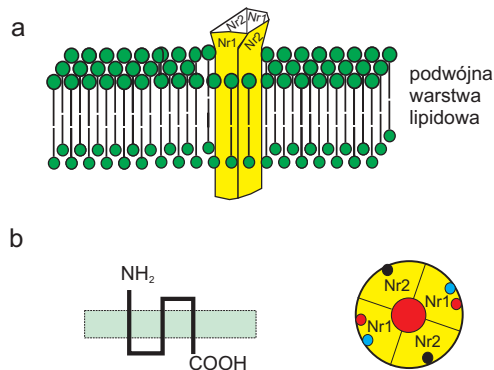
Receptory jonotropowe aktywowane zewnątrzkomórkowo zbudowane są z kilku (najczęściej pięciu) łańcuchów polipeptydowych – podjednostek, z których każda posiada cztery domeny transbłonowe. Najlepiej poznanym białkiem tej grupy jest nikotynowy receptor acetylocholinowy (nAChR), występujący w błonach postsynaptycznych połączeń nerwowych. Podjednostki tego receptora tworzą strukturę pentameryczną, która otacza kanał jonowy, regulujący przepływ jonów Na⁺ i K⁺. N-końcowe fragmenty podjednostek receptora wystają ponad warstwę błony, umożliwiając przyłączenie liganda. Wnętrze kanału jest wyścielone przez pięć odcinków α -helikanych, pochodzących z różnych podjednostek. Podstawowe znaczenie dla funkcjonowania receptora ma usytuowanie reszt aminokwasowych tych α -helis. W stanie zamkniętym małe aminokwasy polarne lub obojętne (glicyna, seryna) ustawione są naprzeciw dużych reszt niepolarnych (leucyna, fenyloalanina), uszczelniając kanał. Trzy odcinki helikalne w każdej z N-końcowych części dwóch podjednostek α tworzą miejsce wiązania acetylocholinu. Wszystkie podjednostki budują cylindryczny kompleks o długości około 11 nm, tworząc w błonie komórkowej kanał o średnicy 1–2 nm, węższy w środkowej części, a szerszy przy ujściach kanału, zarówno do cytoplazmy, jak i do szczeliny synaptycznej. Związanie dwóch cząsteczek acetylocholinu z podjednostkami α powoduje zmiany strukturalne receptora (prawdopodobnie zmiany nachylenia helis), powodujące zastąpienie dużych reszt aminokwasowych w „zaworze” małymi i otwarcie kanału dla niewielkich kationów. Selektywność jonową zapewniają ujemnie naładowane reszty aminokwasów, uniemożliwiające przechodzenie przez kanał anionów. Procesy wiązania liganda i przejścia ze stanu zamkniętego w otwarty są bardzo szybkie ($\leq 130 \mu\text{s}$), a w warunkach fizjologicznych kanał zamyka się po około 1 ms, wskutek rozkładu acetylocholinu przez esterazę acetylocholinową. Otwarcie kanału umożliwia wpływ jonów potasu na zewnątrz komórki i napływ jonów sodowych do wnętrza komórki, a to z kolei powoduje depolaryzację błony postsynaptycznej i powstanie prądu czynnościowego.

Receptory jonotropowe różnych tkanek mogą różnić się składem podjednostkowym. Przykładowo, nAChR mięśni szkieletowych zbudowany jest z czterech różnych podjednostek: 2 α , β , γ , δ , a nAChR neuronalny z dwóch rodzajów podjednostek: 2 α i 3 β (Rys. 2.5).



Rys. 2.5. Receptory jonotropowe acetylocholiny. Układ podjednostek białkowych tworzących kanał jonowy receptora komórek mięśni szkieletowych i nerwowych (a), usytuowanie łańcuchów białkowych poszczególnych podjednostek receptora mięśniowego względem błony komórkowej (b)

Przykładem receptora jonotropowego o małej selektywności jest receptor NMDA (ang. *N-methyl D-aspartate*). Jego nazwa pochodzi od agonisty kwasu glutaminowego – NMDA. Aktywacja tego receptora prowadzi do otwarcia kanału jonowego, który pozwala na napływ do wnętrza komórki jonów Na⁺ i niewielkich ilości jonów Ca²⁺ oraz wypływ jonów K⁺. Przepływ jonów Ca²⁺ odgrywa podstawową rolę w plastyczności synaptycznej, mechanizmie komórkowym związanym z procesami uczenia i pamięci. Charakterystyczną cechą receptora NMDA jest fakt, że może on być regulowany zarówno ligandem, jak i napięciem. Receptor ten jest heteromerem zbudowanym z dwóch podjednostek NR1 i dwóch podjednostek NR2 (Rys. 2.6),

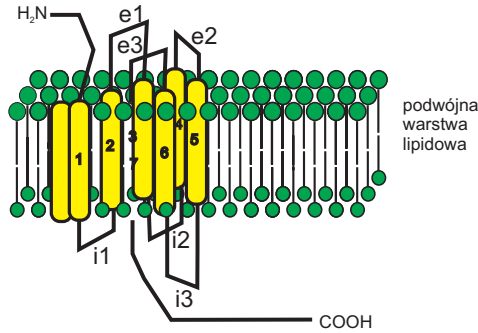


Rys. 2.6. Receptor NMDA. Układ podjednostek białkowych tworzących kanał jonowy (a), usytuowanie poszczególnych podjednostek w błonie oraz domen wiążących: ● – agonistę, ● – koagonistę i ● – regulacji allosterycznej (b)

występujących w różnych izoformach (osiem izoform NR1 i cztery NR2). Podjednostki NR1 występują powszechnie, a podjednostki NR2 są komórkowo swoiste. Zewnątrzkomórkowe domeny zawierają dwie struktury globularne: domenę wiążącą ligand i domenę modulacji allosterycznej. NR2 wiąże glutaminian (lub asparaginian), a NR1 glicynę (lub D-serynę) jako koagonistę. Domena transbłonowa jest selektywnym filtrem dla jonów potasu, odpowiedzialnym także za przepuszczalność jonów wapnia i zależny od napięcia blok magnezowy. Części wewnątrzkomórkowe obu podjednostek przekazują sygnał na białka adaptorowe i dokujące, a ich aktywność może być modyfikowana na drodze odwracalnej fosforylacji. Kanały jonowe aktywowane wewnątrzkomórkowo (metabotropowe) są integralną częścią odpowiedzi komórkowej na działanie ligandów zewnątrzkomórkowych, ale ich aktywacja odbywa się za pośrednictwem związków, „uruchamianych” działaniem innego typu receptorów błonowych (np. związanych z białkami G).

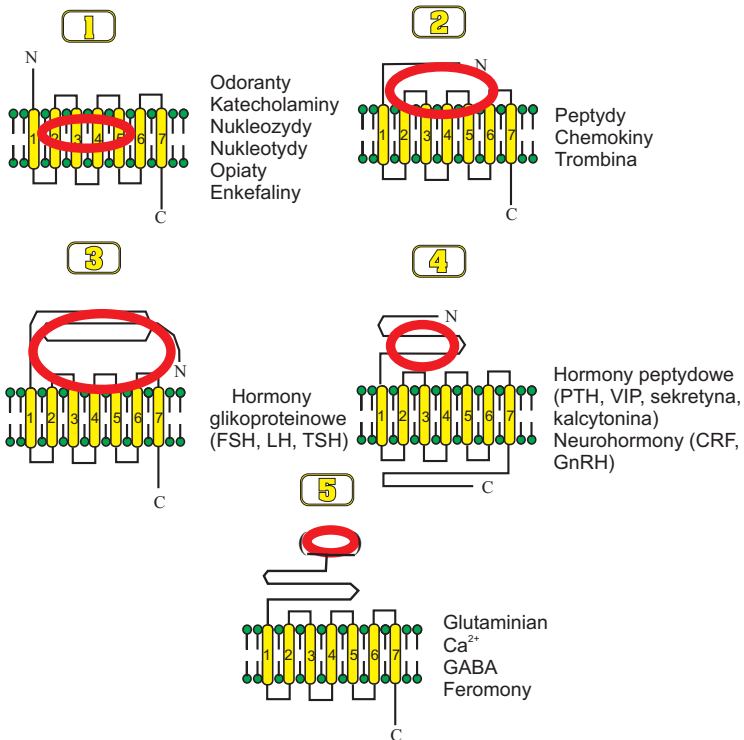
2.2.2. Receptory związane z białkami G

Receptory związane (sprzężone) z białkami G (GPCR, ang. *G protein-coupled receptor*) są jednołańcuchowymi białkami transbłonowymi przenoszącymi sygnał zewnątrzkomórkowy na białka G. Charakterystyczną cechą tych receptorów jest obecność siedmiu hydrofobowych domen transbłonowych, zbudowanych z 22–28 reszt aminokwasowych (stąd czasami używana nazwa receptory R7G). Domeny te połączone są fragmentami hydrofilowymi (pętlami), wystającymi na zewnątrz (e1–e3) lub do wnętrza (i1–i3) komórki (Rys. 2.7). W wiązaniu ligandów uczestniczą: zewnątrzkomórkowy N-koniec łańcucha peptydowego oraz pętla zewnątrzkomórkowe i obszary transbłonowe, natomiast za interakcję z białkami G odpowiedzialne są pętłe cytoplazmatyczne. Poznano dotychczas sekwencję ponad 300 receptorów R7G, różniących się budową ich części N- i C-końcowych, a całkowitą liczbę tego typu receptorów szacuje się na około 1000. Receptory GPCRs stanowią największą rodzinę białek sygnałowych, kodowanych przez 3–5% genomu, co u człowieka stanowi > 800 genów. Rozpowszechniony, lecz nie przez wszystkich akceptowany jest podział na trzy klasy receptorów GPCR: A, B i C. Klasa A stanowi największą grupę receptorów GPCR, nazywaną często receptorami rodopsynopodobnymi. W wiązaniu uczestniczą głównie pętle zewnątrzkomórkowe receptora, przy udziale (zwłaszcza w przypadku hormonów glikoproteinowych) N-końcowej części receptora. Wiążą bardzo zróżnicowane strukturalnie i funkcjonalnie ligandy, takie jak rodopsyna, hormony α - i β -adrenergiczne, dopomina, odoranty, hormony glikoproteinowe (FSH, LH). Receptory klasy B to stosunkowo mała grupa białek transbłonowych o relatywnie dużej części zewnątrzkomórkowej, wiążącej ligand. Typowymi ligandami są czynnik uwalniający kortykotropinę (kortykoliberyna) i parathormon. Klasa C to receptory funkcjonujące w formie dimerów. Miejsce wiązania ligandów znajduje się w N-końcowej części łańcucha białkowego, w tzw. domenie „Wenus flaytrap”. Białka te to m.in. homodimeryczne receptory (metabotropowe) glutaminianu, heterodimeryczne receptory GABA-B, receptory Ca^{2+} sensytywne, receptory smakowe i inne.



Rys. 2.7. Usytuowanie receptora typu R7G (GPCR) w błonie komórkowej

W niniejszej pracy wyróżniono pięć typów receptorów GPCR kręgowców (Rys. 2.8), różniących się strukturą części akceptorowej i mechanizmem wiązania ligandów. Typ 1 reprezentuje receptory wiążące retinal, katecholaminy, adenozyne, ATP, opiaty, enkefaliny, głównie poprzez transbłonowe domeny α -helikalne. Typ 2 wiąże krótkie peptydy, chemokiny i trombinę w kooperacji domeny N-końcowej z pętlami zewnątrzkomórkowymi (e1–e3). Receptory typu 3 wiążą duże hormony



Rys. 2.8. Typy receptorów GPCR różniące się strukturą i swoistością wiązania ligandów

glikoproteinowe (LH, FSH, TSH), wykorzystując zarówno duży, zewnątrzkomórkowy fragment N-końcowy, jak i hydrofobową, błonową część receptora. Receptory R7G typu 4 charakteryzują się rozbudowaną częścią zewnątrzkomórkową i wewnątrzkomórkową. Receptory te wiążą różne ligandy, m.in. szereg hormonów dokrewnych i neurohormonów. Rodzina receptorów typu 5, o bardzo rozbudowanej części zewnątrzkomórkowej, obejmuje metabotropowe receptory glutaminianu (mGluRs), receptor aktywowany zewnątrzkomórkowymi jonami Ca^{2+} i receptory feromonów działających przez białka Go (VRs i GoVN). Mimo szybkiego postępu badań większość poznanych dotychczas receptorów R7G to receptory sieroce.

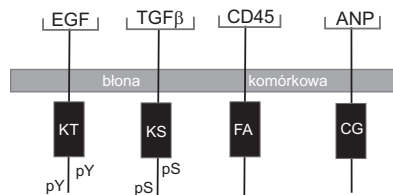
Różnorodność strukturalna receptorów GPCR wskazuje na zróżnicowany sposób wiązania liganda (odmienna struktura części zewnątrzkomórkowej) i podobny, ale nie identyczny, mechanizm aktywacji receptora (różne zaangażowanie domen transbłonowych i wewnątrzkomórkowych w aktywację białek G). Ogólnie przyjmuje się, że związanie liganda z akceptorową częścią receptora powoduje zmiany konformacyjne w jego części korowej (transbłonowej), a w konsekwencji w pętlach wewnątrzkomórkowych (i), co prowadzi do odsłonięcia miejsc wiążących białka G.

Receptory GPCRs odpowiadają na różnorodne sygnały zewnątrzkomórkowe, takie jak: światło, odoranty, hormony, neurotransmitery, zewnątrz- i wewnątrzkomórkowy Ca^{2+} i wiele innych. Chociaż tego typu receptory były i są intensywnie badane, niektóre z ich właściwości pozostają nadal dyskusyjne. Jednym z pytań, na które nie ma wyczerpującej (jednoznacznej) odpowiedzi, jest: czy GPCRs funkcjonują w formie monomerów, dimerów czy większych oligomerów?

Receptory GPCR mogą także oddziaływać z polipeptydami innymi niż białka G. Przykładem takich interakcji jest wiązanie arestyn do receptorów fosforylowanych przez kinazy regulujące aktywność receptorów GPCRs (GRKs, ang. *GPCR regulatory kinases*). Także białka mające domeny PDZ (np. białka antyportu Na^+/H^+ oraz białka Homera/Vesla) wiążą się bezpośrednio z receptorami GPCR.

2.2.3. Receptory o aktywności enzymatycznej

Są to receptory błonowe, których część wewnątrzkomórkowa wykazuje aktywność enzymatyczną, stymulowaną przyłączeniem liganda do części zewnątrzkomórkowej. Znane są receptory o aktywności: kinazy białkowej tyrozynowej (receptory



Rys. 2.9. Rodzaje receptorów o aktywności enzymatycznej. KT – kinaza tyrozynowa, KS – kinaza serynowo-treoninowa, FA – fosfataza białkowa, CG – cyklaza guanylanowa, pY – fosfotyrozyna, pS – fosfoseryna

czynników wzrostowych i insuliny), kinazy białkowej serynowo-treoninowej (receptory superrodziny transformującego czynnika wzrostowego typu β), fosfatazy białkowej (receptor antygeny CD45) i cyklazy guanylanowej (receptory peptydów sodopędnych) (Rys. 2.9).

a. Receptory o aktywności kinazy tyrozynowej

Tyrozynowo swoiste kinazy białkowe (KT) to enzymy selektywnie fosforylujące tyrozynę w cząsteczkach białek. Poznano ponad 90 genów kodujących ludzkie kinazy tyrozynowe, z których 58 koduje KT receptorowe (20 podrodzin) i 32 niereceptorowe (cytoplazmatyczne) KT (10 podrodzin). Fosforylacja tyrozyny odgrywa istotną rolę w bardzo wielu procesach biologicznych, takich jak: regulacja wzrostu (także patologicznego), regulacja różnicowania, kontrola cyklu komórkowego, regulacja kształtu komórek i adhezji komórkowej, sygnalizacja transbłonowa i wewnątrzkomórkowa, kontrola wielu szlaków metabolicznych, regulacja transkrypcji, regulacja działania kanałów jonowych oraz receptorów niektórych neurotransmiterów.

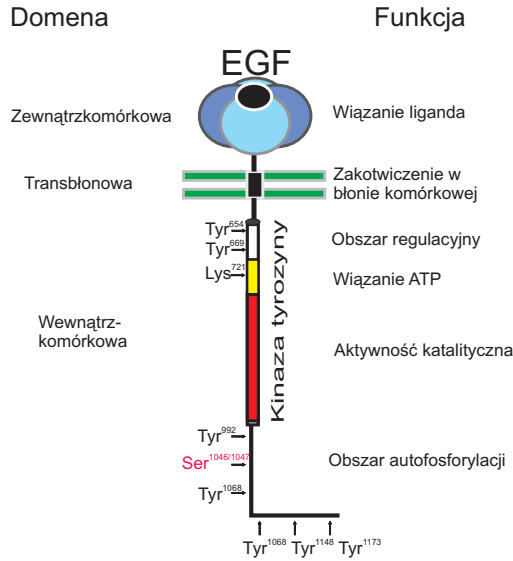
Wśród najlepiej poznanych receptorów o aktywności tyrozynowo swoistej kinazy białkowej wyróżnia się wiele klas, różniących się składem podjednostkowym i budową części akceptorowej, rozpoznającą swoiście ligand. Natomiast budowa części efektorowej tych receptorów jest podobna, wszystkie zawierają sekwencję kinazy tyrozynowej. Konserwatywne ewolucyjnie sekwencje aminokwasowe (około 250 reszt aminokwasowych), ulokowane w efektorowej (wewnątrzkomórkowej) części receptorów, mające aktywność tyrozynowo swoistej kinazy białkowej, występują we wszystkich wielokomórkowych organizmach eukariotycznych. Jak już wspomniano, wyróżnia się 20 podrodzin KT receptorowych, z których najliczniejszą grupę stanowią receptory czynników wzrostowych (PDGF, FGF, IGF, EGF, NGF, HGF, VEGF, M-CSF) i insuliny. Pozostałe to receptory: efryn (EPH), angiopoety (TIE), białka Ga6 (AXL) oraz receptory sieroco (Tabela 4). W części zewnątrzkomórkowej tych receptorów wyróżnia się domeny charakterystyczne także dla innych białek mozaikowych, takich jak: regiony immunoglobulinopodobne, regiony bogate w cysteinę i inne. Mechanizm ich działania wynika ze specyficznej budowy tych białek. Zależność między strukturą a funkcją określonych części receptorów tego typu, na przykładzie receptora EGF, przedstawia rysunek 2.10. Receptor ten jest białkiem transbłonowym o m.cz. 170 kDa, mającym aktywność kinazy tyrozynowej. N-końcowa część zewnątrzkomórkowa (621 reszt aminokwasowych) zawiera domeny wiążące ligand i sekwencje odpowiedzialne za dimeryzację kompleksów ligand–receptor. Sekwencja 22 aminokwasów 622–644 reprezentuje pojedynczy region transbłonowy (przebijający błonę komórkową i zakotwiczący w niej receptor), a sekwencja 645–1186 część wewnątrzkomórkową, zawierającą region przysłonowy (JM), domenę (KT) kinazy tyrozynowej (reszty 694–937) oraz fragment C-końcowy, tzw. obszar autofosforylacji. Obszar ten zawiera pięć tyrozyn mogących ulegać fosforylacji pod działaniem kinazy tyrozynowej drugiej cząsteczki dimeru receptora. W domenie kinazy tyrozynowej wyróżnia się zazwyczaj sekwencje odpowiedzialne za: modulację aktywności akceptorowej receptora (obszar regulacyjny), wiązanie koenzymu i wiązanie substratu.

Tabela 4. Rodziny kinaz tyrozynowych receptorowych (RTK) człowieka i ich ligandy

Rodziny kinaz tyrozynowych receptorowych *	Ligandy kinaz tyrozynowych receptorowych
ALK (Alk, Lyk)	Receptor sierocy
AXL (Axl, Mer, Tyro3 [Sky])	Gas6
CCK4	Receptor sierocy
DDR (DDR1, DDR2)	Kolageny
EGFR (ErbB1-ErbB4)	EGF, TGF α , AR, HB-EGF, BTC, ER, HRs
EPHR (EphA1-8 i 10, EphB1-4 i 6)	EphA (1-8), EphB (1-6)
FGFR (FGFR1-FGFR4)	FGF (1-23)
IR (IR, IGFIR)	Insulina, IGF (I-II)
LMR	Receptor sierocy
MET (Met, Ron)	HGF, MSP
MuSK	Agryna
NGFR (Trk A-Trk C)	NGF, BDGF, NT-3, NT-4/5
PDGFR (PDGFα, PDGFβ), CSF-1R, KIT, Flt3	PDGF (AA, AB, BB, CC, DD), CSF-1, SCF, FL
RET	GDNF, NRTN, PSPN, ARTN
ROR (Ror1, Ror2)	Receptor sierocy
ROS	Receptor sierocy
RYK (Ryk, Rykps)	Receptor sierocy
TIE (Tie, Tek)	Ang (1-4)
TKU	Receptor sierocy
VEGFR (VEGFR1-VEGFR3)	VEGF (A-E), PIGF

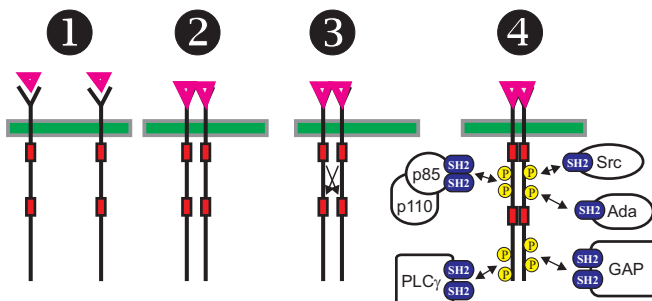
ALK – *anaplastic lymphoma kinase*, Ang – *angiopoetin*, AR – *amphiregulin*, ARTN – *artemin*, AXL – (*greek*) *anexelekto*, BDGF – *brain-derived growth factor*, BTC – *betacellulin*, CCK – *colon cancer kinase*, CSF – *colony stimulating factor*, DD – *discoidin domain*, EGF – *epidermal growth factor*, EPH (Eph) – *ephrin*, ER – *epiregulin*, ErbB – *erythroblastoma B*, FGF – *fibroblast growth factor*, FL – *Flt3 ligand*, Flt – *fetal liver tyrosine kinase*, Gas6 – *growth arrest specific gene 6*, GDNF – *glial cell derived growth factor*, HB-EGF – *heparin binding-EGF*, HGF – *hepatocyte growth factor*, HR – *heuregulin*, I – *insulin*, IGF – *insulin-like growth factor*, LMR – *lemur*, MET – *protoonkogen c-Met*, MSP – *macrophage stimulating protein*, MuSK – *muscle skeletal*, NGF – *nerve growth factor*, NRTN – *neurturin*, NT – *neurotrophin*, PDGF – *platelet-derived growth factor*, PIGF – *placenta growth factor*, PSPN – *persephin*, PTN – *pleiotrophin*, R – *receptor*, RET – *rearranged during transfection*, ROR – *RTK-like orphan receptor*, ROS – *RTK-like oncogene product of the avian sarcoma*, RYK – *related to tyrosine kinase*, SCF – *stem cell factor*, TGF α – *transforming growth factor α* , TIE – *tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domain*, Trk – *tyrosine kinase*, TKU – *tyrosine kinase unique*, VEGF – *vascular endothelial growth factor*.

* pogrubioną czcionką zaznaczono receptory czynników wzrostowych



Rys. 2.10. Struktura receptora EGF i domeny białkowe odpowiedzialne za poszczególne funkcje receptora

W formie nieaktywnej receptory o aktywności KT występują w konformacji uniemożliwiającej przyłączenie substratu do centrum aktywnego. Przyłączenie liganda powoduje dimeryzację kompleksów ligand–receptor umożliwiającą wzajemną, krzyżową fosforylację części wewnątrzkomórkowej receptorów. Zjawisko to, określane mianem autofosforylacji receptorów, modyfikuje kowalencyjnie receptor przez fosforylację cząsteczek tyrozyny usytuowanych w pętli aktywacyjnej oraz tyrozyn położonych w części C-końcowej receptora (tzw. obszarze autofosforylacji).



Rys. 2.11. Aktywacja receptora o aktywności kinazy tyrozynowej i wiązanie substratów zawierających domeny SH2. 1 – wiązanie liganda, 2 – dimeryzacja receptorów, 3 – krzyżowa fosforylacja (autofosforylacja) receptorów, 4 – wiązanie przykładowych substratów z domeną SH2. p85 i p110 – podjednostki kinazy 3-fosfoinozytydów, PCL γ – fosfolipaza C γ , Src – kinaza Src, Ada – białka adaptorowe, GAP – białka stymulujące aktywność GTP-azy

Tak więc autofosforylacja odgrywa podwójną rolę, po pierwsze, zmienia konformację receptora, umożliwiając pełną aktywację kinazy tyrozynowej, a po drugie, kreuje nowe reszty fosfotyrozyny w obszarze autofosforylacji. Reszty fosfotyrozyny mają unikalną zdolność do wiązania specyficznych sekwencji aminokwasowych, domen SH2 i PTH (zob. rozdział 3.1), co pozwala na dołączanie (dokowanie) do receptora innych białek sygnałowych (Rys. 2.11).

W odbiorze sygnału od KT receptorowych pośredniczą białka wewnątrzkomórkowe, które można podzielić na pięć grup. Do pierwszej zalicza się enzymy aktywowane na drodze fosforylacji lub translokacji do błony komórkowej: fosfolipaza C γ , czynniki regulujące aktywność białek Ras (GAP, GEF), większość kinaz tyrozynowych niereceptorowych (np. Src), kinaza 3-fosfoinozytydów (PI3K). Do drugiej – białka adaptorowe (Ada), takie jak: Shc, Grb2, Grb7, Crk, Nck, IRS, a do trzeciej – białka odpowiedzialne za reorganizację cytoskieletu i/lub za oddziaływania międzykomórkowe i zewnątrzkomórkowe (winkulina, talina, tensyna, paksylina, aneksyny, kadherine, koneksyny). Czwartą grupę stanowią białka o różnej funkcji biologicznej, m.in. niektóre czynniki transkrypcyjne. Białka te z kolei aktywują odrębne szlaki metaboliczne, których wypadkową jest biologiczna odpowiedź komórki na działanie EGF. Do ostatniej zalicza się jedno białko (Cbl), odpowiedzialne za ubikwitynację receptora, która – jak się przypuszcza – prowadzi do jego internalizacji i degradacji wewnątrzkomórkowej. Tego typu interakcja receptor–białka komórkowe umożliwia aktywację szeregu różnych dróg przekazywania sygnału inicjowanych działaniem jednego hormonu. Przypuszcza się, że zjawisko to leży u podstaw działania wielu czynników wzrostowych, cytokin i hormonów określanymi jako hormony plejotropowe.

Należy wyraźnie powiedzieć, że oddziaływanie pojedynczej cząsteczki tego typu hormonów z pojedynczą cząsteczką receptora jest raczej wyjątkiem niż regułą. W rzeczywistości mamy zazwyczaj do czynienia z interakcją rodziny podobnych strukturalnie ligandów z rodziną receptorów o podobnej budowie chemicznej. Oligomeryczna struktura zaktywowanych receptorów pozwala na tworzenie zarówno homo-, jak i heterodimerów, które mogą mieć różny potencjał sygnalizacyjny. Najlepszym przykładem takich oddziaływań jest interakcja ligandów zaliczanych do rodziny epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF) z rodziną receptorów ErbB (rozdział 2.2.10). Podstawowe znaczenie dla specyficzności przekazywania sygnału inicjowanego jednym ligandem posiada zdolność ErbB do tworzenia homo- i heterodimerów. Poszczególne receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych różnią się zarówno aktywnością kinazową, jak i swoistością wiązania przedstawicieli tej rodziny czynników wzrostowych. Receptor ErbB3 w odróżnieniu od wszystkich pozostałych posiada upośledzoną zdolność do fosforylacji. Niektóre receptory EGFs wiążą większość ligandów omawianej grupy polipeptydów, inne tylko wybrane. Szczególnym przypadkiem jest ErbB2 odkryty jako receptor swoisty dla neuregulin/heregulin. Okazało się jednak, że receptor ten pośredniczy w działaniu EGF-podobnych czynników wzrostowych tylko pośrednio, poprzez heterodimeryzację z innymi białkami ErbB. Wyjaśnieniem są różnice w budowie części zewnątrzkomórkowej rodziny receptorów ErbB. ErbB1, ErbB3 i ErbB4 mają w części zewnątrzkomórkowej cztery subdomeny, których struktura w nieobecności liganda hamuje proces dimeryzacji. Związanie liganda z tymi receptorami powoduje zmiany konformacyjne umożliwiające dimeryzację

i autofosforylację receptorów oraz dalszy przekaz sygnału. W przypadku receptora ErbB2 struktury normalnie zaangażowane w wiązanie liganda pełnią rolę aktywnych pośredników dimeryzacji receptorów. To sprawia, że ErbB2 jest uniwersalnym partnerem w heterodimeryzacji receptorów ErbB.

Coraz więcej danych wskazuje, że istotną rolę w sygnalizacji z udziałem receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej odgrywa translokacja części wewnątrzkomórkowej receptora do jądra komórkowego, przynajmniej w przypadku niektórych receptorów (NGFR, EGFR i receptora insuliny).

Nowo poznaną rodziną receptorów o aktywności białkowych kinaz tyrozynowych, stanowiącą dotychczas część białek zaliczanych do receptorów sierocych, są kinazy adhezji komórkowej (CAKs, ang. *cell adhesion kinases*). Naturalnymi ligandami tych kinaz są białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Wiele tego typu kinaz o podobnej strukturze wyizolowano z tkanek ludzkich, mysich i szczurzych. Aby uprościć terminologię, Vogel zaproponował dla dwóch najlepiej poznanych kinaz adhezji komórkowej nazwy receptory z domeną „discodin” DDR1 i DDR2. Kinazy te mają różny od innych kinaz tyrozynowych receptorowych motyw w części zewnątrzkomórkowej, zbudowany z około 160 reszt aminokwasowych, zawierający dużą ilość glicyny i proliny (motyw DLD, ang. *discodin-1-like domain*). Podobny motyw występuje w wielu białkach zewnątrzkomórkowych, odpowiedzialnych za asocjację z białkami błonowymi. Rola fizjologiczna kinaz DDR jest niejasna. Dotychczas ustalono, że DDR1 jest bezpośrednio aktywowana przez kolagen typu I, II, III, V i XI, natomiast DDR2 przez kolagen typu I i III. Stymulacja kolagenem powoduje fosforylację reszt tyrozynowych w wewnątrzkomórkowej części receptorów DDR, tworząc miejsca dokowania dla białek wewnątrzkomórkowych mających domeny wiążące fosfotyrozynę, podobnie jak to ma miejsce w przypadku innych kinaz białkowych tyrozynowych. Zupełnie różna od pozostałych kinaz tyrozynowych jest natomiast kinetyka aktywacji kinaz DDR. Większość RTKs ulega krótkotrwałej autofosforylacji w czasie sekund po związaniu liganda, natomiast w przypadku kinaz DDR fosforylacja reszt tyrozynowych następuje po czasie 30–60 min od przyłączenia liganda i utrzymuje się przez kilkanaście (do 16) godzin. Przyjmuje się, że proces aktywacji DDR jest kilkusetapowy i wymaga koaktywacji receptorów integrynowych.

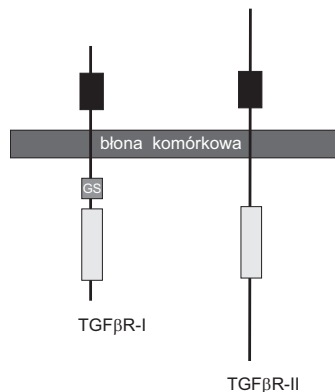
Istotnym uzupełnieniem wiadomości o mechanizmie przekazu sygnału inicjowanego przez receptory o aktywności kinazy tyrozynowej są doniesienia o transaktywacji tego typu receptorów przez receptory związane z białkami G, receptory o aktywności kinaz serynowo-treoninowych i receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi.

b. Receptory o aktywności kinazy serynowo-treoninowej

Dotychczas opisano dwa typy receptorów o aktywności kinazy serynowo-treoninowej, charakterystyczne dla większości (ale nie dla wszystkich) białek zaliczanych do superrodziny TGFβs. Superrodzina TGFβ to duża, licząca dziś ponad 40 różnych polipeptydów, grupa białek o aktywność plejotropowej. Do superrodziny tej zalicza się oprócz TGFβs także: aktywiny/inhibiny (Act/Inh, ang. *activin/inhibin*), białka

morfogenetyczne kości (BMPs, ang. *bone morphogenic proteins*), czynniki wzrostu i różnicowania (GDFs, ang. *growth and differentiation factors*), inhibitor Mulleriana (AMH, ang. *anti-mullerian hormone*), myostatynę i inne. Wszystkie to związki o różnej aktywności biologicznej. Act/Inh regulują sekrecję hormonu FSH, BMP to białka uczestniczące głównie w regulacji wzrostu i różnicowania prekursorowych komórek kości, a AMH to substancja powodująca regresję kanalikula Mulleriana w trakcie rozwoju układu reprodukcyjnego samców.

Obecnie znanych jest siedem receptorów typu I (ALK 1–7, ang. *activin-like kinase*) i pięć receptorów typu II (TGF β R-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II, MISR-II). Receptory swoiste dla TGF β : TGF β 1R-I (ALK-5) i TGF β R-II są relatywnie małymi glikoproteinami o m.cz. odpowiednio 75 i 53 kDa. Receptory te o aktywności kinazy serynowo-treoninowej zbudowane są z krótkiej części akceptorowej, zawierającej domeny bogate w cysteinę, pojedynczej części transbłonowej i części wewnątrzkomórkowej, zawierającej dużą domenę kinazową (Rys. 2.12). W części efektorowej receptorów TGF β R-I (w odróżnieniu od receptorów TGF β R-II) zlokalizowana jest pomiędzy błoną komórkową a domeną kinazową 30-aminokwasowa domena GS (zawiera sekwencję -GSGS-), kluczowa dla regulacji aktywności TGF β R-I. W formie nieaktywnej domena ta jest związana z immunofilinami (FKBP12, FKBP12.6). Części C-końcowe obu typów receptorów, zlokalizowane poza domeną katalityczną, zbudowane są z 24 (TGF β R-II) i 5 (TGF β R-I) reszt aminokwasowych. W przypadku superrodziny transformujących czynników wzrostowych typu β opisano także receptor TGF β R-III, o charakterze dużego proteoglikanu, endoglinę (glikoproteinę, o której początkowo niesłusznie sądzono, że jest swoista dla komórek endotelialnych), niemające aktywności enzymatycznej oraz receptor pułapkę (zob. rozdział 2.2.6), określaną skrótem BAMBI (ang. *BMP and activin membrane-bound receptor inhibitor*). Biologiczna rola TGF β R-III w transmisji sygnału jest nie do końca jasna, chociaż uważa się, że pełni on rolę cząsteczki prezentującej ligand receptorowi typu II, zwłaszcza dla ligandów o niskim powinowactwie do receptorów serynowo-treoninowych (np. TGF β 2). Rola endogliny jest odmienna, ponieważ hamuje ona odpowiedź komórek na działanie TGF β .



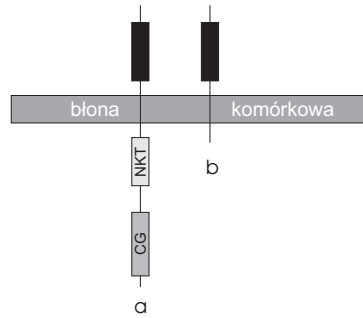
Rys. 2.12. Schemat budowy receptorów TGF β R-I i TGF β R-II

Receptory typu I i II są bezpośrednio zaangażowane w przekaz sygnału inicjowany przyłączeniem ligandów z rodziny TGFβs i mają wzajemne powinowactwo do siebie. Kinaza receptora typu II jest aktywowana konstytutywnie, bez stymulacji hormonalnej. Po przyłączeniu TGFβ do receptora typu II następuje tworzenie heterotetramerycznego kompleksu, złożonego z dwóch cząsteczek TGFβR-II i dwóch cząsteczek TGFβR-I. Powstanie kompleksu umożliwia fosforylację reszt seryny i treoniny, zarówno w domenie GS (oddysojowanie immunofilin), jak i w innych częściach receptora typu I przez kinazę receptora typu II. Fosforylacja ta powoduje zmiany konformacyjne w cząsteczce TGFβR-I i aktywację jego kinazy serynowo-treoninowej. Substratami kinazy TGFβR-I mogą być różne białka cytozolowe, m.in. białka Smad.

Aktywacja i regulacja aktywności kinazowej receptorów superrodziny TGFβ jest wielostopniowa. Dobrze udokumentowany jest fakt fosforylacji receptorów typu I przez receptory typu II. Tak więc inicjacja przekazania sygnału przez ligand rozpoczyna się od receptorów typu II. Natomiast swoistość przekazania sygnału od różnych członków rodziny TGFβ zależy od receptora typu I. Różnice w kinetyce biosyntezy, internalizacji i degradacji receptorów obu typów mają zasadnicze znaczenie w modulacji sygnału indukowanego białkami rodziny TGFβ. Obecność receptorów dla TGFβ stwierdzono w błonach cytoplazmatycznych bardzo wielu różnych typów komórek. Sugerowano istnienie licznych układów efektorowych, regulowanych działaniem TGFβ, jak: cyklaza adenylanowa, fosfolipaza C, kinaza białkowa B (PKB/Akt), kinazy MAP czy białka regulujące funkcjonowanie kanałów jonowych, ale najlepiej udokumentowana jest aktywacja swoistych, cytozolowych czynników transkrypcyjnych – białek Smad (rozdział 8.3).

c. Receptory o aktywności fosfatazy tyrozynowej

Receptorowe fosfatazy białkowe tyrozynowe (RPTP, ang. *receptor-like protein tyrosine phosphatase*) są podrodziną tyrozynoswoistych fosfataz białkowych (rozdział 6.2), enzymów zaliczanych do grupy hydrolaz. Wszystkie receptory tego typu zawierają w swej części efektorowej jedną lub dwie domeny katalityczne. RPTPs stanowią liczną rodzinę białek transbłonowych, podzielonych ze względu na budowę części zewnątrzkomórkowej na siedem grup (I–VII). Przedstawicielem I grupy jest antygen CD45, zawierający w części akceptorowej motyw podobny do fibronektyny typu III i motyw podobny do spektryny. Grupy II, III i V zawierają odpowiednio motywy: immunoglobulinopodobne, fibronektyno(III)-podobne i podobne do anhidrazy węglanowej. Grupy IV, VI i VII nie zawierają żadnych motywów charakterystycznych dla białek mozaikowych, a różnią się liczbą i/lub usytuowaniem domen katalitycznych w wewnątrzkomórkowej części receptora. Nie znamy dotychczas substratów dla większości RPTPs. W przypadku najlepiej scharakteryzowanej fosfatazy, antygen CD45, przyjmuje się, że fizjologicznymi substratami tego enzymu są kinazy tyrozynowe niereceptorowe należące do rodziny Src, uczestniczące w stymulowanej antygenem sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. W wyniku działania fosfatazy receptora białka te ulegają defosforylacji przy C-końcu ich cząsteczek, co prowadzi do ich aktywacji.



Rys. 2.13. Receptory o aktywności cykazy guanylanowej. a. receptory NPR-A i -B, b. receptor NPR-C. Domeny: CG – cykazy guanylanowej, NKT – nieaktywnej kinazy tyrozynowej

d. Receptory o aktywności cykazy guanylanowej

Peptydy natriuretyczne (NPs, ang. *natriuretic peptides*; lub NF, ang. *natriuretic factors*) to cząsteczki o m.cz. około 10 kDa, występujące powszechnie w tkankach kręgowców. NPs utrzymują homeostazę jonową (bilans sodu i potasu) oraz wodną. W zależności od pełnionej funkcji fizjologicznej wyróżnia się: przedsionkowy (ANP), komorowy (VNP), mózgowy (BNP), nerkowy (RNP) peptyd natriuretyczny oraz peptyd natriuretyczny typu C (CNP). ANP, VNP i BNP są produkowane w sercu i wydzielane do krążenia. CNP jest syntetyzowany w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, RNP zaś w nerkach.

Scharakteryzowano siedem typów receptorów błonowych NPs kręgowców: NPR-A (GC-A) – NPR-G (GC-G), lecz znane są ligandy tylko dla trzech: NPR-A, NPR-B i NPR-C. Wszystkie trzy są jednołańcuchowymi peptydami, w których skład wchodzi N-końcowa domena zewnątrzkomórkowa (440 aa). Część cytoplazmatyczna NPR (A i B) zbudowana jest z 530 aa, a NPR-C z 37 aa. Część cytoplazmatyczna A i B zawiera dwie domeny (licząc od błony): nieaktywnej kinazy białkowej (280 aa), niezbędnej do stymulowanej ligandem aktywacji domeny cykazy guanylanowej (250 aa) (Rys. 2.13). Aktywacja receptorów A i B powoduje wzrost cGMP, a receptora C prawdopodobnie cAMP. cGMP może regulować trzy układy efektorowe: kanały jonowe bramkowane cGMP, kinazy białkowe G i fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów (regulacja allosteryczna). W postaci natywnej wszystkie te receptory są homodimerami.

Występują również wewnątrzkomórkowe receptory o aktywności CG, stymulowane wiązaniem gazowych cząsteczek sygnalizacyjnych NO i CO.

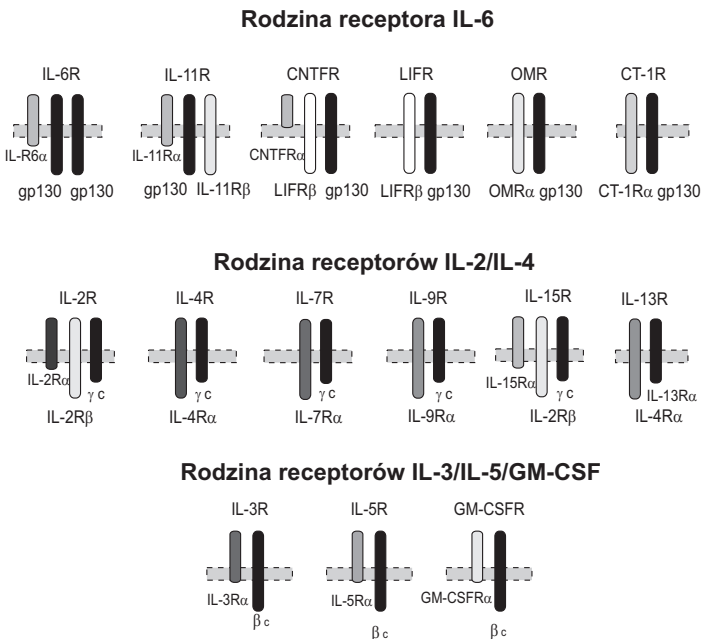
2.2.4. Receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi

Cechą charakterystyczną receptorów wielu białek zaliczanych do grupy cytokin jest ich współdziałanie z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi (zob. rozdział 5.2). Kinazy tyrozynowe niereceptorowe są produktami niektórych onkogenów wirusowych (białka transformujące) lub onkogenów komórkowych. Wszystkie zawierają domenę

kinazową. Cechą charakterystyczną białek eukariotycznych jest obecność dodatkowej sekwencji N-końcowej, odpowiedzialnej za przyłączenie kwasu mirystylowego, umożliwiającego ich zakotwiczenie w błonie komórkowej. Większość KT niereceptorowych zawiera również inne domeny (np. SH2, SH3, PH) odpowiedzialne za ich interakcję z białkami komórkowymi, i dlatego zaliczana jest do tzw. białek kotwiczących (zob. rozdział 3.3). KT niereceptorowe pośredniczą w przenoszeniu sygnału inicjowanego przez niektóre cytokiny (większość interleukin, interferony i niektóre czynniki hematopoetyczne), hormon wzrostu (GH), prolaktynę (PRL), leptynę, antygeny i integryny. Receptory przekazujące sygnał na tej drodze określane są zwykle jako „receptory cytokin”, chociaż wiele cytokin przekazuje sygnał w sposób odmienny.

a. Receptory cytokin

W piśmiennictwie zarówno polskim, jak i zagranicznym można często spotkać określenie „receptory cytokin”. W rzeczywistości taki typ receptora nie istnieje. Liczna rodzina polipeptydów określanych mianem cytokin może przekazywać informację do wnętrza komórki docelowej przez różne typy receptorów błonowych. Chemokiny przekazują informacje przez receptory współdziałające z białkami G, niektóre czynniki wzrostu i różnicowania komórek krwi przez receptory o aktywności kinazy tyrozynowej, czynnik nekrozy nowotworu i limfotoksyny częściowo przez receptory z domeną śmierci, a większość interleukin i wszystkie interferony przez receptory



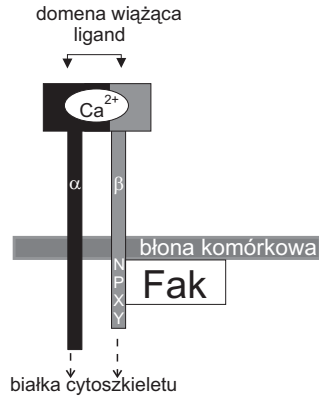
Rys. 2.14. Wybrane rodziny receptorów asocjujących z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi

asocjujące z kinazami Janusa, jedną z dziewięciu znanych rodzin kinaz tyrozynowych niereceptorowych. Zupełnie odrębną grupę receptorów stanowią receptory rodziny IL-1 i receptory Toll-podobne (opisane niżej).

Grupę receptorów asocjujących z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi określa się zazwyczaj jako receptory typowe dla cytokin. Wśród tych białek transbłonowych wyróżnia się dwie klasy receptorów, różniące się głównie budową części akceptorowej. Część zewnątrzkomórkowa receptorów klasy I zawiera cztery konserwatywne ewolucyjnie reszty cysteinowe i motyw WSXWS (-Trp-Ser-X-Trp-Ser-). Natomiast receptory klasy II nie mają tego motywu. „Receptory cytokin” zbudowane są z dwóch lub trzech podjednostek białkowych. Receptory heterooligomeryczne zawierają podjednostkę wspólną dla kilku cytokin, tworząc swoiste podrodziny cytokin (Rys. 2.14). Wszystkie wymienione receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi zbudowane są przynajmniej z dwóch podjednostek białkowych i większość z wiązanych przez nie cytokin ma przynajmniej dwa miejsca wiążące dwie podjednostki receptorowe. Związanie liganda z receptorem powoduje oligomeryzację podjednostek receptora i tworzenie aktywnego kompleksu. Swoistość wiązania jest zdeterminowana przez komplementarne obszary strukturalne cytokiny i zoligomeryzowanego receptora „cytokine cradle” (ang. *created by the oligomerised receptor molecules*). Wszystkie receptory tego typu wykorzystują dla przekazania sygnału układ białek Jak-STAT i mają w swej części wewnątrzkomórkowej, położone w pobliżu błony komórkowej, sekwencje wiążące kinazy Janusa, określane jako box1 i box2.

b. Receptory integrynowe

Integryny zaliczane są do grupy receptorów adhezyjnych, do której należą także: kadheryny, selektyny i immunoglobulinopodobne białka adhezyjne. Integryny można zaliczyć równocześnie do rodziny receptorów asocjujących z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi, chociaż ich funkcja biologiczna jest odmienna od pozostałych receptorów tej grupy. Receptory integrynowe są to białka transbłonowe komórek zwierzęcych odpowiedzialne przede wszystkim za adhezję komórek do podłoża i obok innych białek za interakcję komórka–komórka. Integryny są glikoproteinami zbudowanymi z dwóch podjednostek: α (120–180 kDa) i β (90–110 kDa). Obecnie znanych jest 17 różnych podjednostek α i 8 różnych podjednostek β ssaków. Podjednostki te tworzą 23 różne strukturalnie białka. Poszczególne integryny wiążą swoście określone ligandy. Przykładowo, integryny $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ i $\alpha 10\beta 1$ wiążą kolageny, integryny $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ i $\alpha V\beta 1$ – fibronektynę, a integryny $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ i $\alpha 7\beta 1$ – lamininy. Każdy dimer pełni także określoną funkcję biologiczną. Integryny występują prawdopodobnie we wszystkich typach komórek organizmów *Metazoa*, ale poszczególne typy różnią się od siebie liczbą i rodzajem tych białek. Integryny klasyfikuje się na podstawie rodzaju podjednostki β wchodzącej w ich skład (np. $i.\beta_1$, $i.\beta_2$, $i.\beta_3$ itd.). Zarówno podjednostki α , jak i podjednostki β zbudowane są z dużej domeny zewnątrzkomórkowej ($\alpha > 100$ kDa, $\beta > 75$ kDa), typowej domeny transbłonowej i małej domeny wewnątrzkomórkowej (około 50 reszt aminokwasowych). Wyjątkiem są podjednostki $\beta 4$, zbudowane z ponad 1000 aminokwasów.



Rys. 2.15. Schemat receptora integrynowego

W części zewnątrzkomórkowej wszystkich podjednostek α występuje kilkakrotnie powtórzona sekwencja -Asp-X-Asp-X-Asp-Gly-X-X-Asp- (lub pokrewna), warunkująca wiązanie kationów dwuwartościowych (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), istotnych dla receptorowej funkcji integryn. Żadna z podjednostek integryn nie wiąże sama liganda. Połączenie obu podjednostek w heterodimer wymaga obecności kationów dwuwartościowych, a rodzaj kationu wpływa na powinowactwo integryn do określonego liganda. W obecności wyżej wymienionych kationów zewnątrzkomórkowe części podjednostek integryn asocjują z sobą, tworząc funkcjonalny receptor (Rys. 2.15). Integryny przenoszą sygnał od białek macierzy zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórki z udziałem kinaz tyrozynowych niereceptorowych. Część zewnątrzkomórkowa receptora oddziałuje z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyną, lamininą, kolagenami, trombospondyną), a część efektorowa (wewnątrzkomórkowa) z kompleksem białek cytoszkieletu (α -aktynina, winkulina, talina, paksylina i tensyna), które wiążą je do filamentów aktynowych. W pobliżu wewnątrzkomórkowej części integryn zlokalizowane są także kinazy tyrozynowe niereceptorowe, takie jak: Fak, Src, Abl i Csk (zob. rozdział 5.2). Kinazy te mogą przekazywać sygnał na białka Ras za pośrednictwem innych białek, np. Fas \rightarrow Grb2 \rightarrow Ras lub Src \rightarrow paksylina \rightarrow Ras. Z kolei białka Ras mogą inicjować kaskadę kinaz MAP, w sposób podobny do czynników wzrostowych. Udowodniono, że kinaza Fak jest przyłączona do cytoplazmatycznej części podjednostek $\beta 1$ i $\beta 3$ (przez motyw NPYX) i odgrywa główną rolę w mediacji funkcji integryn. C-końcowy odcinek Fak zawiera miejsca wiążące dla wielu białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego. Przyjmuje się, że układ integryny–Fak pośredniczy m.in. w procesach związanych z przeżyciem komórek (supresja apoptozy), angiogenezą (stymulacja ruchliwości komórek endotelialnych), a także ze wzrostem neoplastycznym.

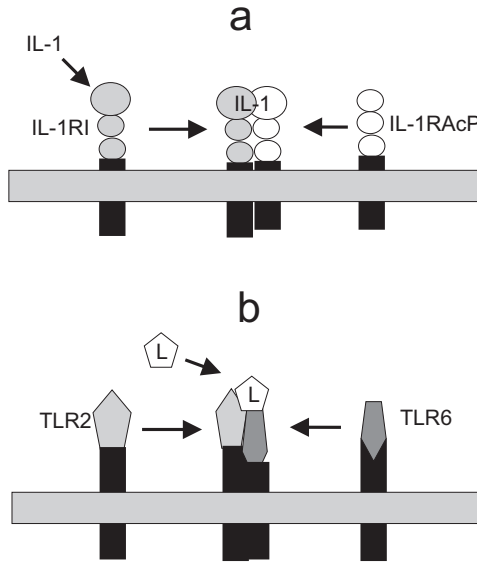
Jak już wspomniano, poszczególne integryny mogą rozpoznawać więcej niż jeden ligand, a także pojedyncze białko może wiązać się z różnymi integrynami. Przyczyną tego zjawiska jest fakt, że niektóre integryny rozpoznają krótkie sekwencje aminokwasowe w cząsteczkach ligandów białkowych, np. integryny $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$,

$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ i $\alpha_v\beta_6$ rozpoznają sekwencję -Arg-Gly-Asp- (RGD), występującą m.in. w fibronektynie, integryny $\alpha_2\beta_1$ – sekwencję -Asp-Gly-Glu-Ala- (DGEA), występującą w kolagenie typu I, a integryny $\alpha_x\beta_2$ – sekwencję -Gly-Pro-Arg-Pro- (GPRP), występującą w fibrynogenie. Integryny rozpoznają także swoiście jedną z domen immunoglobulinopodobnych białek komórkowych – adhezyn. Komórki regulują swoje właściwości adhezyjne dzięki selektywnej ekspresji poszczególnych typów integryn oraz modulacji ich powinowactwa do określonych białek. Miejsca wiążące ligandy są tworzone zarówno przez podjednostkę α , jak i przez podjednostkę β . Dzięki temu integryny umożliwiają swoistą adhezję komórek, ich agregację lub ukierunkowaną migrację, podczas embriogenezy, organogenezy, hemostazy, odpowiedzi immunologicznej organizmu, oraz tworzenie metastaz. Integryny uczestniczą zarówno w przenoszeniu informacji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki, jak i w kierunku odwrotnym. W większości komórek integryny współdziałają z innymi receptorami błonowymi, takimi jak receptory GPCR lub receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, stymulując cykl inozytolowy, alkalizację cytoplazmy, wzrost cytoplazmatycznego poziomu wapnia i inne skutki metaboliczne.

2.2.5. Receptory podobne do białka Toll

Układ immunologiczny człowieka może być z grubsza podzielony na odpowiedzialny za odporność wrodzoną (nieswoistą) i odporność adaptacyjną (swoistą). W przeciwieństwie do czynnej odpowiedzi swoistej realizowanej przez limfocyty B i T oraz produkcję przeciwciał swoiście rozpoznających patogeny, odpowiedź nieswoista jest realizowana przez ograniczoną liczbę receptorów rozpoznających ogólną strukturę patogenów. Receptory te rozpoznają struktury molekularne wspólne dla wielu patogenów, w ten sposób indukując szybką, lecz nieswoistą odpowiedź immunologiczną. W organizmach ssaków i owadów nieswoisty układ odpornościowy odpowiada przez detekcję „wzorów molekularnych” określonych patogenów PAMPs (ang. *patogen associated molecular patterns*). Wśród receptorów rozpoznających PAMPs wyróżnia się receptory: podobne do Toll (TLRs, ang. *Toll-like receptors*), podobne do NOD (NLRs, ang. *NOD-like receptors*), podobne do RIG-I (RLRs, ang. *RIG-I-like receptors*) i lektyn typu C (CLRs, ang. *C-type lectin receptors*).

Toll-podobne receptory są białkami transbłonowymi przebijającymi błonę komórkową tylko raz, niemającymi aktywności enzymatycznej. Rozpoznają cząsteczki pochodzące z mikroobów, które pokonały bariery fizjologiczne, takie jak skóra czy śluzówka przewodu pokarmowego. Uważa się, że odgrywają kluczową rolę w inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Receptory te należą do superrodziny receptorów interleukiny-1 i Toll-podobnych (*Interleukin-1 Receptor/Toll-Like Receptor*) mających wspólną domenę TIR (ang. *Toll-IL-1 receptor*). Budowa receptorów rodziny IL-1 oraz mechanizm transdukcji sygnału przez te receptory są odmienne od wszystkich pozostałych interleukin. Wyróżnia się dwa typy receptorów dla interleukin z rodziny IL-1 (receptor typu I zawierający domenę TIR i receptor typu II niezawierający tej domeny) oraz kilka koreceptorów (białek towarzyszących tym receptorom). Uważa się, że receptor typu II pełni rolę receptora pułapki. Receptorowi IL-1RI może towarzyszyć



Rys. 2.16. Tworzenie aktywnych form heterodimerycznych przez receptory z rodziny IL-1 (IL-1R i IL-1RAcP) (a) i receptory Toll-podobne TLR2 i TLR6 (b)

białko IL-1RAcP (ang. *IL-1R associated protein*) i IL-1Rp2 (ang. *IL-1 – receptor related protein 2*), receptorowi IL-18RI α (IL-1Rp1) białko IL-18RI β (IL-18AcP, ang. *IL-18 associated protein*). Wszystkie te białka mają trzy domeny Ig-podobne w części akceptorowej i domenę TIR w części efektorowej. Nazwa TIR odzwierciedla podobieństwo segmentów cytoplazmatycznych białka muszki owocowej Toll oraz receptora IL-RI (Toll/IL-1R). Różnice w budowie funkcjonalnych receptorów rodziny IL-1 typu I i Toll-podobnych przedstawiono schematycznie na rysunku 2.16.

Wyróżnia się trzy grupy białek zawierających domeny TIR:

- TIR1 – receptory interleukin, syntetyzowane przez monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne oraz podobne do nich receptory węchowce, które mają zewnątrzkomórkowe domeny immunoglobulinopodobne,
- TIR2 – receptory wiążące bezpośrednio lub pośrednio cząsteczki pochodzące z organizmów drobnoustrojów,
- TIR3 – białka adaptorowe, pośredniczące w sygnalizacji realizowanej przez receptory zawierające TIR1 i TIR2, takie jak: MyD88 (ang. *myeloid differentiation factor 88*), IRAK (ang. *IL-1 associated kinase*), TRAF (ang. *TNF receptor associated factor*).

TLRs są obecne zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców. Podobne białka występują w roślinach i przyjmuje się, że TLRs mogą być jedną z najstarszych ewolucyjnie komponent układu immunologicznego. Receptory Toll-podobne zaliczane są obecnie do kluczowych cząsteczek, które alarmują układ immunologiczny o obecności infekcji drobnoustrojami. Zostały nazwane od ich podobieństwa do białka Toll, receptora

zidentyfikowanego pierwotnie u muszki owocowej i odpowiedzialnego za funkcje rozwojowe tego organizmu. Pierwszy receptor ludzki był opisany przez Nomurę i kolegów w 1994 roku. W organizmach ssaków stwierdzono występowanie kilkunastu receptorów Toll-podobnych. Dziewięć zostało zidentyfikowanych u człowieka. Ludzkie receptory TLRs zlokalizowane są w błonie komórkowej poza trzema (TLR3, TLR7 i TLR9), które są zakotwiczone w błonach endosomów. Aktywowane receptory TLRs stymulują ekspresję wielu białek uczestniczących w procesach odpornościowych i zapalnych, niezbędnych do eliminacji patogenów. Receptory te są syntetyzowane przez różne komórki, zarówno obrony immunologicznej (makrofagi, limfocyty B, neutrofile, komórki dendrytyczne), jak i inne (fibroblasty, keratynocyty, komórki epitelialne). Receptory Toll-podobne wykorzystują podobne drogi sygnałowe jak receptory rodziny IL-1, których wstępnymi etapami jest interakcja z białkami (adaptorowymi) zawierającymi także domeny TIR (TIRAP, Myd88, TRIF, TRAM). Każde z białek TLR rozpoznaje różne „wzory molekularne” pochodzące z różnych drobnoustrojów, takich jak wirusy, bakterie, pierwotniaki i grzyby. Przykładowo, ligandami TLR2 są lipoproteidy i peptydoglikany, ligandami TLR4 – LPS, a ligandami TLR5 – flagelina.

Główna droga sygnałowa inicjowana aktywnym receptorem TLR prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- κ B i AP-1, które z kolei stymulują ekspresję genów cytokin prozapalnych (TNF α , IL-6). Inny sygnał inicjowany aktywacją TLR angażuje czynniki transkrypcyjne IRFs (ang. *interferon regulatory factors*), głównie IRF3, który po ufosforylowaniu tworzy kompleks z NF- κ B i ATF2 (enhansom) regulujący transkrypcję genów interferonu β .

2.2.6. Receptory z domeną śmierci i receptory pułapki

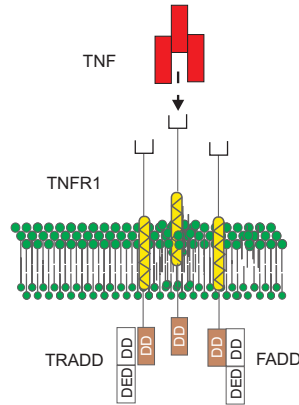
Receptory zawierające tzw. domenę śmierci (zob. rozdział 3.1) wchodzi w skład dużej superrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu (TNF, ang. *tumor necrosis factor*), liczącej dzisiaj 29 różnych receptorów. Oprócz receptorów TNF i limfotoksyn (L α / β) superrodzinę tę reprezentuje kilkanaście innych białek o zróżnicowanej aktywności biologicznej (Tabela 5). Większość receptorów superrodziny TNF to białka transbłonowe typu I (N-koniec na zewnątrz komórki, a C-koniec wewnątrz). Wszystkie te receptory zawierają jedną z dwu lub obie charakterystyczne dla nich domeny: DD (ang. *death domain*) i/lub TIM (ang. *TRAF-interacting motif*). Cechą charakterystyczną części zewnątrzkomórkowej receptorów superrodziny TNF jest obecność domeny bogatej w cysteinę (CXXCXXC), uczestniczącej w tworzeniu mostków disiarczkowych, nadających receptorom odpowiednią strukturę trzeciorzędową. Poszczególne receptory mogą się różnić liczbą domen cysteinowych, od niepełnej 1 do 6 takich domen.

Do receptorów zawierających „domenę śmierci” zalicza się ssacze białka CD95 (Apo1, Fas) i TNFR1 (p55) oraz ich ptasie odpowiedniki: DR4 (DR, ang. *death receptor*) i DR5 (Apo2, KILLER) oraz receptor sierocy CAR1. Ligandy tych receptorów, odpowiednio: CD95L (FasL, ApoL), TNF i L α oraz TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis inducing ligand*) są strukturalnie podobne i zaliczane do rodziny czynnika martwicy nowotworu (TNF). Do receptorów z domeną śmierci zalicza się także receptor czynnika wzrostu nerwu (NGF, ang. *nerve growth factor*), oznaczany jako p75^{NGF}, chociaż

Tabela 5. Receptory superrodziny czynnika nekrozy nowotworu

Receptory	Akronimy	Domeny aktywne
Czynnika nekrozy nowotworu (TNF)	TNFR1, TNFR2	DD
Limfotoksyny α (Lt α)	TNFR1, TNFR2	DD
Limfotoksyny β (Lt β)	LT β R	TIM
Liganda CD95 (liganda FAS)	CD95, FAS, DcR3	DD
TNF-podobnego liganda indukującego apoptozę (TRAIL)	DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG	DD
Inhibitora wzrostu naczyńniowych komórek endothelialnych (VEGI)	DR3, DcR3	TIM
Ektodermalnej dysplazminy (EDA1, EDA2)	EDAR, XEDAR	DD + TIM
Liganda receptora aktywowanego NF- κ B (RANKL)	RANK, OPG	TIM
TNF-podobnego słabego aktywatora apoptozy (TWEAK)	FN14	TIM
Liganda indukującego proliferację (APRIL)	BCMA, TACI	TIM
Czynnika aktywującego komórki B (BAFF)	BAFFR, TACI	TIM
Liganda GITR (GITRL)	GITR	TIM
Liganda OX40 (OX40L)	OX40	TIM
Liganda CD137 (CD137L)	CD137	TIM
?	TAJ, RELT	TIM
Liganda CD40 (CD40L)	CD40	TIM
Liganda CD30 (CD30L)	CD30	TIM
Liganda CD27 (CD27L)	CD27	TIM
LIGHT, HVEML	HVEM, DR3,	TIM
?	DR6	TIM
Czynnika wzrostu nerwu (NGF)	NGFR	DD + TIM

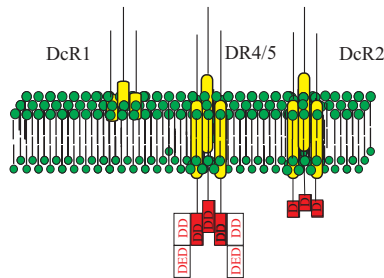
APRIL – *a proliferation inducing ligand*, BAFF – *B-cell activating factor*; BAFFR – *BAFF receptor*; BCMA – *B-cell maturation antigen*, CD – *clusters of differentiation*, DD – *death domain*, DcR – *decoy receptor*; DR – *death receptor*; EDA – *ectodermal dysplasin*, EDAR – *EDA receptor*; Fas – *factor promoting apoptosis*, GITR – *glukocortykoid-induced TNF-family receptor*; GITRL – *GITR ligand*, HVEM – *herpes virus entry mediator*; LIGHT – *ligand inducible expression, and competes with HSV glycoproteinD for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes*, Lt – *lymptoxin*, NGF – *nerve growth factor*; NGFR – *NGF receptor*; OPG – *osteoprotegrin*, OX40L – *OX40 ligand*, RANK – *receptor activator of NF- κ B*, RANKL – *RANK ligand*, RELT – *receptor expressed in lymphoid tissues*, TACI – *transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor*; TAJ – *toxicity and JNK inducer*; TIM – *TRAF interacting motif*, TNF – *tumor necrosis factor*, TNFR – *TNF receptor*; TRAIL – *TNF-related apoptosis inducing ligand*, TWEAK – *TNF-like weak inducer of apoptosis*, VEGI – *vascular endothelial cell growth inhibitor*; XEDAR – *X-linked EDA receptor*.



Rys. 2.17. Oligomeryzacja receptorów TNF (TNFR1) wymuszona wiązaniem trimeru czynnika martwicy nowotworu TNF. TRADD, FADD – białka adaptorowe zawierające tzw. domenę śmierci (DD)

jego ligand jest strukturalnie odmienny od członków rodziny TNF. Receptory TNFR1 i CD95D mogą występować w formie rozpuszczalnej, niezwiązanej z błoną.

Wszystkie ligandy zaliczane do rodziny TNF są w formie natywnej trimerami. Poszczególne trimery wiążą trzy cząsteczki receptora, tworząc heksamer. Ponieważ charakterystyczną właściwością „domen śmierci” jest ich zdolność do wzajemnej asocjacji, związanie liganda przez receptor skutkuje asocjacją receptorów, do których z kolei mogą przyłączać się białka adaptorowe mające także domeny DD (Rys. 2.17). Pomimo że wszystkie receptory tego typu mogą przekazywać sygnał do apoptozy, droga przekazu sygnału może angażować różne białka adaptorowe, takie jak: FADD (ang. *Fas-associated death domain*), TRADD (ang. *TNFR-associated death domain*) lub RIP (ang. *receptor interacting protein*). Budowa receptorów DR4 i DR5 oraz sposób ich aktywacji są podobne do omawianych wcześniej. Nie wiadomo dotychczas, jakie białko adaptorowe uczestniczy w asocjacji z domeną DD tych receptorów i w przeniesieniu sygnału do apoptozy. Nie jest to białko FADD jak w receptorach komórek ssaków.

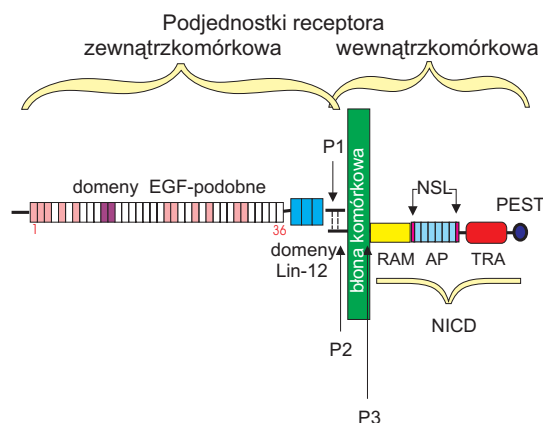


Rys. 2.18. Receptor ptasi DR4/5 i receptory pułapki DcR1 i DcR2

Wykazano obecność powierzchniowych białek błonowych, strukturalnie podobnych do części zewnątrzkomórkowej receptorów DR4/DR5, określanymi jako „receptory pułapki” (DcRs, ang. *decoy receptors*). Znane są dwa typy tych receptorów. DcR1 jest lipoproteiną powierzchniową, zakotwiczoną częścią lipidową reszty cukrowo-lipidowej, natomiast DcR2 jest DR-podobnym białkiem transbłonowym z obciętą domeną śmierci (Rys. 2.18). Ponieważ receptory DR4 i DR5 mogą być syntetyzowane przez wiele tkanek, podobnie jak ich ligand ApoL2, istnienie receptorów pułapek może być jedną z metod zabezpieczających komórki tych tkanek przed niepożądaną apoptozą. Także w tkankach ssaków występują receptory pułapki, m.in. dla szeregu cytokin (np. DcCD95, BAMBI, IL-1RII). Występowanie receptorów pułapkujących nie jest cechą charakterystyczną wyłącznie dla cytokin. Wiele peptydów plejotropowych posiada takie zabezpieczenie przed nadmiarem liganda.

2.2.7. Receptory Notch

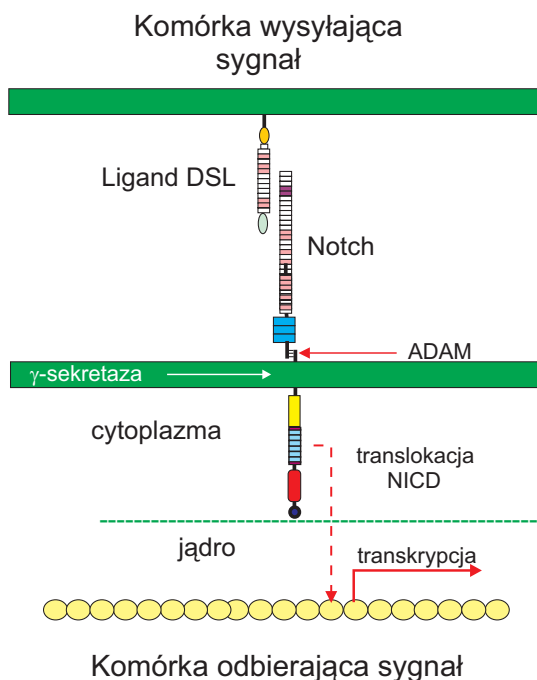
Gen Notch został odkryty w 1971 roku przez T.H. Morgana, który pierwszy zauważył szczerp muszki owocowej z charakterystycznymi wcięciami (karbowaniem) występującymi w błonach ich skrzydeł. Receptory Notch są dużymi białkami transbłonowymi typu I, jednokrotnie przebijającymi błonę komórkową. Dojrzałe receptory są heterooligomerami złożonymi z dużej części zewnątrzkomórkowej, zasocjowanej w sposób zależny od jonów wapnia z podjednostką zbudowaną z części zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i krótkiego fragmentu wewnątrzkomórkowego. Domeną budowę receptorów Notch muszki owocowej przedstawia rysunek 2.19. Poczynając od N-końcowej części zewnątrzkomórkowej receptora, wyróżnia się 29–36 domen EGF-podobnych, niektóre z nich (zaznaczone na różowo) mogą ulegać procesowi



Rys. 2.19. Budowa receptora Notch. Domeny EGF-podobne mogące ulegać fukozytacji (■) i wiążące ligandy (■). AP – domeny akrynopodobne, NSL – domeny lokalizacji jądrowej, RAM – domena przybłonowa, PEST – sekwencja Pro-Gln-Ser-Thr, TRA – domena transaktywacji, NICD – aktywna transkrypcyjnie część receptora Notch, P1–P3 – miejsca cięć proteolitycznych

fukozytacji, a dwie 11 i 12 (w receptorze muszki owocowej) są odpowiedzialne prawdopodobnie za wiązanie ligandów. W dalszej części łańcucha usytuowane są trzy domeny Lin-12, poprzedzające region wiązania z drugą podjednostką receptora i odpowiedzialne za utrzymanie odpowiedniej konformacji receptora przed indukowaną ligandem jego aktywacją. Rozbicie strukturalnej integralności domen Lin-12 przez chelatowanie jonów wapnia prowadzi do aktywacji receptorów Notch. W części wewnątrzkomórkowej wyróżnia się zbudowaną z około 100 reszt aminokwasowych domenę nazywaną RAM, za którą znajduje się fragment wewnątrzkomórkowy, zbudowany z siedmiu domen podobnych do akryny (AP), flankowanych dwiema domenami lokalizacji jądrowej (NSL). W dalszej części receptora znajduje się mniej konserwatywna ewolucyjnie domena transaktywacji (TRA) i charakterystyczna sekwencja C-końcowa: -Pro-Gln-Ser-Thr- (PEST).

W trakcie dojrzewania receptora jego łańcuch peptydowy ulega glikozylacji. Najpierw fukozytacji, modyfikacji niezbędnej do utworzenia funkcjonalnego receptora, katalizowanej przez O-fukozylotransferazy, a następnie glikozylacji przez białka Fringe. Trzy takie białka występują u kręgowców (Radical Fringe, Manic Fringe i Lunatic Fringe). Białka te są glikozylotransferazami, działającymi w aparacie Golgiego, dołączając reszty N-acetyloglukozoaminy do fukozy występującej w swoistych domenach EGF-podobnych, zlokalizowanych w zewnątrzkomórkowej części receptorów Notch. Glikozylowany w aparacie Golgiego receptor ulega proteolitycznemu rozszczepieniu przez konwertazy białkowe (PC5, furyna) w miejscu odległym od powierzchni błony komórkowej o około 70 aminokwasów (oznaczonym jako P1), dając dwie podjednostki receptora: zewnątrzkomórkową i wewnątrzkomórkową. Te dwie podjednostki powiązane są niekowalencyjnie, a utworzony heterodimer (dojrzały receptor) ulega translokacji do błony komórkowej. Geny *fringe* kręgowców kodują glikozylotransferazy (głównie α -1,3 N-acetyloglukozoaminylotransferazy), które modulują odpowiedź Notch na ich ligandy. Fukozyłacja zmienia zdolność swoistych ligandów do aktywacji receptorów Notch. Glikozylacja receptorów Notch przez Fringe prowadzi do zróżnicowanej aktywacji przez dwie klasy ligandów – hamowania sygnałów inicjowanych przez Jagged/Serrate i aktywacji sygnału inicjowanego przez Delta. Tak więc, o ile początkowa modyfikacja przez fukozę jest konieczna do sygnalizacji indukowanej przez wszystkie ligandy, o tyle modyfikacje realizowane przez białka Fringe modulują odpowiedź Notch na działanie poszczególnych ligandów. Główne zdarzenia następujące w trakcie transdukcji sygnału przez receptory Notch są prawie identyczne, poczynając od muszki owocowej, na człowieku kończąc. Receptory Notch aktywowane są na drodze jukstakrynej, a wydajna interakcja ligand–receptor zależy od stopnia glikozylacji receptora. Aktywacja przez swoiste ligandy powoduje serię cięć proteolitycznych wewnątrzkomórkowej części receptora (Rys. 2.20). Pierwsze jest cięcie proteolityczne w miejscu P2 przez metaloproteiny z rodziny ADAM (zob. rozdział 2.2.8). Zewnątrzkomórkowa część Notch ulega transendocytozie do komórek wysyłających sygnał, a fragment (NEXT) zakotwiczony w błonie komórek odbiorczych jest rozpoznawany przez składnik kompleksu γ -sekreazy (aminopeptydazę nikastryny NCT) i przenoszony do całego kompleksu (PS, NCT, PEN2, APH1). γ -sekreaza rozcina NEXT w miejscu P3, uwalniając peptyd NICD (ang. *Notch intracellular*



Rys. 2.20. Mechanizm transdukcji sygnału przez receptor Notch

domain), który ulega translokacji do jądra komórkowego. Działanie γ -sekretazy może następować zarówno przy błonie komórkowej, jak i w endosomach, prawdopodobnie po monoubikwitynacji.

W najbardziej ogólnym zarysie aktywacja procesu transkrypcji przebiega w kilku etapach. W nieobecności NICD białko wiążące DNA (CSL) asocjuje z białkami korepresorowymi (Co-R): SMRT (ang. *silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*), CIR (ang. *CBF1-interacting corepressor*), Hairless, SHAPR (ang. *SMRT/HADAC-1-associated protein*) i deacetylazami histonów (HDACs), hamując transkrypcję. Po wniknięciu NICD do jądra wiąże się ono z CSL, powodując zmiany konformacyjne, które ułatwiają przemieszczenie represorów transkrypcji. Struktura NICD/CSL jest rozpoznawana przez białko Mastermind (MAM) i ten trójskładnikowy kompleks przyłącza koaktywatory transkrypcji (Co-A), takie jak: acetylazy histonów PCAF/GCN5 i CBP/p300 oraz podstawowe czynniki transkrypcyjne HES należące do rodziny helix–loop–helix.

Wiele mechanizmów kontroluje stały poziom receptorów Notch w błonie komórkowej. Po pierwsze, może to być regulacja procesu endocytozy receptorów. Przykładem jest stymulowana białkami Numb/AP2/NAK endocytoza i degradacja białek Notch. Po drugie, ligazy ubikwityny E3 (Deltx, Nedd4, Su(Dx)Hch) mogą kierować receptory Notch na drogę degradacji lub recykliczacji. Po trzecie, niektóre białka (LDG, ESCRT) mogą kompleksować receptory Notch i utrzymywać je w stanie nieaktywnym.

2.2.8. Receptory rozpuszczalne

Niektóre hormony peptydowe mają także receptory niezwiązane z błoną komórkową, występujące w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych tkanek i w płynach fizjologicznych. Receptory takie powstają przez proteolityczne odszczepienie części akceptorowej receptorów błonowych. Enzymami, które uczestniczą w powstawaniu rozpuszczalnych form receptorów błonowych, są metaloproteinazy z rodziny ADAM i/lub sekretazy. Te pierwsze to transbłonowe białka o aktywności cynkowo zależnych metaloproteinaz, określane skrótem ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*). Są to typowe białka mozaikowe zbudowane z sześciu domen; sekwencji sygnałowej, sekwencji pro-, domeny katalitycznej, domeny dezintegrynowej, domeny bogatej w reszty cysteiny, domeny EGF-podobnej oraz domeny cytoplazmatycznej, zaangażowanej w wewnątrzkomórkowy przekaz sygnału. Występują w bardzo wielu tkankach zwierzęcych i ludzkich, takich jak: mózg, jądra, jajniki, piersi, łożysko, wątroba, serce, płuca, kości i mięśnie. Fizjologiczna rola dezintegryn z grupy ADAM jest jeszcze nieznaną, aczkolwiek przypuszczalnie białka te mogą uczestniczyć w takich procesach, jak: proteoliza, adhezja komórkowa, fuzja i sygnalizacja wewnątrzkomórkowa. Szczególnie interesująca wydaje się zdolność niektórych enzymów tej grupy do uwalniania rozpuszczalnych form czynników wzrostowych i cytokin z ich form transbłonowych.

Z wielu białek transbłonowych pełniących funkcje receptorów mogą być odcięte proteolitycznie fragmenty zewnątrzkomórkowe. Przykładowo, rozpuszczalne formy: TNF i RANKL są wycinane działaniem metaloproteinaz z rodziny ADAM, CD95L – działaniem matrylizyny, a EDA, TWEAK, APRIL, BAFF – działaniem proteaz z rodziny furyn. Znane są rozpuszczalne formy receptorów czynnika martwicy nowotworu/limfotoksyny α (TNF/Lt α) o m.c. 30 kDa i 40 kDa, których sekwencja aminokwasowa jest identyczna z zewnątrzkomórkową częścią receptorów błonowych p55 i p75. Receptory te pełnią niezwykle istotną rolę w regulacji aktywności TNF i Lt α . Przede wszystkim stabilizują aktywną (trimeryczną) formę ligandów i wydłużają ich okres półtrwania w krążeniu (dla TNF z 6 minut do 6 godzin). Są białkami przenoszącymi ligandy pomiędzy różnymi tkankami organizmu. Stanowią swoisty rezerwuuar aktywnych form TNF/Lt α , z którego cytokiny te mogą być uwalniane w sposób kontrolowany. Wreszcie receptory te obniżają aktywność TNF/Lt α przez wiązanie ich nadmiaru.

Znanych jest także wiele rozpuszczalnych form receptorów innych cytokin, tworzących z ligandami swoiste kompleksy, mogące generować sygnał przez niekompletne receptory. Przykładowo, receptor IL-6 zbudowany jest z podjednostki α i dwóch cząsteczek białka gp130. Udowodniono doświadczalnie, że kompleks IL-6 z rozpuszczalnym receptorem α może indukować sygnał w komórkach, w których ekspresji ulega wyłącznie podjednostka gp130, a na które sama IL-6 nie działa. Podobny funkcjonalnie kompleks cytokiny z jej rozpuszczalnym receptorem tworzy IL-11. Innym przykładem może być IL-12, która jest heterodimerem zbudowanym z podjednostki p35 (właściwa cytokina) i podjednostki p40, będącej rozpuszczalną formą receptora tej cytokiny. Na tej podstawie T. Hirano zaproponował nowy mechanizm działania cytokin i czynników wzrostowych, który nazwał „modelem konwersji

receptora”, w którym kompleks ligand–rozpuszczalny receptor posiada swoistość działania odmienną od swoistości samej cytokiny. Zdolność do oddziaływania tej samej cytokiny (czynnika wzrostowego) z różnymi formami cząsteczkowymi jej receptora jest jednym z elementów decydujących o funkcjonalnej plejotropii cytokin i czynników wzrostowych.

2.2.9. Koreceptory

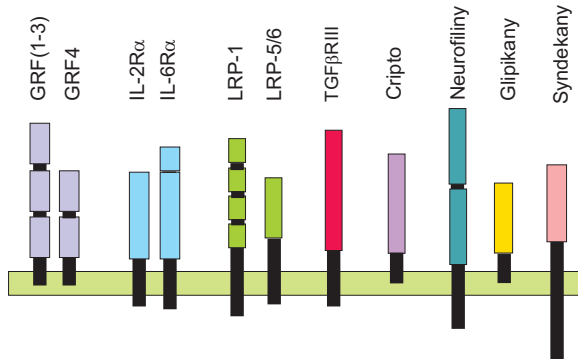
Niektóre ligandy do wykazania pełnej i specyficznej odpowiedzi komórki wymagają oprócz swoistych receptorów obecności dodatkowych białek, ulokowanych w błonie komórkowej, określanych mianem koreceptorów. Nazwa koreceptor (lub receptor pomocniczy) jest używana w piśmiennictwie biochemicznym i medycznym w celu określenia białek lub proteoglikanów błonowych, które same nie przenoszą sygnału zewnątrzkomórkowego przez błonę komórkową. Zgodnie z ogólnie przyjętą definicją koreceptor wiąże rozpuszczalne ligandy zewnątrzkomórkowe, tworzy kompleksy ligand–koreceptor–receptor, reguluje powinowactwo liganda do właściwego receptora i siłę sygnału. W odróżnieniu od pojęcia koreceptor używanego w immunologii w stosunku do tzw. drugiego receptora (np. chemokin), który umożliwia wnikanie patogenów, czy do wiązania peptydów antygenowych (np. CD4, CD8), koreceptory omawiane w niniejszym rozdziale są cząsteczkami współpracującymi z receptorami przekazującymi sygnał od ligandów rozpuszczalnych. Wyróżnia się co najmniej osiem rodzin tego typu koreceptorów (Rys. 2.21): receptory neurotrofin z rodziny GDNF (GFE α 1–4), koreceptory niektórych interleukin (IL-2R α , IL-3R α , IL-5R α , IL-6R α , IL-11R α , IL-15R α , GM-CSR α i CNTFR α), białka podobne do receptorów LDL (LRP-1, LRP-5 i LRP-6), koreceptory TGF β (endogлина, TGF β RIII), cripto i neurofiliny (1–2), glipikany (1–6), syndekey (1–4).

Na istotną fizjologicznie rolę koreceptorów wskazują następujące fakty:

- a) są cząsteczkami konserwatywnymi ewolucyjnie, a ich obecność stwierdzono w wielu organizmach zwierzęcych, poczynając od muszki owocowej, na człowieku kończąc;
- b) występują powszechnie w błonach komórkowych, często w liczbie większej od ich klasycznych partnerów;
- c) są wykorzystywane przez wielofunkcyjne ligandy, takie jak: TGF β , FGF, VEGF, EGF, neurotrofiny;
- d) stwierdzono liczne mutacje i/lub zmieniony ich poziom w wielu stanach chorobowych.

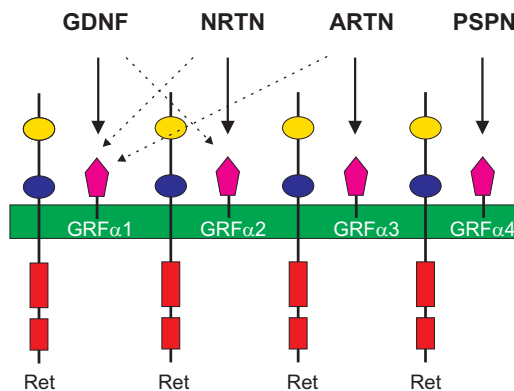
Typowymi przykładami ligandów angażujących koreceptory są niektóre polipeptydy zaliczane do czynników wzrostowych, takie jak fibroblastyczne czynniki wzrostowe (FGFs) czy neurotrofiny z rodziny glejopochodnego czynnika neurotroficznego (GDNF).

Czynniki wzrostowe zaliczane do rodziny FGF (podobnie jak niektóre czynniki EGF-podobne) oddziałują z sulfonowanymi domenami cząsteczek siarczanu heparanu (HS) powierzchni komórek docelowych, przyłączonymi do części białkowej



Rys. 2.21. Schemat budowy głównych ośmiu typów koreceptorów: GRF – koreceptory GDNF, IL-R – receptor interleukiny, LRP – podobne do receptorów LDL, TGFβRIII – receptor III TGFβ, cripto – koreceptor TGFβR, neurofiliny – koreceptory VEGF (głównie VEGF165), glipikany, syndekany – koreceptory o budowie proteoglikanów

proteoglikanów (HSPG). Koreceptory o budowie proteoglikanów występują powszechnie w błonach komórkowych ssaków i dzielą się na dwie rodziny: syndykany (który mogą tworzyć 4 różne białka transbłonowe o m.c.z. 20–35 kDa) i glipikany (białka powierzchniowe, o m.c.z. 64 kDa, zakotwiczone w błonie przez glikozylofosfatydyloinozytol). HS są glikozaminoglikanami zbudowanymi z N-acetylowanej lub N-sulfonowanej glukozoaminy (GlcNAc lub GlcNSO₃) i kwasu glukuronowego (GlcA) lub jego 5-epimeru, kwasu iduronowego (IdoA). HS różnią się długością łańcucha i zawierają od 50 do 150 jednostek disacharydowych powiązanych wiązaniami α1–4. Zbudowane są segmentowo i w każdym z nich wyróżnia się segmenty



Rys. 2.22. Swoistość wiązania neurotrofin z rodziny GDNF przez poszczególne koreceptory (GRF α) współdziałające z receptorem Ret. ● – domena bogata w cysteinę, ● – domena kadherynopodobna, ■ – domena kinazy tyrozynowej

o wysokim powinowactwie do FGFs. HS występują również w formie związanej kowalencyjnie z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (perlekan, agryna). Fibroblastyczne czynniki wzrostowe mogą także oddziaływać z heparyną, wysoko sulfonowanym polisacharydem, podobnym strukturalnie do siarczanu heparanu i naśladującym jego działanie biologiczne. Heparyna jest jednak syntetyzowana wyłącznie przez komórki tłuszczne tkanki łącznej, a proteoglikany występują praktycznie we wszystkich tkankach jako składniki macierzy zewnątrzkomórkowej lub błon komórkowych. HS zabezpieczają FGFs przed inaktywacją termiczną (bo receptory FGFs to białka termolabilne) i przed proteolizą, a związane z białkami macierzy stanowią zewnątrzkomórkowy rezerwuar FGFs. W nieobecności HS fibroblastyczne czynniki wzrostowe mogą aktywować receptory, lecz tylko w wysokich (niefizjologicznych) stężeniach, a w większości badanych komórek FGFs nie stymulują lub słabo stymulują wzrost komórkowy. Dodanie egzogenego HS do FGFs w stężeniach fizjologicznych podnosi skuteczność działania tych ostatnich 2–3-krotnie. Ustalono, że w przypadku FGF1 i FGF2 powstaje kompleks czynnik wzrostowy–receptor–koreceptor o stechiometrii 2: 2: 1. Udowodniono także, że HS mogą wpływać na swoistość wiązania FGF–FGFR w zależności od struktury ich domen zawierających grupy sulfonowe. Udział HS w kostymulacji wzrostu mógł wynikać ze stabilizacji wiązania kompleksów ligand–receptor, ułatwiania dimeryzacji ligandów (co umożliwia autofosforylację receptorów FGFs) lub stymulacji internalizacji kompleksów ligand–receptor (co przyspiesza oddziaływanie z receptorami niektórych FGFs zlokalizowanymi w błonie jądrowej). Pierwsze dwie hipotezy nie znalazły wystarczającego potwierdzenia doświadczalnego. Chociaż wykazano, że HSPGs powodują internalizację FGF2, prawdopodobnie jako wynik konstytutywnej endocytozy i obrotu HSPGs. Badania *in vitro* pokazały, że stężenia HS i FGFs niezbędne do efektywnej dimeryzacji ligandów znacznie przekraczają stężenie fizjologiczne tych związków, co praktycznie wyklucza hipotezę o udziale HS w dimeryzacji FGFs. Sugerowano także, że oligosacharyd (HS) krótszy od oktameru nie wiąże krzyżowo liganda i receptora. Także te stwierdzenia okazały się nieprawdziwe, albowiem ujawniono, że różne kompleksy FGF–FGFR wymagają HS o odmiennej strukturze. Przykładowo, oligosacharydy krótsze od oktamerów aktywowały kompleksy FGF1–FGFR2IIIb i FGF1–FGFR4, natomiast tworzenie i aktywację kompleksów FGF1–FGFR1 i FGF7–FGFR2 wymagało obecności znacznie dłuższych polisacharydów. Te zróżnicowane wymagania co do struktury HS odzwierciedlają różnice w sposobie, w jaki domeny receptorów FGFR oddziałują z różnymi glikozaminoglikanami. Natomiast trzecia hipoteza wydaje się aktualna. W odróżnieniu od większości białek o aktywności hormonalnej, w tym także czynników wzrostowych, odpowiedź mitogenna komórek na działanie FGFs (niemających sekwencji sygnałowej) jest prawdopodobnie związana z obecnością receptorów FGFs w błonie osłonki jądrowej. Wykazano, że zarówno FGF1, jak i FGF2 są obecne we frakcji jądrowej. Ustalono także, że efekt egzogenego FGF1 wymaga przeniesienia do jądra i związania z receptorem o wysokim powinowactwie. Zdolność ta jest uzależniona od specyficznej sekwencji FGF1, ułożonej w pobliżu N-końca łańcucha FGF1. Nie wiadomo, czy jądrowe receptory FGFs są homologiczne do błonowych. Wydaje się mało prawdopodobne, aby miały wewnątrzjądrową strukturę identyczną z receptorami błonowymi. Czy aktywność kinazy tyrozynowej

w obrębie jądra mogłaby pełnić identyczną lub podobną rolę jak w cytoplazmie? Wątpliwe, chociaż niewykluczone. Wyniki wielu doświadczeń wskazują, że HSPGs mogą regulować internalizację i obróbkę FGFs. Co więcej, wydaje się prawdopodobne, że HSPGs przyspieszają jądrową lokalizację i hamują wewnątrzkomórkową degradację FGF2. Do dzisiaj jednak nie wiadomo, które z wymienionych funkcji biologicznych HSPG mają znaczenie fizjologiczne.

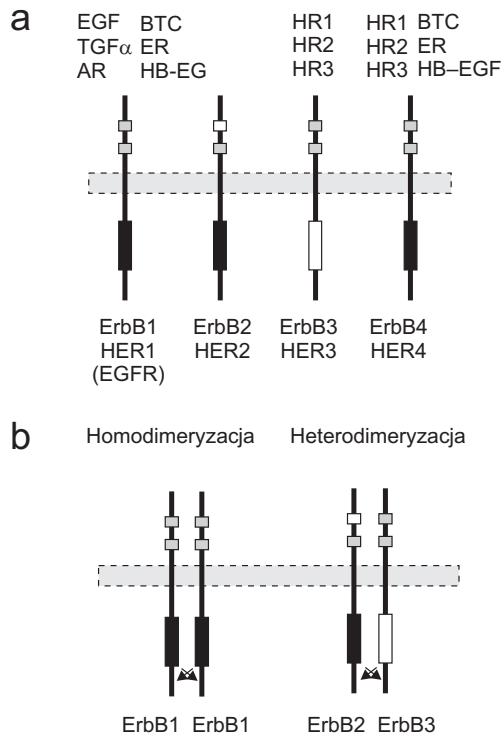
Właściwym receptorem czynników z rodziny GDNF jest kinaza Ret, a koreceptorami są cząsteczki GRF (ang. *GDNF receptor family*), które są białkami powierzchniowymi, zakotwiczonymi w błonie komórkowej resztą glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI). Znane są cztery takie koreceptory: GRF α (1–4), oddziałujące preferencyjnie, odpowiednio z glejopochodnym czynnikiem wzrostu (GDNF), neurytyną (NRTN), arteminą (ARTN) i persefiną (PSPN) (Rys. 2.22). GFR α 1–GFR α 3 zwierają trzy (a GRF α 2 cztery) domeny bogate w cysteinę połączone giętkimi odciwkami łącznikowymi. Ssaczy GFR α 4 różni się strukturalnie od pozostałych, jest mniejszy i nie posiada N-końcowej domeny cysteinowej. Przyjmuje się, że kilkufazowy etap aktywacji kinazy Ret wymaga kolejno: a) związania czynnika wzrostowego z koreceptorem (może to indukować sygnał niezależny od Ret), b) związania kompleksu GF–GRF z Ret, inicjującego dimeryzację i autofosforylację receptorów, c) aktywacji kinazy Ret, która inicjuje (podobnie jak w przypadku innych RTK) różne drogi przekazania sygnału wewnątrzkomórkowego (m.in. stymulację kaskady kinaz MAP i PI3K). Obecnie przyjmuje się dwa alternatywne modele współdziałania kompleksów ligand, GFR α i Ret. Jeden zakłada, że ligand wiąże się do GFR α i tak powstały kompleks aktywuje Ret. Drugi przyjmuje, że Ret i GFR α występują w błonie komórkowej w postaci kompleksu, do którego przyłącza się ligand. Istotną rolę w aktywacji kompleksu receptorowego odgrywają jony wapnia, których związanie z domeną kadherynopodobną Ret jest niezbędne do aktywacji receptora.

2.2.10. Rozmowa receptorów

Jednym z kluczowych mechanizmów kontrolujących przekaz sygnału przez receptory błonowe jest wymiana informacji między ich efektorowymi fragmentami, określana w piśmiennictwie anglojęzycznym jako *cross-talk*. Pod pojęciem „rozmowa receptorów” można rozumieć przynajmniej trzy rodzaje oddziaływań integrujących różne drogi sygnalizacji wewnątrzkomórkowej: heterooligomeryzację różnych receptorów tej samej rodziny ligandów, bezpośrednie oddziaływania pomiędzy różnego typu receptorami oraz modulowanie aktywności receptorowej różnych ligandów poprzez związki pośredniczące w przekazie sygnału.

Możliwość pierwszą najlepiej pokazać na przykładzie receptorów rodziny epidermalnego czynnika wzrostowego (ErbB1–ErbB4). Należy wyraźnie powiedzieć, że oddziaływanie pojedynczej cząsteczki tego typu hormonów z pojedynczą cząsteczką receptora jest raczej wyjątkiem niż regułą. W rzeczywistości mamy zazwyczaj do czynienia z interakcją rodziny podobnych strukturalnie ligandów z rodziną receptorów o podobnej budowie chemicznej. Oligomeryczna struktura zaktywowanych receptorów pozwala na tworzenie zarówno homo-, jak i heterodimerów, które mogą mieć

różny potencjał sygnalizacyjny. Przykładem takich oddziaływań jest interakcja ligandów zaliczanych do rodziny epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF) z rodziną receptorów ErbB. Podstawowe znaczenie dla specyficzności przekazywania sygnału inicjowanego jednym ligandem ma zdolność ErbB do tworzenia homo- i heterodimerów. Poszczególne receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych różnią się zarówno aktywnością kinazową (ErbB3 mają upośledzoną aktywność kinazową), jak i swoistością wiązania przedstawicieli tej rodziny czynników wzrostowych. Niektóre receptory EGF wiążą większość ligandów omawianej grupy polipeptydów, inne tylko wybrane. Szczególnym przypadkiem jest ErbB2 odkryty jako receptor swoisty dla neuregulin/heregulin. Okazało się jednak, że receptor ten pośredniczy w działaniu EGF-podobnych czynników wzrostowych tylko pośrednio, poprzez heterodimeryzację z innymi białkami ErbB. W roku 1998 E. Tzahar i Y. Yarden zaproponowali biwalencyjny model interakcji ErbBs–EGFs. Zgodnie z tą hipotezą każdy z EGF-podobnych czynników wzrostowych ma dwa miejsca wiążące receptor. Jedno miejsce wiąże receptor o niskim powinowactwie (np. ErbB2), a drugie receptor o wysokim powinowactwie (ErbB1, ErbB3 lub ErbB4). Trudno dziś powiedzieć, czy hipoteza



Rys. 2.23. Rodzina receptorów ErbB. Aktywność kinazowa i wybiórcze wiązanie EGF-podobnych czynników wzrostowych (a), homo- i heterodimeryzacja receptorów ErbB (b). Objasnienia w tekście

ta jest prawdziwa. Faktem jest, że homodimery ErbB2–ErbB2 i ErbB3–ErbB3 nie uczestniczą w przekazywaniu sygnału indukowanego EGFs, natomiast heterodimery zawierające ErbB2 i/lub ErbB3 pośredniczą w działaniu większości EGFs. Swoistość wiązania EGF-podobnych czynników wzrostowych oraz przykłady homo- i heterodimerizacji receptorów należących do rodziny ErbB przedstawia rysunek 2.23. Istotnym problemem w wyjaśnieniu mechanizmu sygnalizacji transbłonowej jest swoistość odpowiedzi komórkowej na działanie różnych ligandów EGF-podobnych. Wiadomo, że różne czynniki wzrostowe działające przez ten sam receptor mogą inicjować odmienne drogi przekazu sygnału. Z drugiej strony ten sam ligand może stymulować odmienną odpowiedź biologiczną w zależności od typu receptora, przez który działa. Niezależnie od składu utworzonego heterodimeru każdy z tych kompleksów ma różny zestaw miejsc ulegających autofosforylacji, co pozwala na przyłączanie do nich odmiennych białek mających domeny SH2 i/lub PTB. Wielość ligandów z rodziny EGF i tworzenie heterodimerów pomiędzy różnymi receptorami ErbB wyjaśniają przynajmniej w części obserwowane różnice w odpowiedzi komórkowej indukowanej przez poszczególne czynniki wzrostowe EGF-podobne.

Przykładami bezpośrednich oddziaływań części efektorowych receptorów błonowych mogą być: oddziaływanie cytoplazmatycznej części GABA_A (receptor jonotropowy bramkowany ligandem) z C-końcowym fragmentem receptora D5 dopaminy (receptor R7G), oddziaływanie receptorów Trk (receptory o aktywności kinazy tyrozynowej neurotrofin) z kanałem Na⁺ (receptor jonotropowy), czy fosforylacja receptora erytropoetyny (receptor cytokin) przez receptor Kit (receptor czynnika SCF o aktywności KT). Każda z tych interakcji ma inne znaczenie biologiczne. Pierwsza hamuje aktywność obu receptorów i ilustruje mechanizm, w którym receptory R7G mogą regulować przekaz synaptyczny niezależnie od udziału białek G. Druga wskazuje na udział neurotrofin w regulacji potencjału transbłonowego komórek układu nerwowego. Trzecia dowodzi współdziałania między receptorami w regulacji różnicowania komórek krwi.

Ostatnią z wymienionych możliwości jest pośrednia transmodulacja receptorów. Znamy już wiele przykładów takiej sygnalizacji transreceptorowej, obejmujących praktycznie wszystkie typy receptorów błonowych i wewnątrzkomórkowych. Ogólny model takiej rozmowy receptorów został zaproponowany przez P.O. Hackela i wsp. na przykładzie transmodulacji receptora epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF) przez receptory związane z białkami G (pośrednio przez kinazę białkową C), przez receptory cytokin (za pośrednictwem kinaz Jak) i przez receptory jonotropowe (poprzez zmianę poziomu cytoplazmatycznego określonych jonów). Szczególnym przypadkiem transmodulacji aktywności receptorowej jest hamowanie aktywności transkrypcyjnej AP-1 i NF-κB (czynniki transkrypcyjne) przez receptory jądrowe hormonów steroidowych, także o charakterze czynników transkrypcyjnych i *vice versa*. Chociaż bardzo wiele jest jeszcze niejasności, nie ulega wątpliwości, że rozmowa receptorów i bezpośrednie oddziaływania na dalszych etapach przekazywania sygnału stanowią podstawę zrozumienia ogromnego zróżnicowania odpowiedzi komórkowej na działanie ligandów zewnątrzkomórkowych.

Literatura uzupełniająca

- Aplin A.E., Howe A.K., Juliano R.L. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999, 11, 737–744.
- Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998, 281, 1305–1308.
- Biggins J.B., Koh J.T. Chemical biology of steroid and nuclear hormone receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007, 11, 99–110.
- Blair S.S. Notch signaling: Fringe really is a glycosyltransferase. *Curr. Biol.* 2000, 10, R608–R612.
- Bockaert J, Pin J.P, Molecular tinkering of G-protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999, 18, 1723–1729.
- Bogdan S, Klamt C. Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr. Biol.* 2001, 11, R292–R295.
- Bray S.J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, 678–689.
- Carpenter G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *BioEssay* 2000, 22, 697–707.
- Clarke D., Liu X. Decoding the quantitative nature of TGF- β /Smad signaling. *Trends. Cell Biol.* 2008, 18, 430–442.
- Cooper D.R., Hanson–Painton O. Protein kinases: receptors of external signals. *J. Clin. Ligand Assay* 2000, 23, 50–56.
- Delmas P. SnapShot: ion channels and pain. *Cell* 2008, 134, 366–366e1.
- Ensslen-Craig S.E., Brady-Kalnay S.M. Receptor protein tyrosine phosphatases regulate neuronal development and axon guidance. *Dev. Biol.* 2004, 275, 12–22.
- Ehebauer M., Hayward P., Martinez-Arias A. Notch signaling pathway. *Sci STKE* 2006, cm7.
- Florio T. Somatostatin/somatostatin receptor signaling: phosphotyrosine phosphatases. *Mol. Cell Endocrinol.* 2008, 286, 40–48.
- Folgering J.H.A., Sharif-Naeini R., Dedman A., Patel A., Delmas P., Honore E. Molecular basis of the mammalian pressure-sensitive ion channels: focus on vascular mechanotransduction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2008, 97, 180–195.
- Giancotti F.G., Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999, 285, 1028–1032.
- Gottlicher M., Heck S., Herrlich P. Transcriptional *cross-talk*, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.* 1998, 76, 480–489.
- Hackel P.O., Zwick E., Prenzel N., Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999, 11, 184–189.
- Herbert S.C. General principles of the structure of ion channels. *Am. J. Med.* 1998, 104, 87–98.
- Hirano T. Molecular basis underlying functional pleiotropy of cytokines and growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 260, 303–308.
- Hubbard S.R., Miller W.T. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007, 19, 117–123.
- Humphries M.J. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. *TiPS* 2000, 21, 29–32.
- Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002, 110, 673–687.
- Ilagan X.G, Kopan R. SnapShot: Notch signaling pathway. *Cell* 2007, 128, 1246–1246.e1.
- Itoh S., Ten Dijke P. Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007, 19, 178–184.
- Jacob A.L., Snyder J.P., Traynelis S.F., Wyllie D.J.A. Structural features of the glutamate binding site in recombinant NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors determined by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Mol. Pharmacol.* 2005, 67, 1470–1484.

- Kampa M., Castans E. Membrane steroid receptor signaling in normal and neoplastic cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006, 246, 76–82.
- Kasuga K., Kaneko H., Nishizawa M., Onodera O., Ikeuchi T. Generation of intracellular domain of insulin receptor tyrosine kinase by γ -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 360, 90–96.
- Kawai T., Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 2007, 13, 460–469.
- Keramidas A., Moorhouse A.J., Schofield P.R., Barry P.H. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004, 86, 161–204.
- Kirkbridgette K.C., Ray B.N., Blobel G.C. Cell-surface co-receptors: emerging roles in signaling and human disease. *Trends Biochem. Sci.* 2005, 30, 611–621.
- Kobilka B.K. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1768, 794–807.
- Kordowiak A.M. Mechanizmy sortowania i kierowania materiału w rejonie aparatu Golgiego do innych przedziałów komórkowych. [w:] Aparat Golgiego. Rola tej organelli w komórce. Red. W. Bulsza. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2001, 49–84.
- Kourie J.I., Rive M.J. Role of natriuretic peptides in ion transport mechanisms. *Med. Res. Rev.* 1999, 19, 75–94.
- Kovall R.A. Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together an active transcription complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007, 17, 117–127.
- Kuwano K., Hara N. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000, 22, 147–149.
- Kwiatkowska D., Kwiatkowska-Korczak J. Heterodimeryczne receptory jądrowe. I. Receptory witamin i hormonów. *Post. Biochem.* 2000, 46, 115–124.
- Kwiatkowska-Korczak J., Kwiatkowska D. Heterodimeryczne receptory jądrowe. II. Regulacja przemiany kwasów tłuszczowych i steroidów. *Post. Biochem.* 2000, 46, 125–129.
- Le Borgne R. Regulation of Notch signaling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006, 18, 213–222.
- Le Roy C., Wrana J.L. Clathrin- and non-clathrin mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, 2, 112–126.
- Leaf E.B. Growth factor receptor signalling: location, location, location. *Trends Cell Biol.* 2000, 10, 343–348.
- Liu Y., Wong T.P., Aarts M., et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.* 2007, 27, 2846–2857.
- Martin M.U., Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1592, 265–280.
- Meighan C.M., Schwarzbauer J.E. Temporal and spatial regulation of integrins during development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008, 20, 520–524.
- Miączyńska M., Pelkmans L., Zerial M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004, 16, 400–406.
- Miyazono K., Ten Dijke P., Heldin C.-K. TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* 2000, 75, 115–157.
- Nam Y., Aster J.C., Blacklow S.C. Notch signaling as a therapeutic target. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002, 6, 501–509.
- Nichols B.J., Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 2001, 11, 406–412.
- O'Neill L.A.J. TAMpering with Toll-like receptor signaling. *Cell* 2007, 131, 1039–1041.
- Ohishi K., Katayama N., Shiku H., Varnum-Finney B., Bernstein I.D. Notch signaling in hematopoiesis. *Semin. Cell Devel. Biol.* 2003, 14, 143–150.
- Olayioye M.A., Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000, 19, 3159–3167.

- Pawson T., Nash P. Protein–protein interactions define specificity in signal transduction. *Gens Develop.* 2000, 14, 1027–1047
- Piek E., Heldin C.-H., Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J.* 1999, 13, 2105–2124.
- Qiu Ch., Tarrant M.K., Choi S.H. et al. Mechanism of activation and inhibition of the HER4/ErbB4 kinase. *Structure* 2008, 16, 460–467.
- Rachez Ch., Freedman L.P. Mediator complexes and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001, 13, 274–280.
- Renaud J.P., Moras D. Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol. Life Sci.* 2000, 57, 1748–1769.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000, 103, 211–225.
- Schlessinger J., Lemmon M.A. Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first Robin of spring. *Cell* 2006, 127, 45–48.
- Schulz D.J., Temporal S., Barry D.M., Garcia M.L. Mechanisms of voltage-gated ion channel regulation: from gene expression to localization. *Cell Mol. Life. Sci.* 2008, 65, 2215–2231.
- Schweisguth F. Regulation of notch signaling activity. *Curr. Biol.* 2004, 14, R129–R138.
- Stephenson F.A. Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 2006, 34, 877–881.
- Subramanian S., Stansberg C., Cunningham C. The interleukin 1 receptor family. *Dev. Comp. Immunol.* 2004, 28, 415–428.
- Tkaczyk M., Kalita K. Receptor estrogenowy β – budowa, regulacja i funkcja. *Post. Biochem.* 2001, 47, 72–79.
- Toppiari J., Kaleva M., Virtanen H.E., Main K.M., Skakkebaek N.E. Luteizing hormone in testicular descent. *Mol. Cell Endocrinol.* 2007, 269, 34–37.
- Treisman R., Gorlich D. Nucleus and gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001, 13, 261–262.
- Tzahar E., Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochem. Biophys. Acta* 1998, 1377, M25–M37.
- Uings I.J., Farrow S.N. Cell receptors and cell signalling. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 2000, 53, 295–299.
- Wajant H., Gerspach J., Pfizenmaier K. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005, 16, 55–76.
- Weiner H.L., Zagzag D. Growth factor receptor tyrosine kinases: Cell adhesion kinase family suggests a novel signaling mechanism in cancer. *Cancer Invest.* 2000, 18, 544–554.
- West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S. Recognition and signaling by Toll-like receptors. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006, 22, 409–437.
- Wieduwilt M.J., Moasser M.M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol. Life. Sci.* 2008, 65, 1566–1584.
- Wiley HS, Burke PM. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* 2001, 2, 12–18.
- Wilkin M.B., Baron M. Endocytic regulation of Notch activation and down-regulation. *Mol. Membr. Biol.* 2005, 22, 279–289.
- Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand–receptor binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2004, 14, 154–160.
- Zhang X., Gureasko J., Shen K., Cole P.A., Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006, 125, 1137–1149.

3. Białka adaptorowe, kotwiczące i dokujące

Różnorodność informacji niesionej przez cząsteczki sygnałowe, mnogość cząsteczek receptorowych i skomplikowane drogi sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, a może przede wszystkim ograniczony zasób wiadomości potwierdzonych doświadczalnie powodują, iż nie sposób wyczerpująco omówić wszystkie grupy związków pośredniczących w transmisji sygnału wewnątrzkomórkowego. Dlatego omówione poniżej białka są arbitralnym wyborem tych cząsteczek, których udział w odpowiedzi komórki na sygnał zewnątrzkomórkowy jest w miarę dobrze udokumentowany.

W wewnątrzkomórkowy przekaz sygnału zaangażowanych jest wiele białek, tworzących poszczególne ogniwa łańcucha transmisyjnego. Ze względu na odmienną funkcję pełnioną przez poszczególne grupy białek w przeniesieniu sygnału wyróżnia się białka: adaptorowe (ang. *adaptor proteins*), kotwiczące (ang. *anchoring proteins*) oraz białka wiążące równocześnie wiele ligandów białkowych, tzw. białka dokujące (ang. *scaffolding proteins*).

Białka adaptorowe (łącznikowe) to białka uczestniczące w przekazaniu sygnału z jednego ogniwa łańcucha na drugie, mające domeny mogące wiązać co najmniej dwa różne rodzaje białek sygnałowych. W szerokim znaczeniu białka kotwiczące to polipeptydy mające przynajmniej jedną domenę umożliwiającą im zakotwiczenie na określonej strukturze innych białek (lub fosfolipidów). Nazwą „białka kotwiczące” określa się także małą grupę białek występującą w zagęszczeniach postsynaptycznych. Białka dokujące spełniają funkcję specyficznych portów dla wielu polipeptydów współdziałających z sobą na określonym etapie przekazania sygnału wewnątrzkomórkowego.

Wszystkie tego typu białka mają charakterystyczne domeny, umożliwiające im połączenie z określonymi sekwencjami aminokwasowymi innych białek.

3.1. Domeny białkowe

Odpowiedź komórki na sygnały zewnątrzkomórkowe, jak i przekaz sygnałów wewnątrzkomórkowych są realizowane i koordynowane przez swoiste oddziaływania międzycząsteczkowe, głównie białko–białko, białko–fosfolipid i białko–DNA. Podstawową rolę w tych oddziaływaniach grają konserwatywne ewolucyjnie regiony białek, określane mianem domen białkowych. Takie moduły białkowe zostały wykształcone w procesie ewolucji i służą do rozpoznawania odpowiednich determinant, eksponowanych na ich partnerach molekularnych. Wykorzystanie dopasowania tego typu oddziaływań może pośredniczyć w regulacji różnorodnych procesów biochemicznych i integrować wiele różnych szlaków przekazywania sygnału. Obecność kilku domen w jednej cząsteczce białka, jak to zachodzi w białkach

adaptorowych i kotwiczących lub w białkach tworzących rusztowania, pozwalające na równoczesne wiązanie wielu ligandów białkowych (białka dokujące), umożliwia funkcjonalną integrację związków uczestniczących w przekazie sygnału zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego.

Dzisiaj znamy wiele domen białkowych odpowiedzialnych za interakcje międzycząsteczkowe homo- i heterologiczne, zbudowanych z 40–200 reszt aminokwasowych. Domeny te można podzielić na takie, które rozpoznają krótkie 4–10-aminokwasowe sekwencje (SH2, PTB, SH3, WW, EH, EVH, PDZ) lub są odpowiedzialne za specyficzne oddziaływania międziodomenowe (PDZ, DD, DED, TRAF). W niektórych przypadkach wiązanie określonej domeny do takich sekwencji wymaga wcześniejszej ich fosforylacji na resztach tyrozyny, seryny lub treoniny. Znane są także domeny białkowe wiążące swoiście substraty niebiałkowe. Przykładem są domeny PH, FYVE i PX wiążące fosfolipidy (głównie fosfatydyloinozytydy), odpowiedzialne za przybłonową lokalizację wielu białek i/lub łączenie poszczególnych etapów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Inną grupę stanowią domeny pośredniczące w interakcji białko–DNA, takie jak motywy: palca cynkowego, zamka leucynowego (może także uczestniczyć w dimeryzacji cząsteczek białkowych) czy helisa–skręt–helisa.

Znanych jest wiele domen białkowych odpowiedzialnych za rozpoznanie i wiązanie do krótkich sekwencji aminokwasowych innych białek. Historycznie pierwszą taką domeną białkową, której przypisano udział w interakcji białko–białko, była domena SH2 (ang. *Src homology 2*), opisana pod koniec lat 80. przez Tony'ego Pawsona, jako homologiczna sekwencja występująca w kinazach tyrozynowych niereceptorowych. Domeny SH2 występują w wielu białkach cytoplazmatycznych i jądrowych, mają zdolność swoistego wiązania ufosforylowanej tyrozyny, a przez to zdolność do wiązania różnych fosfoprotein. Powinowactwo domen SH2 do peptydów zawierających fosfotyrozynę (pY) jest około 1000 razy większe niż do tych samych peptydów defosforylowanych. Obecność białek mających domeny SH2 stwierdzono we wszystkich organizmach eukariotycznych poza drożdżami. Domeny te zbudowane są z około 100 reszt aminokwasowych, z centralnie położonym motywem zbudowanym z dwóch antyrównoległych β -struktur oraz dwóch N- i C-końcowych fragmentów α -helikalnych, leżących w swoim bezpośrednim sąsiedztwie, powodując, że konformacja przestrzenna domeny przybiera strukturę globularną. Domeny SH2 wiążą ufosforylowane białka, a o swoistości wiązania decydują sekwencje (3–5 reszt aminokwasowych), zlokalizowane bezpośrednio za fosfotyrozyną, w kierunku C-końca łańcucha peptydowego. Przykładowo, sekwencje wiążące domeny SH2: fosfolipazy C to pYIPLPD, kinazy Src – pYYEEI, a białka adaptorowego Grb2 – pYVNV. Na podstawie porównania sekwencji aminokwasowej ponad 20 różnych domen SH2 ustalono, że motyw wiążący fosfoproteiny zbudowany jest z -GNGpYXXXXSPLLL-, gdzie X oznacza dowolny aminokwas poza cysteiną i tryptofanem. Podstawienie jednego z aminokwasów sekwencji wiążącej domenę SH2 innym może zmieniać charakter sygnału przekazywanego przez białka uczestniczące w tym procesie, a w konsekwencji patologiczną odpowiedź komórki.

Domeny PTB (ang. *phosphotyrosine-binding*) zostały opisane początkowo jako domeny funkcjonalnie homologiczne z domenami SH2, stąd ich nazwa – domeny wiążące fosfotyrozynę. Cechą charakterystyczną, odróżniającą domeny PTB od SH2, jest sposób rozpoznawania białek docelowych. Odmienne od domen SH2 domeny PTB rozpoznają do pięciu reszt aminokwasowych, poprzedzających fosfotyrozynę, licząc od N-końca peptydu. Obecnie wiadomo, że tylko niektóre z białek zawierających domeny PTB (m.in. białka adaptorowe: Shc i IRS) wiążą białka docelowe w sposób zależny od ich fosforylacji.

Ze względu na podobieństwo strukturalne niektórzy autorzy zaliczają domeny PTB i PH do jednej superrodziny domen PH/PTB (zob. poniżej). Domeny PTB w tym układzie stanowią mniejszość (około 60 białek człowieka). Przyjmuje się, że rozpoznają sekwencję -NPX(pY/Y/F)- zlokalizowaną zazwyczaj w rejonie przybłonowym białek transbłonowych. Domena ta nie wykazuje preferencji do fosfotyrozyny w wielu białkach. Przykładowo, domena PTB receptora IL-4 wiąże się z większą sekwencją -GNP**A**pYRS-, a domena PTB białka ARH wiąże sekwencję zawierającą motyw -IFDNPVYQ**Q**TT-. Ostatnio udowodniono, że przynajmniej niektóre domeny PTB wiążą fosfoinozytydy, np. domena PTB białka adaptorowego Shc wiąże sekwencję -HIIENP**Q**pYFSDA- receptora neurotrofiny oraz fosfatydyloinozytolo(4,5)-difosforan (PtdIns(4,5)P₂) i fosfatydyloinozytolo(4)monofosforan (PtdIns(4)P).

Domeny SH3 to konserwatywne ewolucyjnie sekwencje aminokwasowe zbudowane z 50–75 reszt aminokwasowych, wykazujące zdolność wiązania białek zawierających charakterystyczne, krótkie sekwencje aminokwasowe, bogate w prolinę i aminokwasy hydrofobowe. Typowym motywem takich sekwencji jest układ -P-X-X-P-, flankowany innymi aminokwasami, głównie hydrofobowymi, tworzący lewoskrętną helisę typu II. W rzeczywistości domeny SH3 rozpoznają i wiążą wszystkie aminokwasy, w których azot α -aminowy jest podstawiony amidowo, lecz jedynym takim aminokwasem białkowym jest prolina. Podstawową rolą domen SH3 jest tworzenie (często w kooperacji z innymi domenami) funkcjonalnych, oligomerycznych kompleksów białkowych, w określonych przedziałach komórkowych. Białka mogą posiadać wiele domen SH3, potencjalnie umożliwiających wiązanie wielu ligandów. Fosforylacja seryny w domenach SH3 (i PDZ) powoduje odłączenie białek sygnałowych, w przeciwieństwie do autofosforylacji receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych, która promuje przyłączanie ich fosfotyrozyn do domen SH2 innych białek sygnałowych. Białka z domenami SH3 są składnikami wszystkich organizmów eukariotycznych.

Domeny WW to 35–40-aminokwasowe sekwencje zawierające dwie reszty tryptofanowe (stąd nazwa WW) rozdzielone inercją 20–22 reszt aminokwasowych. Rozpoznają sekwencje kilkuaminokwasowe bogate w prolinę i/lub fosfoserynę /fosfotreoninę. Wyróżnia się cztery grupy (klasy) domen WW: I (PPXY), II (PPLP), III (oligo-P[R/K]), IV (XXX[pS/pT]P). Występują w białkach wszystkich organizmów eukariotycznych.

SH2 (ang. *Src homology 2*), homologiczna do regionu 2 Src, zbudowana z około 100 aa

Występowanie: wszystkie organizmy eukariotyczne oprócz drożdży

Wiązane sekwencje: 3–5 reszt aminokwasowych po fosfotyrozynie

PTB (ang. *phosphotyrosine-binding*), wiążąca fosfotyrozinę, zbudowana z około 160 aa

Występowanie: wszystkie organizmy eukariotyczne oprócz drożdży

Wiązane sekwencje: do 5 reszt aminokwasowych przed fosfotyrozyną

SH3 (ang. *Src homology 3*), homologiczna do regionu 3 Src, zbudowana z około 60 aa

Występowanie: wszystkie organizmy eukariotyczne

Wiązane sekwencje: kilkuaminokwasowe, bogate w prolinę (typowa PXXP) flankowane aminokwasami hydrofobowymi, dzielone na dwie klasy I i II

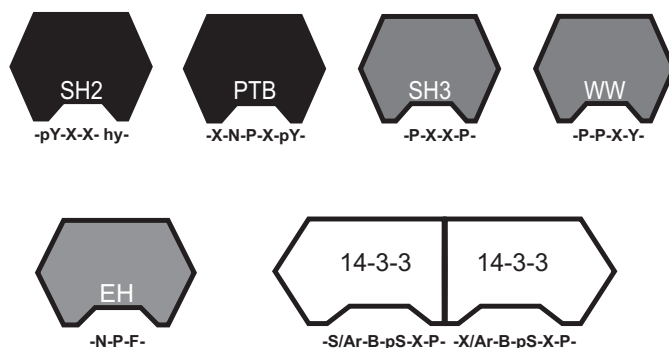
WW (dwie reszty tryptofanowe **W**), zbudowana z około 35 aa

Występowanie: wszystkie organizmy eukariotyczne

Wiązane sekwencje: oligoprolinowe i/lub zawierające fosfoserynę bądź fosfotreoninę, dzielone na cztery klasy: I (PPXY), II (PPLP), III (oligo-P[R/K]), IV (XXX[pS/pT]P)

Do domen wiążących motywy prolinowe należą także **domeny EH** rozpoznające krótkie sekwencje -Asn-Pro-Phe- i **domeny EVH1**, wiążące sekwencje kilkuprolinowe. Przykładowo, domena EVH1 białka Akt rozpoznaje i wiąże sekwencje aminokwasowe (E/D)FPPPPX(D/E). Domeny tego typu kompleksują białka cytoszkieletu, takie jak zyklyna i winkulina.

Jak już wspomniano, domeny WW wiążą także białka zawierające fosfoserynę lub fosfotreoninę, a liczba tego typu domen jest prawdopodobnie znacznie większa. Do motywów wiążących fosfoserynę i fosfotreoninę należą m.in. zbudowane z około 75 aminokwasów **domeny FHA** (ang. *Forkhead-associated*), występujące głównie w kinazach i fosfatazach białkowych oraz w niektórych czynnikach transkrypcyjnych. Charakterystyczną cechą **domen PDZ** (ang. *postsynaptic density protein, disc-large, zo-1*) jest rozpoznawanie krótkich sekwencji aminokwasowych zawierających serynę lub treoninę, usytuowanych w pozycji 2–4, licząc od C-końca łańcucha peptydowego wiazanego białka. Przykładowo, białka wielu kanałów jonowych mają sekwencję -E-(S/T)-D-V. Oddziaływanie tej sekwencji z domeną PDZ innych białek może być regulowane na drodze fosforylacji, ponieważ aminokwasem w pozycji 2 jest hydroksyaminokwas. Inną właściwością domen PDZ jest zdolność do wzajemnej asocjacji, co pozwala zaliczyć te domeny także do grupy domen rozpoznających domeny. Znane są białka mające kilka (do 7) domen PDZ, co ma określone konsekwencje funkcjonalne. Po pierwsze, pozwala na homotropowe oddziaływania pomiędzy domenami PDZ jednego białka, jak i heterotropowe pomiędzy domenami PDZ różnych białek. Umożliwia to tworzenie funkcjonalnych kompleksów białkowych w określonych przestrzeniach komórki. Po drugie, białka zawierające domeny PDZ mają często także inne domeny wiążące (np. SH3) lub katalityczne (np. fosfatazy tyrozynowej lub syntazy NO), co ma podstawowe znaczenie w przenoszeniu sygnału wewnątrzkomórkowego.



Rys. 3.1. Domeny białkowe (SH2, PTB, SH3, WW, EH) wiążące przykładowe krótkie sekwencje aminokwasowe oraz sekwencje wiązane przez białka 14-3-3

Dlatego interakcja domen PDZ może zarówno koordynować lokalizację subkomórkową, pośredniczyć w wiązaniu określonych białek do receptorów i kanałów jonowych, uczestniczyć w tworzeniu połączeń z cytoszkieletem, jak i brać udział w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Funkcjonalną swoistość wybranych domen rozpoznających określone sekwencje aminokwasowe przedstawia rysunek 3.1.

Jedną z najbardziej charakterystycznych i najlepiej poznanych domen wiążących podobne domeny w innych białkach jest superrodzina **domen DD** (Tabela 6). Najwcześniej zostały scharakteryzowane sekwencje zbudowane z około 80 aminokwasów i nazywane „domenami śmierci” (DD, ang. *death domain*). Uzasadnieniem ich nazwy była obserwacja, że obecność tych domen jest konieczna i wystarczająca do przekazania sygnału do apoptozy. Z funkcjonalnego punktu widzenia domeny te są przykładem struktur białkowych odpowiedzialnych za autoasocjację (wzajemną asocjację podobnych domen). Podstawową rolą DD jest umożliwienie asocjacji białek mających podobne domeny, uczestniczących w przekazaniu sygnału od receptora do odpowiednich układów efektorowych, głównie białek adaptorowych FADD (ang. *Fas associated death domain*), TRADD (ang. *TNFR associated death domain*) i RIP (ang. *receptor interacting protein*).

Tabela 6. Superrodzina „domen śmierci”

Nazwa domeny	Akronim	Liczba białek*	Przykładowe białka
Domena śmierci	DD	> 220	TNFR1, Fas, FADD, MyD88
Efektorowa domena śmierci	DED	> 40	Kaspazy 8, 10, FADD, FLIPs
Domena wiążąca kaspazy	CARD	> 130	Kaspazy 1, 2, 4, 9, 12, APAF1
Domena białka piryny	PYD	> 60	Białko piryn, NALP-12, ASC

* liczba znanych białek zawierających tę domenę

Domeny DED (ang. *death effector domain*), czyli efektorowe domeny śmierci, są podobnie jak domeny DD odpowiedzialne za asocjację białek uczestniczących w przekazie sygnału do apoptozy. Występują w białkach adaptorowych, takich jak FADD. DED są swoistym przykładem domen określanych skrótem **CARD** (ang. *caspase recruitment domain*), które znaleziono w wielu kaspazach (2, 8, 9 i 10). Rola biologiczna tego typu domen polega na ich udziale w asocjacji białek adaptorowych z kaspazami w przekazie sygnału do apoptozy. Superrodzinę białek z domeną śmierci uzupełniają białka zawierające domenę **PYD**, znaną po raz pierwszy w białku pirynie.

Fosfolipidy zbudowane z diacyloglicerolu (DAG) i polarnej głowy: fosfatydylocholina (PtdChol), fosfatydyloseryna (PtdSer), fosfatydyloetanolamina (PtdEt), fosfatydyloinozytyle (PtdIns) i kwas fosfatydowy (PA) reprezentują większość składników lipidowych błony komórkowej. Fosfoinozytydy (mono- i oligofosforany fosfatydyloinozytoli PtdInsP_n) odgrywają istotną rolę w przeniesieniu sygnału wewnątrzkomórkowego, przede wszystkim dlatego, że wiele białek posiada domeny wiążące te lipidy. Głównie, ale nie jedynie, za oddziaływania białko–fosfolipid odpowiadają domeny PH, FYVE i PX.

PH – *plecstrin homology* (homologiczna do około 100 aa w plekstrynie)

Wiązane lipidy: różne fosforany fosfatydyloinozytoli

FYVE – Fab1, YOTB, Vac1, EEA (białka eukariotyczne zawierające palce cynkowe, uczestniczące w metabolizmie fosfoinozytydów), zbudowana z około 70 aa

Wiązane lipidy: fosfatydyloinozytolo-3-fosforan (PtdIns(3)P)

PX – *phagocyte oxidase NADPH (Phox)*: podobna do dwóch podjednostek oksydazy NADPH (p40phox i p47phox), zbudowana z około 130 aa

Wiązane lipidy: rozpoznająca głównie PtdIns(3)P, ale także: PtdIns(3,4)P₂, Ptdins(3,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃

Obecność domeny PH stwierdzono w różnych białkach sygnałowych i nazwano poprzez podobieństwo sekwencji tej domeny z około 100-aminokwasowym rejonem plekstryny, głównego substratu PLC w płytkach krwi. Rodzina domen PH jest duża i liczy u człowieka 288 domen stwierdzonych w 247 białkach. Swoistość wiązania nie jest absolutna. Znane ligandy domeny PH to nie tylko różne fosfoinozytydy, lecz także białka. Ponadto wiąże się słabo i nieswoicie z kwasem fosfatydowym. Wybrane ligandy i powinowactwo do nich przedstawia tabela 7.

Wiele białek mających domeny PH zawiera także domeny SH2 i SH3, co umożliwia im uczestnictwo w przekazie sygnału od receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych na wewnątrzkomórkowe układy efektorowe. Podobnie domeny FYVE wiążą swoicie fosfoinozytydy i pośredniczą głównie w działaniu kinaz fosfatydyloinozytoli. W przypadku produktów kinazy 3-fosfoinozytydów (PI3K) domena PH wykazuje większe powinowactwo do PI-3,4-P₂ lub PI-3,4,5-P₃, a domena FYVE do PI-3-P. W komórkach ssaków fosfatydem występującym w największych ilościach jest PI-3-P, na którym mogą zakotwiczać się białka mające domenę FYVE. Taki

motyw mają także niektóre białka funkcjonalnie związane z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej, np. białko SARA, uczestniczące w aktywacji czynników transkrypcyjnych Smad (rozdział 3.3).

Tabela 7. Przykładowe ligandy wiązane swoiście przez domenę PH

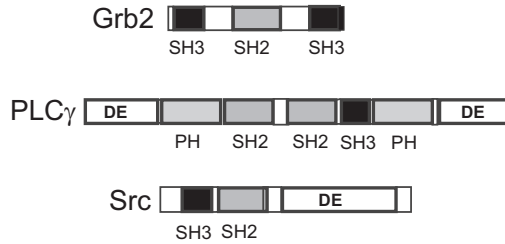
Białko	Wiązany ligand
Plekstryna	Ins(1,3,4)P ₃
Grp1	Ins(1,4,5)P ₃
	Ins(1,3,4,5)P ₄
PDK1	PtdIns(3)P
	PtdIns(3,4)P ₂
	PtdIns(3,4,5)P ₃
PKB/Akt	Ins(1,4,5)P ₃
	PtdIns(3,4,5)P ₃
DAPP1	Ins(1,3,4)P ₃
	Ins(1,3,4,5)P ₄

Molekularny mechanizm wiązania fosfoinozytydów przez domeny PH i FYVE nie jest do końca jasny. Przyjmuje się, że główną rolę odrywają oddziaływania ujemnie naładowanych reszt fosforanowych fosfoinozytolu z obdarzonymi dodatnim ładunkiem grupami aminowymi, amidowymi i iminowymi aminokwasów zasadowych (Lys, His, Arg) ww. domen białkowych.

3.2. Białka adaptorowe

Typowe białka adaptorowe (łącznikowe) to polipeptydy zawierające co najmniej dwie różne domeny białkowe odpowiedzialne za interakcję międzycząsteczkową i/lub swoiste sekwencje aminokwasowe wiążące określone domeny białkowe. Taka budowa tych białek sprawia, że są związkami niezbędnymi w łańcuchu cząsteczek przekazujących sygnał, łącząc dwa sąsiednie ogniwa tego łańcucha.

Typowymi przedstawicielami białek adaptorowych są białka Grb (ang. *growth factor receptor-bound*). Najlepiej opisane białko tej rodziny Grb2 zawiera jedną domenę SH2 i dwie domeny SH3 (Rys. 3.2). Wykazano, że białko to asocjuje m.in. z receptorami EGF i PDGF w sposób zależny od wiązania liganda, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. W asocjacji Grb2 z receptorem uczestniczy jego domena SH2, a proces ten jest ściśle zależny od autofosforylacji receptora. Z drugiej strony Grb2 wiąże się

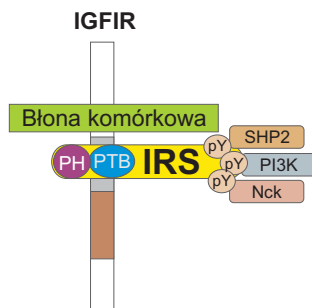


Rys. 3.2. Domenowa budowa białka adaptorowego Grb2 i białek zakotwiczących o aktywności enzymatycznej: PLC γ i Src. DE – domena enzymatyczna, SH2 i SH3 – domeny wiążące krótkie fragmenty aminokwasowe, PH – domena rozpoznająca fosfoinozytydy

swoimi domenami SH3 z białkiem stymulującym wymianę nukleotydów guaninowych (GEF) i w ten sposób aktywuje białka Ras (rozdział 4.2). Z kolei aktywacja białek Ras powoduje uruchomienie kaskady reakcji enzymatycznych, uczestniczących w dalszych etapach przekazywania sygnału.

Innymi przedstawicielami tego typu białek adaptorowych są białka Shc. Scharakteryzowano dotąd trzy izoformy białek Shc (ang. *Src homology collagen*) o m.cz. 46, 52 i 66 kDa. Białka Shc zawierają domenę SH2 przy C-końcu łańcucha peptydowego i domenę PTB przy N-końcu cząsteczki. Białka te pośredniczą m.in. w przekazaniu sygnału od receptorów insuliny, NGF, EGF i PDGF. Związanie liganda z receptorem powoduje fosforylację białek Shc na tyrozynie, która staje się miejscem wiązania domen SH2 innych białek (np. Grb2).

Białkami adaptorowymi pośredniczącymi w przekazaniu sygnału od receptorów insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostowego typu I (IGFI) są białka IRS. Znane są cztery białka zaliczane do rodziny IRS (ang. *insulin receptor substrate*), oznaczane cyframi od 1 do 4. Pierwsze z nich IRS1 zostało wykryte w stymulowanych insuliną komórkach wątrobiaka, po precypitacji przeciwciałami dla fosfotyrozyny (znane jako białko pp185). W roku 1991 sklonowano gen tego białka, a samo białko nazwano substratem receptora insuliny 1. Cztery lata później sklonowano gen IRS2. W wielu tkankach (m.in. w wątrobie, mięśniach i tkance tłuszczowej) obserwuje się koekspresję genów IRS1 i IRS2. Geny dwu dalszych białek IRS3 i IRS4 opisano w roku 1997. IRS3 jest substratem kinazy receptora insuliny w adipocytach, a obecność IRS4 wykryto w komórkach embrionalnych ludzkiej nerki (HEK). Mimo znacznych różnic w wielkości cząsteczek poszczególnych białek IRS, wszystkie wykazują wiele cech wspólnych, w tym obecność domen PH i PTB oraz wielu potencjalnych miejsc fosforylacji. Podstawową funkcją biologiczną IRS1 i IRS2 jest udział w stymulowanym insuliną metabolizmie glukozy, natomiast rola fizjologiczna IRS3 i IRS4 jest niejasna. Najlepiej zbadane białko IRS1 posiada domenę PTB, która swoiście rozpoznaje i wiąże sekwencję NPXY receptora insuliny, a oddziaływanie IRS–receptor w bezpośrednim sąsiedztwie błony komórkowej stabilizuje wiązanie domeny PH z fosfolipidami błony. Wiązanie IRS1 do receptora nie wymaga wcześniejszej fosforylacji reszty tyrozynowej w tym module. IRS1 zawiera co najmniej 20 potencjalnych miejsc fosforylacji tyrozyny, w tym sześć w motywie YMXM i trzy w motywie YXXM. Wykazano, że przynajmniej osiem z tych



Rys. 3.3. Budowa domenowa i lokalizacja komórkowa białka IRS oraz możliwości wiązania innych białek adaptorowych (np. Nck) i kotwiczących (np. SHP2 i PI3K) po fosforylacji tyrozyn białka IRS przez receptor IGFIR

tyrozyn ulega fosforylacji przez kinazę aktywowanego związaniem liganda receptora insuliny. Fosfotyrozyny stają się nowymi miejscami dokowania dla białek mających domeny SH2 i PTB, np. PI3K, Grb2, SHP2 (Rys. 3.3), które z kolei mogą aktywować różne drogi sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Białko IRS1 zawiera także ponad 30 reszt seryny i treoniny, mogących ulegać fosforylacji pod działaniem kinaz serynowo-treoninowych. Prawdopodobnie fosforylacja niektórych z tych reszt jest odpowiedzialna za hamowanie przekazu sygnału insulinowego.

Swobodnymi przedstawicielami białek adaptorowych są białka 14-3-3 (Rys. 3.1). Są to wielofunkcyjne białka (m.cz. około 30 kDa) homo- lub heterodimeryczne obecne w organizmach eukariotycznych. Każdy z monomerów zbudowany jest z dziewięciu (A–I) przeciwrównoległych helis, połączonych krótkimi pętlami. W tworzeniu dimeru uczestniczą helisy A i B jednego monomeru i helisy C i D drugiego. Każdy monomer może wiązać jedną domenę fosfoproteiny. Nazwa pochodzi od wzoru migracji otrzymanego w wyniku ich frakcjonowania metodami dwukierunkowej chromatografie: chromatografii cienkowarstwowej na DEAE-celulozie i cienkowarstwowej elektroforezy w żelu skrobiowym. U człowieka stwierdzono obecność dziewięciu rodzajów tych białek: β , γ , ϵ , ν , δ , τ , ζ (oprócz ufosforylowanych α i ϕ) nazwanych na podstawie kolejności wypływu z kolumny chromatograficznej z wykorzystaniem wysokorozdzielczej chromatografii z odwróconą fazą. Różne izoformy stwierdzono w organizmach kręgowców, drożdży, nicieni, owadów, a także u roślin. Białka te występują głównie w cytozolu, ale również w jądrze komórkowym i w błonie komórkowej.

Pośredniczą one w przekazie sygnału pomiędzy różnymi elementami sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Przypuszcza się, że mogą uczestniczyć w sygnałach odbieranych od receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych, receptorów asocjujących z białkami G (GPCR), receptorów asocjujących z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi, receptorów jonotropowych, a nawet od receptorów wewnątrzkomórkowych. Ich ligandami mogą być także kinazy i fosfatazy białkowe, białka z rodziny Bcl-2, białka cytoszkieletu i czynniki transkrypcyjne. Takie właściwości białek 14-3-3 powodują, że mogą one odgrywać ważną rolę w regulacji bardzo wielu

procesów wewnątrzkomórkowych. Mają bowiem domeny pozwalające na wiązanie charakterystycznych motywów R- (S/Ar)-B-pS-X-P lub R-X(Ar)-B-pS-X-P obecnych w białkach przez nie wiązanych (znanych jest ponad 200 takich białek), gdzie R – Arg, S – Ser, B – aminokwas zasadowy, X – aminokwas dowolny, Ar – aminokwas aromatyczny, P – prolina. Mogą się wiązać także z białkami nieufosforylowanymi, ale w tym przypadku muszą one mieć motyw RSX(₁₋₄) lub palec cynkowy. Aktywną formą tych białek są homo- lub heterodimery.

Do białek adaptorowych zaliczane są także niektóre podjednostki regulatorowe enzymów. Klasycznym przykładem jest podjednostka p85 kinazy 3-fosfoinozytydów (PI3K), mająca dwie domeny SH2, umożliwiające jej pośredniczenie w stymulowanej kinazami tyrozynowymi aktywacji podjednostki katalitycznej p110 tego enzymu. Typowymi białkami adaptorowymi są również białka FADD i TRADD, których udział w przekazie sygnału oparty jest na oddziaływaniu domen homologicznych DD i DED. Ich rola biologiczna w przekazywaniu sygnału do apoptozy została udowodniona doświadczalnie.

3.3. Białka kotwiczące

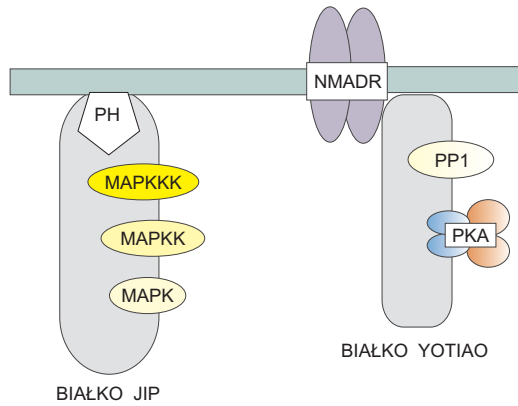
Do typowych białek kotwiczących należą polipeptydy mające w swej strukturze domeny odpowiedzialne za ich określoną lokalizację komórkową. Należą do nich białka wiążące się z białkami transbłonowymi, jak: kinazy tyrozynowe niereceptorowe czy określone enzymy wiążące się z receptorami o aktywności kinaz białkowych tyrozynowych, takie jak: fosfolipaza C_γ, kinaza fosfatydylo-3-inozytoli i białka aktywujące GTP-azę, poprzez swoje domeny SH2. Schemat budowy wybranych białek kotwiczących o aktywności enzymatycznej przedstawia rysunek 3.2. Białkami kotwiczącymi są również polipeptydy mające domeny PH lub FYVE (np. białko SARA lub kinaza białkowa B), które umożliwiają im asocjacje z fosfolipidami błony komórkowej.

SARA (ang. *Smad anchor for activation*) jest typowym białkiem kotwiczącym białka Smad. Białko to jest zasocjowane (zakotwiczone) z fosfolipidami wewnętrznej powierzchni błony komórkowej przez domenę wiążącą fosfolipidy – FYVE i uczestniczy w przekazaniu sygnału wewnątrzkomórkowego od receptora TGFβ. SARA prezentuje białka R-Smad receptorowi TGFβ typu I i tworzy przejściowy kompleks RTGFβI–niefosforylowane białka Smad-SARA. SARA nie wiąże białek Smad1, Smad4 i I-Smad. Białka R-Smad oddziałują bezpośrednio z aktywowanym receptorem typu I. Po ufosforylowaniu Smad2 i Smad3 przez kinazę receptora białka te oraz SARA oddysocjują od receptora. Fosforylacja R-Smad znosi autoinhibicyjną interakcję pomiędzy domenami MH1 oraz MH2 i umożliwia wiązanie R-Smad do Smad4 (Co-Smad) przez ich domeny MH2. Uwolniona SARA jest zdolna do wiązania następnych cząsteczek R-Smad. Ekspresja i lokalizacja wewnątrzkomórkowa SARA jest istotnym elementem regulacji swoistości i szybkości aktywacji R-Smad. Nie wiadomo, czy istnieją inne SARA-podobne cząsteczki o specyficzności wiązania innych przedstawicieli rodziny białek R-Smad.

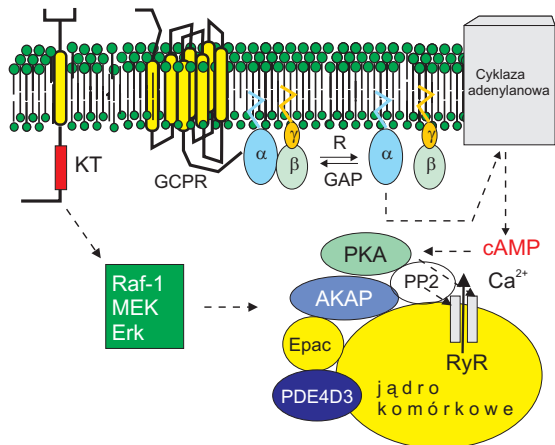
Także niektóre cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne (STAT, Smad) mają charakter białek kotwiczących (rozdział 8).

3.4. Białka dokujące

Białka dokujące to polipeptydy mające kilka miejsc wiążących różne białka. Zazwyczaj wiążą one enzymy jednego szlaku przekazania sygnału (Rys. 3.4). Dobrze poznane są białka dokujące dla kinaz MAP, zarówno u ssaków, jak i niższych *Eukaryota*. W komórkach ssaków białka JIP (ang. *JNK interacting protein*) funkcjonują jako cząsteczki wiążące szereg białek pośredniczących w aktywowanej stresem drodze



Rys. 3.4. Przykłady białek dokujących JIP i Yotiao. MAPKKK/MAPKK/MAPK – kaskada kinaz MAP, PKA – kinaza białkowa A, PP1 – fosfataza białkowa 1, NMDAR – kanał jonowy regulowany asparaginianem, PH – domena wiążąca lipidy



Rys. 3.5. Integracja sygnałów inicjowanych przez receptory błonowe (KT i GPCR), realizowana poprzez aktywację białek G, cyklazy adenylnowej i kaskady kinaz MAP (Raf, MEK, Erk) z regulacją aktywności kanału wapniowego (RyR), realizowaną przez ułożony w błonie jądrowej kompleks białkowy (PKA, Epac, PDE4D3, PP2), z centralną rolą białka AKAP

aktywacji kinaz JNK (ang. *c-Jun* *amnio-terminal kinase*). Znane są trzy tego typu białka dokujące (JIP1–3). JIP1 i JIP2 są pokrewnymi białkami, które mają oddzielne miejsca wiążące dla JNK i kaskady kinaz białkowych sekwencyjnie regulujących jej aktywność: kinazy MKK7 (MAPKK) i kinazy MLK3 (MAPKKK) (Rys. 3.4). JIP3 jest strukturalnie niepodobne do JIP1 i JIP2, ale tak samo jak te ostatnie wiąże kinazy kaskady MAP. Białka te mają zlokalizowane przy C-końcu łańcucha polipeptydowego domeny PTB i SH3 umożliwiające ich wewnątrzkomórkową lokalizację lub asocjację z innymi białkami sygnałowymi. Białka JIP mogą tworzyć homo- i heterooligomeryczne kompleksy w cytoplazmie i w ten sposób pośredniczyć w aktywacji kinaz JNK. Przypuszcza się, że białka JIP nie tylko umożliwiają odpowiednią lokalizację subkomórkową (lub dynamiczną zmianę lokalizacji) kompleksów kaskady kinaz JNK, lecz także zwiększają efektywność aktywacji enzymatycznej przez miejscowe podniesienie ich stężenia oraz odpowiednie dopasowanie strukturalne JNK w procesie podwójnej fosforylacji (zob. kinazy MAP). Podobną do białek JIP rolę doku dla kaskady kinaz Erk przypisuje się białku MP1.

Białka dokujące mogą pośredniczyć także w regulacji aktywności enzymów o przeciwnym działaniu, np. kinaz i fosfataz białkowych. Takimi cząsteczkami dokującymi są białka AKAP (ang. *A-kinase-associated protein*). Białka te występują powszechnie w organizmach eukariotycznych, poczynając od *C. elegans* i muszki owocowej, na człowieku kończąc. Wyjątkiem są drożdże, w których nie stwierdzono obecności białek AKAP. Wszystkie te białka mimo ograniczonego podobieństwa sekwencji aminokwasowej zawierają motyw około 24 reszt aminokwasowych, odpowiedzialnych za wiązanie podjednostek regulacyjnych kinazy białkowej A (PKA), stąd ich nazwa. PKA jest zaangażowana w wiele równoległych dróg sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, co wymaga odpowiednich mechanizmów regulujących jej aktywność w odpowiednim miejscu i czasie. Jednym z nich jest odpowiednia kompartmentacja PKA, którą zapewniają jej białka AKAP. Specyficzność zakotwiczenia AKAP w różnych strukturach subkomórkowych (wewnętrzna część błony komórkowej, błony: mitochondrium, retikulum endoplazmatycznego i jądra) zależy głównie od ich struktury (obecność domen zasadowych i spektrynopodobnych) lub modyfikacji potranslacyjnych (mirystylacja, palmitynacja). Charakterystyczną cechą białek AKAP jest zdolność do wiązania wielu enzymów. Koordynują one działanie kinaz białkowych (PKA, PKC) i fosfataz białkowych (PP1, PP2B) serynowo-treoninowych (np. białko AKAP79). Białka AKAP są rodziną około 30 dużych polipeptydów (m.c. około 200 kDa), które mają miejsca wiążące różne kinazy i fosfatazy oraz motywy pozwalające na zakotwiczenie powstałych kompleksów w określonych przedziałach subkomórkowych. Ponadto białka AKAP wiążą kinazy i fosfatazy białkowe bezpośrednio z ich aktywatorami i/lub substratami. Typowym przykładem tego typu białek dokujących jest białko Yotiao (Rys. 3.4), zlokalizowane przy wewnętrznej powierzchni błony komórkowej, które z jednej strony wiąże podjednostkę regulatorową kinazy białkowej A i fosfatazę białkową PP1, a z drugiej podjednostkę NR1A receptora asparagianianu NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartate*). Kompleks ten jest jednym z wielu związanych z tym receptorem, wiadomo bowiem, że ponad 50 białek uczestniczy w przekazie sygnału od receptora NMDA, a organizacja białek zaangażowanych w wewnątrzkomórkowy przekaz sygnału od receptora błonowego

w bardziej lub mniej złożone kompleksy jest raczej regułą niż wyjątkiem. Interesującym przykładem dużego kompleksu z udziałem białek AKAP jest białko mAKAP (ang. *muscle A kinase-anchoring protein*), zaangażowane w wewnątrzkomórkowy przekaz sygnału plejotropowego (Rys. 3.5). Kompleks ten ulokowany przy błonie jądrowej (miocytów i neuronów) łączy trzy białka wiążące cAMP: PKA, Epac1 i fosfodiesterazę PDE4D3, kaskadę kinaz MAP (Erk), kanał jonowy wapniowy w błonie jądrowej (receptor RyR) oraz fosfatazy PP2A i PP2B (kalcyneurynę). Interpretacja działania takiego kompleksu wyjaśnia, w jaki sposób w miocytach (serca) zachodzi integracja sygnalizacji z udziałem cAMP z sygnałem wapniowym i z kaskadą kinaz MAP, inicjowana działaniem wielu ligandów zewnątrzkomórkowych.

Literatura uzupełniająca

- Aplin A.E., Howe A.K., Juliano R.L. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999, 11, 737–744.
- Baserga R. The insulin receptor substrate-1: a biomarker for cancer. *Exp. Cell Res.* 2009, 315, 727–732.
- Beręsewicz M. Białka kotwiczące i ich udział w przekazywaniu sygnałów w zagęszczeniach postsynaptycznych w układzie nerwowym. *Post. Biochem.* 2007, 53, 188–197.
- Blume-Jensen P., Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 2001, 411, 355–365.
- Brown M.P., Cytokines, Jaks, Stats, health and disease. *Aust. NZ J. Med.* 1999, 29, 73–78.
- Chang Y.-T., Rosania G.R., Chung S.-K. Inositol phospholipid pathway inhibitors and regulators. *Exp. Opin. Ther. Patients* 2001, 11, 1–15.
- Davis R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000, 103, 239–252.
- DiNitto J.P., Lambright D.G. Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1761, 850–867.
- Dodge-Kafka K.L., Kapiloff M.S. The mAKAP signaling complex: integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. *Eur. J. Cell Biol.* 2006, 85, 593–602.
- Edwards A.S., Scott J.D. A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000, 12, 217–221.
- Fu H., Subermanian R.R., Masters S.C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000, 40, 617–664.
- Hunter T. Signaling – 2000 and beyond. *Cell* 2000, 100, 113–127
- Ilsley J.L., Sudol M., Winder S.J. The WW domain: linking cell signaling to the membrane cytoskeleton. *Cell. Signal.* 2002, 14, 183–189.
- Kelkar N., Gupta S., Dickens M., Davis R.J. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol. Cell Biol.* 2000, 20, 1030–1043.
- Kutateladze T.G. Mechanistic similarities in docking of FYVE and PX domains to phosphatidylinositol-3-phosphate containing membranes. *Prog. Lipid Res.* 2007, 46, 315–327.
- Lu P.-J., Zhou X.Z., Shen M., Lu K.P. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphoteronine-binding modules. *Science* 1999, 283, 1325–1328.
- Pawson T., Nash P. Protein–protein interactions define specificity in signal transduction. *Gens & Develop.* 2000, 14, 1027–1047.
- Pawson T., Scott J.D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 1997, 278, 2075–2080.
- Rosiak J., Zawilska J.B. Białka 14-3-3 – rola w regulacji biosyntezy melatoniny. *Post. Biochem.* 2006, 52, 35–41.

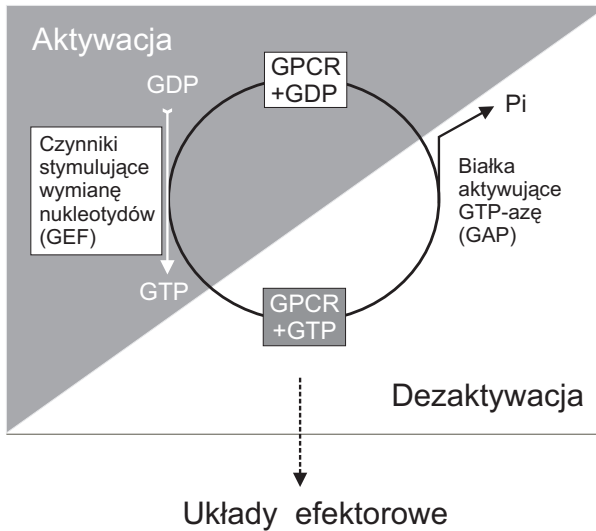
- Sehgal P.B. STAT-signaling through the cytoplasmic compartment. Consideration of a new paradigm. *Cell. Signal.* 2000, 12, 525–535.
- Sheinerman F.B., Al-Lazikani B., Honig B. Sequence, structure and energetic determinants of phosphopeptide selectivity of SH2 domains. *J. Mol. Biol.* 2003, 334, 823–841.
- Smith F.D., Scott J.D. Signaling complexes: junctions on the intracellular information super highway. *Curr. Biol.* 2001, 12, R32–R40.
- Uhlík M.T., Temple B., Bencharit S., Kimple A.J., Siderovski D.P., Johnson G.L. Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J. Mol. Biol.* 2005, 345, 1–20.
- Waksman G., Kurlyan J. Structure and specificity of the SH2 domain. *Cell* 2004, S116, S45–S48.
- Whitehead J.P., Clark S.F., Urso B., James D.E. Signaling through the insulin receptor. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000, 12, 222–228.
- Whitmarsh A.J., Davies R.J. A central control for cell growth. *Nature* 2000, 403, 255–256.
- Yaffe M.B., Cantley L.C. Signal transduction: grabbing phosphoproteins. *Nature* 1999, 402, 30–31.
- Yaffe M.B., How do 14-3-3 protein work? Gatekeeper phosphorylation and molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 2002, 513, 53–57.
- Yasuda J., Whitmarsh A.J., Cavanagh J., Sharma M., Davis R.J. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol. Cell Biol.* 1999, 19, 7245–7254.

4. Białka G, cyklazy i cykliczne nukleotydy

Nazwą białka G określa się liczną i zróżnicowaną rodzinę białek wiążących nukleotydy guaninowe: GDP i GTP, mających ponadto aktywność GTP-azy (zdolność do hydrolizy GTP do GDP). Odkrycie tej rodziny białek zawdzięczamy pracy dwóch niezależnych grup badawczych, kierowanych przez Alfreda G. Gilmana i Martina Rodbella. Należą do niej duże, heterotrimeryczne białka G, zlokalizowane przy wewnętrznej powierzchni błony komórkowej i małe, monomeryczne białka o różnej lokalizacji wewnątrzkomórkowej, zdeterminowanej ich funkcją biologiczną. Do tych ostatnich zaliczamy m.in. czynniki translacyjne (eIF2, EF-Tu, EF-G), białka wchodzące w skład kompleksów budujących tzw. *signal recognition particles* (SR α , SR β , SRP54) uczestniczące w translokacji białek w obrębie retikulum endoplazmatycznego oraz białka Ras/Rap, Rho/Rac, Rab, Ral i Arf pośredniczące w różnych procesach wewnątrzkomórkowych, indukowanych zewnątrz- i wewnątrzkomórkowo.

Białka monomeryczne i podjednostki α dużych białek G mogą występować w dwóch formach konformacyjnych, nieaktywnej (związanej z GDP) i aktywnej (związanej z GTP). Zmiana konformacji na aktywną wymaga dostarczenia energii w postaci GTP, przejście w formę nieaktywną – hydrolizy GTP do GDP, ale szybkość samoistnej wymiany nukleotydów (GDP \rightarrow GTP) oraz hydrolizy (GTP \rightarrow GDP) jest bardzo niska i dlatego mogą one istnieć w dwóch stabilnych konformacjach: aktywnej (+GTP) i nieaktywnej (+GDP). Możliwość przejścia pomiędzy tymi dwoma stanami sprawia, że spełniają one rolę „molekularnych przełączników”. Dla większości białek G zarówno wymiana nukleotydów GDP na GTP, jak i hydroliza GTP do GDP są procesami przebiegającymi bardzo wolno. Wzajemne przeksztalcenie form nieaktywnych w aktywne i na odwrót przyspieszają specyficzne białka regulatorowe, czynniki wzmagające wymianę nukleotydu (GEF, ang. *guanine nucleotide exchange factor*), swoiste dla określonych białek wiążących nukleotydy guaninowe, oraz białka zwiększające aktywność GTP-azową (GAP, ang. *GTPase activating protein*). Te ostatnie w przypadku dużych białek wiążących nukleotydy guaninowe nazywane są białkami regulującymi sygnalizację białek G (RGS, ang. *regulator of G protein signaling*). Istnieją także białka regulatorowe specyficzne (oddziałujące z białkami Rho/Rac i Rab), określane skrótem GDI (ang. *GDP dissociation inhibitor*), hamujące dysocjację GDP–białko G i stabilizujące nieaktywną formę tych białek.

Większość białek G wiąże GDP bardzo mocno, a stopień dysocjacji GDP jest niski. Ten ostatni proces może być znacznie przyspieszony działaniem białek, określanych jako czynniki wymiany nukleotydów guaninowych (GEFs). W przypadku dużych białek G czynnikami stymulującymi wymianę nukleotydów są ligandy (także niebiałkowe) receptorów GPCR. Białka aktywujące aktywność GTP-azową białek G kończą przekaz sygnału przez te molekularne przełączniki. Przyspieszają one hydrolizę GTP do GDP, ograniczając okres aktywacji białek G i umożliwiając następną



Rys. 4.1. Schemat aktywacji i dezaktywacji białek wiążących nukleotydy guaninowe (GPCR)

rundę przekazu sygnału przez receptory GPCR. Schemat aktywacji i dezaktywacji białek wiążących nukleotydy guaninowe przedstawia rysunek 4.1. Wszystkie białka G zawierają domenę G, odpowiedzialną za wiązanie i hydrolizę GTP. Domena ta posiada podobną strukturę przestrzenną u wszystkich białek G, a charakterystyczną sekwencją wiążącą nukleotydy guaninowe jest motyw $-GX_4GK(S/T)-$. Sekwencja ta, nazywana także pętlą P, wiąże reszty β - i γ -fosforanowe, odpowiednio GDP i GTP.

4.1. Duże białka G

Pod koniec lat 70. wyodrębniono i częściowo oczyszczono białka, które posiadały zdolność wiązania nukleotydów guaninowych oraz aktywność GTP-azy. Stąd nazwa tej grupy białek – białka G (lub N) od ich nazwy w języku angielskim – *guanine (nucleotide) binding proteins*. Obecnie białka G mają status uniwersalnych łączników pomiędzy receptorami błonowymi odbierającymi sygnał zewnątrzkomórkowy a komórkowymi białkami efektorowymi. Białka G uczestniczą w przekazaniu sygnału zewnątrzkomórkowego od receptorów błonowych GPCR (ang. *G protein-coupled receptors*) do białek efektorowych (enzymów katalizujących powstawanie wtórnych przekazyńców lub białek regulujących otwieranie i zamykanie kanałów jonowych). Za prace prowadzące do odkrycia i ustalenia roli biologicznej białek G M. Rodbell i A.G. Gilman otrzymali w 1994 roku nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Białka G zaliczane są do nadrodziny białek wiążących nukleotydy guaninowe. Białka G nazywane także dużymi białkami G są heterotrimerami zbudowanymi z podjednostek: α (m.cz. 39–52 kDa), β (m.cz. około 36 kDa) oraz γ (m.cz. 7–8 kDa). Podjednostki α poszczególnych białek G różnią się nie tylko wielkością, lecz także

sekwencją aminokwasową. Oprócz regionów o dużym podobieństwie sekwencji (> 90%) odpowiedzialnych za wiązanie nukleotydów guaninowych i aktywność GTP-azy, podjednostki α zawierają sekwencje unikalne, odpowiedzialne m.in. za ich wiązanie z białkami efektorowymi. Zakotwiczone są w błonie komórkowej resztami kwasu palmitynowego lub mirystynowego. Scharakteryzowano 16 różnych genów ssaczych, kodujących podjednostki α , 5 genów kodujących podjednostki β i 12 genów kodujących podjednostki γ . Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej podzielono podjednostki α na szereg rodzin (α_s , α_i , α_o , α_q , α_{12} itd.). Izofomy podjednostek α ssaków przedstawiono w tabeli 8. Rodzaj podjednostki α określa jej swoistość biologiczną i decyduje o typie białka G, w którego skład wchodzi ($\alpha_s \rightarrow G_s$, $\alpha_i \rightarrow G_i$, $\alpha_o \rightarrow G_t$, $\alpha_q \rightarrow G_q$ itd.). Przykładowo, białka G_s i G_i pośredniczą odpowiednio w stymulacji i inhibicji cykazy adenylanowej (CA) oraz otwieraniu kanałów wapniowych i zamykaniu kanałów potasowych, białka G_t (transducyny) w przekazywaniu bodźców świetlnych, a białka G_q m.in. w indukowanej hormonalnie stymulacji obrotu fosfatydyloinozytoli. Niektóre podjednostki α ulegają modyfikacji przez toksyny bakteryjne. Toksyna krztuśca (PTX) i toksyna cholery (CTX) katalizują ADP-rybozylację (przeniesienie grupy difosforanu adeninyrybozy z NAD⁺ na argininę lub cysteinę łańcucha białkowego) niektórych podjednostek α . Wynikiem działania toksyny krztuśca jest stabilizacja formy nieaktywnej (+GDP) białek G, natomiast toksyna cholery stabilizuje formę aktywną (+GTP) białek G. W obu przypadkach upośledzona zostaje podstawowa funkcja białek G, molekularnego przełącznika sygnału zewnątrzkomórkowego, aczkolwiek konsekwencje biologiczne działania poszczególnych toksyn są całkowicie różne. Podział i wybrane właściwości białek G zebrano w tabeli 8.

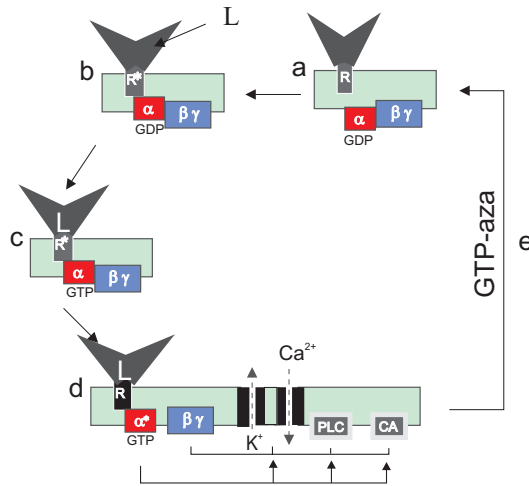
Podjednostki β o m.c. 34–35 kDa są bardzo podobne, jedynie te występujące w tkankach mózgowych różnią się strukturą od pozostałych podjednostek β . Podjednostki γ wykazują znacznie większe zróżnicowanie strukturalne i są zazwyczaj dzielone na cztery grupy. Białka zaliczane do grupy pierwszej (γ_1 i γ_6) wchodzi w skład białek G siatkówki oka. Podjednostki γ grupy drugiej (γ_2 – γ_4) występują głównie w mózgu. Podjednostki grupy trzeciej (γ_5 , γ_8 i γ_{10}) występują powszechnie, a podjednostki grupy czwartej (γ_7 i γ_{12}) występują w wielu białkach G. Podstawą tego podziału jest przede wszystkim homologia sekwencji C-końcowych, które decydują o swoistości oddziaływania z receptorami. Podjednostki γ mogą być związane z różnymi resztami poliprenylowymi: farnezylowymi lub geranylo-geranylowymi, ułatwiającymi im zakotwiczenie w błonie komórkowej. Pierwotnie przypuszczano, że podstawową rolą kompleksów podjednostek $\beta\gamma$ jest wiązanie podjednostki α i odtwarzanie trimerycznej struktury białek G. Obecnie przyjmuje się, że kompleks $\beta\gamma$ posiada także funkcję regulacyjną w stosunku do wielu układów efektorowych, takich jak: fosfolipaza A₂, fosfolipaza C β , kanały potasowe i inne. Znanych jest ponad 20 rodzajów białek G współdziałających ze stukilkudziesięcioma receptorami hormonów, neurotransmitterów, chemokin oraz z chemo- i fotoreceptorami. Układami efektorowymi odbierającymi sygnał od białek G są: cykazy adenylanowa (CA), fosfodiesteraza cGMP (cGMP-PDE), fosfolipaza C (PLC), fosfolipaza A₂ (PLA₂) oraz białka tworzące kanały potasowe i wapniowe, regulowane wewnątrzkomórkowo. Mechanizm przekazania sygnału od receptora na układ efektorowy jest

Tabela 8. Klasyfikacja białek G i izoformy podjednostek α ssaków

Białko	Podjednostka	Efekt biologiczny	Toksyny bakteryjne	Występowanie
Gs	α_s α_{olf}	stymulacja CA otwarcie kanału Ca^{2+} stymulacja CA	CTX i PTX CTX	powszechny* neuroepitelium węchowe
Gi	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$ α_{oA}, α_{oB} α_z, α_g α_{t1}, α_{t2}	hamowanie CA, otwarcie kanału K^+ , zamknięcie kanału Ca^{2+} stymulacja PLC i PLA_2 hamowanie CA stymulacja cGMP-PDE	PTX (CTX) CTX i PTX	wiele różnych tkanek wiele różnych tkanek tkanki mózgowe pręciki i czopki siatkówki oka
Gq	α_q $\alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$	stymulacja PLC β stymulacja PLC β	–	powszechny większość tkanek
G ₁₂	α_{12}, α_{13}	stymulacja antyportu Na^+/H^+ , aktywacja białek Rho i kinaz MAP	–	powszechny

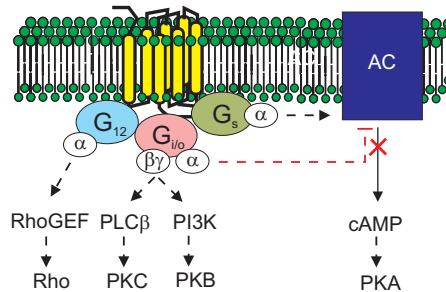
* termin „powszechny” oznacza, że obecność danej podjednostki stwierdzono we wszystkich badanych próbkach, pochodzących przynajmniej z 10 różnych tkanek. CA – cyklaza adenylanowa, PLC – fosfolipaza C, PLA_2 – fosfolipaza A₂, cGMP-PDE – fosfodiesteraza cGMP, PTX – toksyna krzuśca, CTX – toksyna cholery, Rho – małe białko G.

wieloetapowy i w uproszczeniu obejmuje następujące fazy aktywacji i dezaktywacji (Rys. 4.2). Nieaktywne białko G jest trimerem, w którego domenie nukleotydowej podjednostki α związany jest GDP (a). Przyłączenie białka G do receptora podnosi jego powinowactwo do swoistego liganda, np. odpowiedniego hormonu (b). Związywanie receptora z hormonem powoduje zmianę konformacyjną podjednostki α , połączoną z wymianą GDP na GTP (c). W tym przypadku receptor działa jako czynnik stymulujący wymianę nukleotydów (GEF). Konsekwencją tych zmian jest oddysocjowanie podjednostki α z trimery, a następnie jej asocjacja z odpowiednim białkiem efektorowym (d). W zależności od rodzaju układu efektorowego następuje: stymulacja lub inhibicja produkcji tzw. wtórnych przekaźników (cAMP, jeśli białkiem efektorowym jest cyklaza adenylanowa, DAG i IP_3 , jeśli tym białkiem jest fosfolipaza C) oraz stymulacja lub inhibicja przepływu jonów, jeśli efekтором jest kanał jonowy. Ponieważ podjednostka α ma aktywność GTP-azy, wkrótce po interakcji z efektorom zachodzi hydroliza GTP do GDP, co prowadzi do reasocjacji trimery i przejścia białek G w stan nieaktywny. Aktywność GTP-azową podjednostki α



Rys. 4.2. Stymulowana ligandem aktywacja i dezaktywacja białek G. L – ligand, PLC – fosfolipaza C, CA – cyklaza adenylanowa, R – receptor R7G, α , β , i γ – podjednostki białek G

białek G stymulują (nawet ponadtysiącrotnie) białka GAP. Interakcja receptorów z białkami G jest regulowana przez serynowo-treoninowe kinazy A, C oraz GRK (ang. *G-protein-coupled receptor kinase*). Fosforylacja receptorów R7G (GPCR) na resztach seryny/treoniny powoduje dysocjację kompleksów receptor–białko G, odpowiedzialną za desensytyzację (odczulenie) lub adaptację receptorów, wywołane przedłużonym (lub powtórnym) działaniem liganda. Fosforylacja przez kinazy PKA lub PKC blokuje prawdopodobnie bezpośrednie wiązanie między receptorem a białkiem G. Mechanizm odczulenia działaniem GRK jest dwuetapowy, w pierwszym etapie następuje fosforylacja związanego z ligandem receptora, a w drugim przyłączenie do receptora białek z rodziny arrestyn, co przerywa sygnał receptor → białko G



Rys. 4.3. Drogi sygnałowe inicjowane wybranymi rodzajami białek G. AC – cyklaza adenylanowa, PKA, PKB i PKC – kinazy białkowe A, B i C, PLC β – fosfolipaza C β , RhoGEF – czynnik stymulujący wymianę nukleotydów guaninowych w białkach Rho

i powoduje internalizację całego kompleksu. Uważa się także, że fosforylacja GPCR na resztach seryny/treoniny może powodować „przełączenie” związanych z receptorem białek z Gs na Gi i uruchomienie nowej drogi sygnałowej.

Jak już wspomniano, znanych jest wiele cząsteczek efektorowych, aktywowanych zarówno podjednostką α , jak i kompleksem podjednostek $\beta\gamma$. Powoduje to, że w tym samym czasie mogą być stymulowane lub hamowane różne układy efektorowe, a co za tym idzie, różne drogi sygnałowe. Przykład takich możliwości przedstawia rysunek 4.3. Obrazuje teoretyczne możliwości oddziaływania podjednostek białek G z różnymi układami enzymatycznymi (PLC, PI3K, RhoGEF) i kanałami jonowymi (K^+ , Ca^{2+}).

Związanie jednej cząsteczki podjednostki α z białkiem efektorowym może stymulować syntezę wielu cząsteczek wtórnego przekaźnika lub przepływ tysięcy jonów przez błonę komórkową. Zmiana cytoplazmatycznego poziomu wtórnych przekaźników i/lub stężenia odpowiednich jonów aktywuje lub hamuje enzymy, których aktywność jest regulowana przez te cząsteczki. Działanie dwóch różnych ligandów przez jeden typ białek G (np. Gs) zazwyczaj prowadzi do wzmocnienia sygnału i określane jest mianem konwergencji. Natomiast stymulacja dwu różnych typów białek G (np. Gs i Gi) przez dwa różne ligandy (dywergencja) powoduje wygaszenie sygnału przenoszonego przez receptory GPCR. Zdolność wielu rodzajów białek G do oddziaływania z bardzo wieloma receptorami błonowymi może tłumaczyć, jak komórka odpowiada na dużą liczbę różnych hormonów poprzez zaangażowanie względnie małej liczby wtórnych przekaźników. Odpowiedź na pytanie, jak ograniczona liczba wtórnych przekaźników inicjuje bardzo zróżnicowaną odpowiedź komórkową, jest znacznie trudniejsza. Wyjaśnienie tego problemu wydaje się jeszcze bardzo odległe. Obecnie jesteśmy na etapie określania ciągów reakcji inicjowanych działaniem poszczególnych wtórnych przekaźników. Dopiero wyjaśnienie wzajemnych powiązań odrębnych łańcuchów reakcji i ich funkcjonalnej integracji przybliży nas do zrozumienia molekularnych podstaw regulacji hormonalnej. Jest to szczególnie istotne przy przenoszeniu sygnału wewnątrzkomórkowego w przypadku odległej w czasie odpowiedzi na działanie czynników wzrostowych (angażujących wiele różnych dróg przenoszenia sygnału). Nieprawidłowy poziom lub upośledzenie funkcji białek G wykazano w wielu różnych stanach patologicznych, m.in. w nadczynności i niedoczynności tarczycy, w cukrzycy, w chorobach układu sercowo-naczyniowego i w wielu chorobach nowotworowych.

4.2. Superrodzina białek Ras

Istotną rolę w sygnalizacji transbłonowej odgrywają białka należące do superrodziny monomerycznych, małych białek (m.cz. 20–40 kDa) wiążących nukleotydy guaninowe, określanych nazwą superrodziny białek Ras. Do 2001 roku poznano strukturę około 150 takich białek człowieka, które zazwyczaj dzieli się na pięć rodzin: Ras, Rho/Rac, Rab, Ran i Arf. Białka te wykazują od 30 do 50% podobieństwa sekwencji aminokwasowej i wszystkie mają motyw wiążący GTP/GDP i domenę GTP-azy. Funkcja biologiczna poszczególnych rodzin małych białek G zależy m.in.

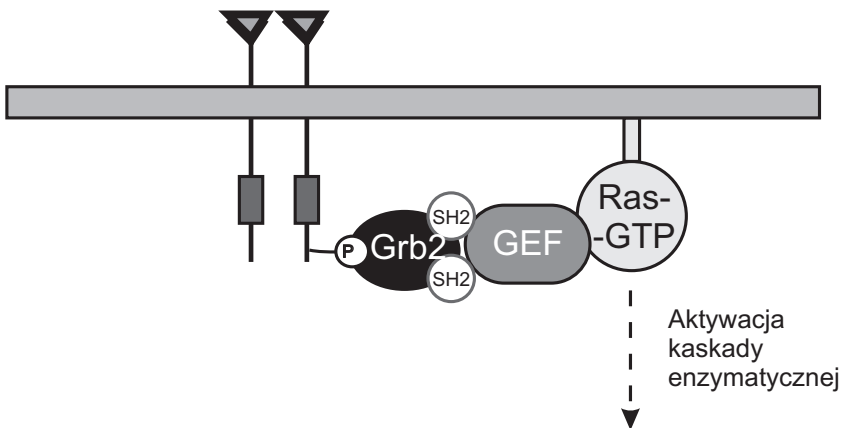
od potranslacyjnych modyfikacji, głównie prenylacji bądź mirystylacji, które warunkują wewnątrzkomórkową lokalizację tych związków. Dotychczas uzyskane wyniki wskazują, że w przeniesieniu sygnału hormonalnego pośredniczą przede wszystkim białka zaliczane do rodzin Ras (i Rho/Rac).

Rodzina genów *ras* koduje drobnocząsteczkowe białka (m.c. 21 kDa), określane jako p21^{ras} lub Ras. Gen *ras* został odkryty jako onkogen indukowanego wirusami Harveya i Kirstena mięsaka szczurzego (białka H-Ras i K-Ras), stąd nazwa (Ras, ang. *rat sarcoma*). Prawidłowy gen *ras* jest konserwatywny ewolucyjnie i wszystko wskazuje na to, że występuje on powszechnie u *Eukaryota*, poczynając od drożdży, a kończąc na ssakach. Do rodziny białek Ras ssaków należą (oprócz wyżej wymienionych) m.in. także białka: N-Ras, R-Ras, M-Ras, Rap1A, Rap1B, RalA, RalB i inne. Komórki ludzkie zawierają cztery homologiczne białka Ras: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A i K-Ras4B, kodowane przez trzy geny (*H-ras*, *N-ras* i *K-ras*). Białka te zbudowane są ze 188 lub 189 reszt aminokwasowych, z których pierwszych 85 jest identycznych we wszystkich czterech izoformach. Dalsze 80 aminokwasów wykazuje ponad 80% podobieństwa w sekwencji aminokwasowej, natomiast sekwencja pozostałych ponad 20 reszt aminokwasowych jest bardzo zróżnicowana. Pierwszych 165 aminokwasów N-końcowych zawiera większość funkcjonalnie istotnych domen tych białek poza motywem CAAX, w którym C oznacza resztę cysteiny, A – aminokwas alifatyczny, a X – metioninę lub serynę (w pro-Ras). Większość białek Ras i Rho zawiera ten charakterystyczny tetrapeptyd. W trakcie obróbki potranslacyjnej sekwencja AAX zostaje odcięta enzymatycznie, a C-końcowa cysteina wiąże reszty farnesylowe (C15). Katalizowane odpowiednimi transferazami dołączenie reszty prenylowej ma podstawowe znaczenie dla aktywności biologicznej białek Ras, ponieważ umożliwia ich właściwą lokalizację subkomórkową, przez zakotwiczenie przy wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Zahamowanie procesu prenylacji białek Ras próbuje się wykorzystać w osłabieniu przekazywanego przez białka Ras sygnału do proliferacji w jednej z nowych metod terapii przeciwnowotworowej.

Wszystkie zaktywowane (+GTP) białka Ras wiążą się z tym samym zestawem białek efektorowych, ale wiele dowodów doświadczalnych wskazuje na to, że poszczególne izoformy mogą pełnić odmienne funkcje biologiczne. Także onkogenne formy białek Ras różnią się częstością występowania w różnych typach nowotworów. Zmutowane K-Ras występują w około 90% raków trzustki, 50% raków okrężnicy i 30% raków płuc, podczas gdy mutanty białek N-Ras i H-Ras są w tych typach nowotworów rzadkością.

Białka Ras wiążą 1 mol GTP (GDP) na 1 mol białka i mają zdolność hydrolizy związanego GTP do GDP i fosforanu nieorganicznego (P_i). Wyraźne podobieństwo strukturalne tych białek do podjednostki α białek G sugerowało, że białka te funkcjonują jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik sygnału indukowanego przyłączeniem liganda do receptora błonowego, podobnie do białek G. Tym bardziej, że *in vivo* białka Ras są przyłączone do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej przez resztę prenylową (i palmitynową). Mimo że wielu autorów opisywało aktywność wzmagającą dysocjację kompleksu Ras–GDP, nie było jasne, czy istnieją cząsteczki pośredniczące w regulacji układu Ras–GDP/Ras–GTP w odpowiedzi na stymulację zewnętrzną. Prawdziwy stymulator wymiany GDP/GTP powinien bowiem funkcjonować jako

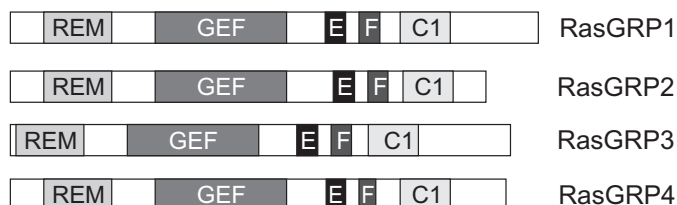
mediator zwrotny sygnału receptor \leftrightarrow białko Ras. W trakcie ostatnich kilkunastu lat ustalono sekwencję aminokwasową szeregu białek drożdży o aktywności czynnika wymiany nukleotydów guaninowych, określonych jako *cdc25*, *Scd25*, *Ste6*. Wykazano również, że białko muszki owocowej Sos (ang. *Son of sevenless*) funkcjonuje jako czynnik wymiany nukleotydów i przekaźnik sygnału, pomiędzy kinazą tyrozynową receptorów a białkami Ras. Wreszcie otrzymano ssacze homologu białka *cdc25* i Sos, mające w części C-końcowej domenę katalityczną, określaną jako domena *cdc25*. Stwierdzono, że jeden z nich, nazwany GRF (ang. *guanine-nucleotide releasing factor*) stymuluje wymianę Ras-GDP/Ras-GTP w odpowiedzi na stymulację zewnętrzną. Dzisiaj wszystkie białka stymulujące wymianę GDP na GTP określane są skrótem GEF. Białka Ras mogą uczestniczyć w przenoszeniu sygnałów inicjujących wiele różnych procesów biologicznych, m.in. w: stymulacji wzrostu fibroblastów, transformacji fibroblastów, proliferacji i różnicowaniu komórek hematopoetycznych, aktywacji limfocytów T, różnicowaniu komórek nerwowych i inhibicji wzrostu komórek epitelialnych. Podstawowym pytaniem było, w jaki sposób aktywacja Ras powiązana jest ze stymulowaną hormonalnie aktywacją kinazy tyrozynowej receptora. Odpowiedź na to pytanie przyniosła seria prac opublikowanych w roku 1993 o udziale białka Grb2 (zob. rozdział 3.2) w swoistej interakcji z białkami regulującymi reakcję wymiany nukleotydów guaninowych. Białko to zbudowane jest prawie wyłącznie z domen SH2 i SH3 i pełni rolę cząsteczki adaptorowej w pierwszej fazie przekazu sygnału od receptora błonowego do jądra komórki. Z jednej strony Grb2 łączy się domeną SH2 z fosfotyrozyną receptora, z drugiej Grb2 wiąże się swoimi domenami SH3 z białkiem stymulującym wymianę nukleotydów guaninowych (GEF) i w ten sposób aktywuje białko Ras (Rys. 4.4). W wyniku wiązania liganda przez receptor mający aktywność kinazy tyrozynowej następuje pierwotnie dimeryzacja receptorów, ich autofosforylacja (zob. rozdział 2.3) oraz udostępnienie fosfotyrozyn, do których mogą się wiązać białka mające domeny SH2. Te z kolei wiążą białka o aktywności



Rys. 4.4. Zewnątrzkomórkowa aktywacja białek Ras za pośrednictwem białka adaptorowego Grb2 i czynnika stymulującego wymianę nukleotydów GEF

czynników wymiany nukleotydów guaninowych (GRF, Sos). Zmiany konformacyjne tych ostatnich powodują ich aktywację i stymulację, wymianę GDP na GTP w kompleksach białek Ras–GDP. Aktywacja białek Ras powoduje uruchomienie kaskady reakcji enzymatycznych, uczestniczących w dalszych etapach przekazywania sygnału. Inhibitorami sygnału przekazywanego od receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej na kaskadę kinaz MAP są białka (znane są cztery takie białka ssaków) określane terminem Sprouty.

Aktywność białek Ras jest regulowana przez swoistą klasę czynników stymulujących wymianę nukleotydów guaninowych (poza znanymi GEF białek Ras, takimi jak: Sos1, Sos2, RasGRF-1, RasGRF-2), określaną jako białka uwalniające nukleotydy guaninowe z białek Ras, tzw. RasGRP (ang. *Ras guanyl-nucleotide releasing protein*). Cechą różniącą RasGRP od klasycznych GEF białek Ras jest obecność w ich strukturze: domeny wiążącej DAG i dwóch motywów dłoni EF wiążących jony wapnia. Dotychczas opisano cztery geny kodujące białka RasGRP (1–4), o różnej lokalizacji tkankowej i specyficzności substratowej (w obrębie rodziny Ras/Rap), których strukturę domenową przedstawia rysunek 4.5. Białko RasGRP1 człowieka zbudowane jest z 797 reszt aminokwasowych. Białko RasGRP2 występuje w dwóch izoformach: dłuższej, zbudowanej z 671 reszt aminokwasowych, i krótszej, pozbawionej 62 aminokwasów N-końcowych. Białka RasGRP3 i RasGRP4 zbudowane są odpowiednio z 690 i 673 reszt aminokwasowych. Wszystkie te białka mają, poczynając od N-końca łańcucha peptydowego, domeny REM (ang. *Ras exchange motif*), GEF (ang. *guanine-nucleotide exchange factor*), obie tworzące katalityczną część cząsteczki RasGRF, dwa motywy dłoni EF oraz domenę C1. Domena REM, zbudowana z ponad 100 reszt aminokwasowych, współuczestniczy w katalitycznej funkcji białek RasGRP, a jej delecja dezaktywuje te białka. Domena GEF jest najbardziej konserwatywnym ewolucyjnie fragmentem białek GEF, zbudowanym z około 230 reszt aminokwasowych. Obecność tej domeny warunkuje zdolność wymiany nukleotydów przez białka GEF. Za domeną GEF znajdują się dwa motywy dłoni EF, zbudowane odpowiednio z 22 i 14 reszt aa. Rola motywów EF, wiążących jony wapnia, w strukturze białek RasGRP jest trudna do jednoznacznej interpretacji. Wykluczono udział jonów wapnia w wiązaniu białek G. Domena C1, zlokalizowana na C-końcu łańcucha peptydowego, posiada zdolność wiązania DAG i jego analogów. Jest zbudowana z około 50 aminokwasów i przypomina strukturę palca cynkowego.

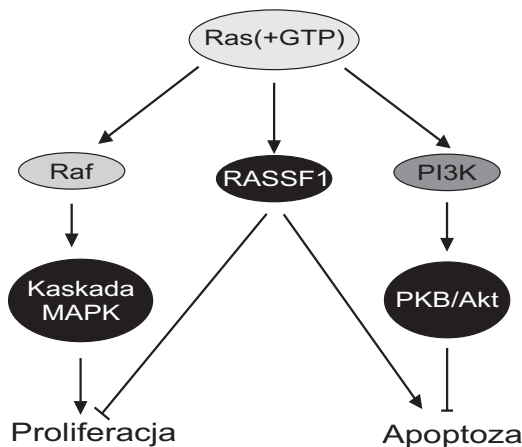


Rys. 4.5. Domenowa budowa białek RasGRP

Głównymi aktywatorami białek RasGRP są DAG i jego analogi, w tym estry forbolu. Rodzaj fizjologicznego aktywatora (DAG) wskazuje, że sygnał do aktywacji białek RasGRP jest przekazywany za pośrednictwem fosfolipazy C (PLC; rozdział 6.3). Obecnie znanych jest 12 izoform PLC, dzielonych zazwyczaj na pięć klas: PLC β (regulowana przez receptory zasocjowane z białkami G), PLC γ (aktywowana przez kinazy tyrozynowe receptorowe), PLC δ (regulowana poziomem jonów wapnia), PLC ϵ (aktywowana zarówno przez GPCR [G12/13 + Rho, Gs + CA], jak i przez KTR + Ras) oraz PLC ζ . Istnieją także dowody doświadczalne na aktywację RasGRP przez fosforylację wybranych reszt seryny i treoniny katalizowanej przez kinazę białkową C. Aktywacja białek RasGRP powoduje ich translokację do struktur błonowych, poza krótszą izoformą RasGRP2, co jest uzasadnione lokalizacją białek efektorowych (Ras).

Aktywacja białek Ras prowadzi do uruchomienia różnych szlaków sygnalizacji komórkowej, m.in. kaskady kinaz MAP, RalGEF/Ral. Dezaktywacja białek RasGRP następuje pod wpływem działania kinazy diacyloglicerolu (DGK), która katalizuje reakcję fosforylacji DAG do kwasu fosfatydowego. Znanych jest dziewięć izoform DGK (α - τ).

Białkami efektorowymi dla rodziny Ras są m.in.: kinazy serynowo-treoninowe Raf (ang. *Ras activated factor*): Raf-1, A-Raf i B-Raf, kinaza 3-fosfoinozytydów (PI3K), fosfolipaza C ϵ , jeden z czynników stymulujących wymianę nukleotydów w białkach Ral (RalGDS), białko aktywujące GTP-azę Ras (p120RasGAP), a także białko adaptorowe AF-6 (ang. *ALL-1 fusion partner from chromosome 6*), zaangażowane w regulację adhezji komórkowej. Kinazy Raf i PI3K wiążą się z Ras przez domeny RBD (ang. *Ras-binding domain*), a RalGDS/AF6 przez domeny RA (ang. *Ras association*). W 2000 roku opisano nowe białka efektorowe dla Ras określane skrótem RASSF (ang. *RAS-association domain family*), do których obecnie zalicza się osiem białek (RASSF 1–8), wiążących się swoiście z białkami Ras (+GTP) przez



Rys. 4.6. Główne drogi sygnalizacji wewnątrzkomórkowej aktywowane białkami Ras

domeny RA. Wiązanie białek Ras z określonymi białkami efektorowymi inicjuje jedną z wielu dróg sygnałowych, mogących stymulować zróżnicowaną odpowiedź biologiczną komórki (Rys. 4.6).

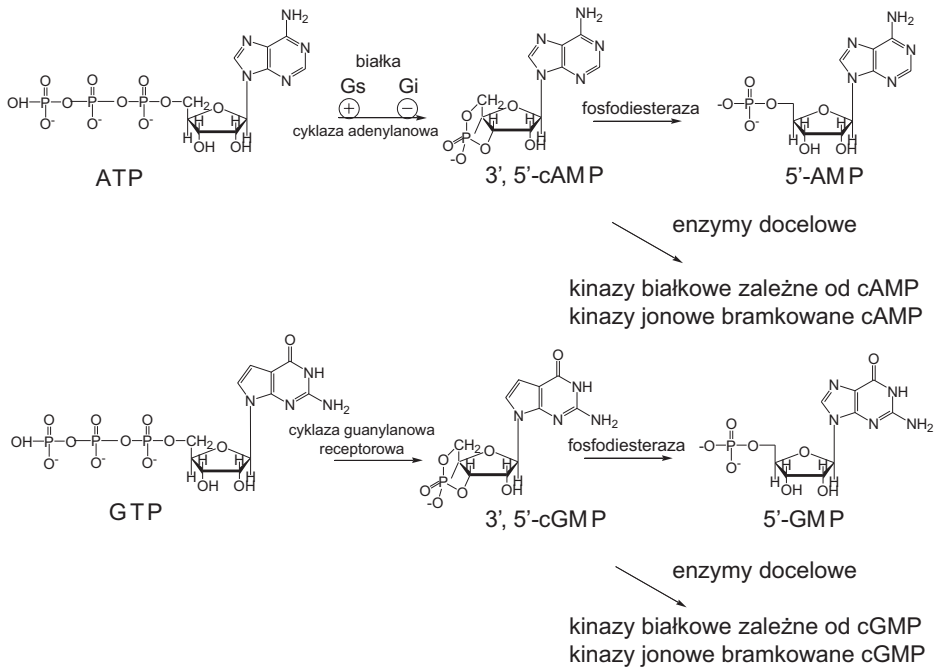
Jedną z ważniejszych dróg sygnalizacji stymulowanych działaniem białek Ras jest aktywacja kaskady kinaz MAP. Inną – aktywacja kinazy białkowej B (PKB, Akt) za pośrednictwem PI3K, a jeszcze inną aktywacja białek RASSF. Każda z tych dróg sygnałowych może inicjować inną odpowiedź komórki. Stymulacja kinaz MAP jest zaangażowana w sygnał mitogeny, stymulacja Akt w sygnał anty-apoptotyczny, a stymulacja RASSF1 w zahamowanie proliferacji i indukcję apoptozy. Stąd białka RASSF są zaliczane do supresorów nowotworowych. Sytuację komplikuje fakt, że kinazy tyrozynowe receptorowe mogą włączać równocześnie wiele sygnałów wewnątrzkomórkowych, np. przez równoczesną stymulację białek Ras i fosfolipazy C (PLC). Wyłączenie sygnału następuje wskutek hydrolizy Ras-GTP, stymulowanej u ssaków przez białka GAP. Białka te wiążą się swoiście z kompleksem Ras-GTP i stymulują hydrolizę trifosforanu (GTP) do difosforanu (GDP). Opisano wiele białek o aktywności GAP, mających na swoim N-końcu charakterystyczne domeny SH2 i mogących oddziaływać m.in. z resztami fosfotyrozyny receptorów czynników wzrostowych. Wykazano także, że genomy wielu komórek nowotworów ludzkich mają zmutowane allele genu *ras*. Przeniesienie tych genów do komórek prawidłowych powodowało ich transformację, a białka transformujące zawierały mutację określonej reszty aminokwasowej, najczęściej Gly¹² i Gln⁶¹.

Rodzina białek Rho/Rac obejmuje polipeptydy określane jako: RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG, TC10, Rac1A, Rac1B, Rac2, CD42Hs i G25K. Białka te odgrywają istotną rolę w reorganizacji cytoszkieletu oraz w przenoszeniu sygnału wewnątrzkomórkowego inicjowanego różnymi czynnikami zewnątrzkomórkowymi. Nie ulega dziś wątpliwości, że różne rodzaje małych GTP-az współuczestniczą w regulacji wielu szlaków metabolicznych. Przykładem może być udział białek Ras, Rac i Rho w stymulacji mitogennej. Podstawowa rola białek Ras w umożliwieniu przejścia komórek przez fazę G1 jest dobrze udokumentowana doświadczalnie. Nowością jest udział białek Rac i Rho w tym procesie. Wykazano m.in., że z jednej strony białka Rac stymulują transkrypcję cykliny D1 i aktywują kompleks cykliny D1-cdk4/6, a z drugiej strony białka Rho powodują inhibicję transkrypcji inhibitora cyklin p21^{cip} i degradację inhibitora p27^{kip}. Wszystkie te zdarzenia wzmacniają sygnał mitogeny i umożliwiają wejście komórek w fazę S. Niestety, ta współpraca białek superrodziny Ras może mieć także katastrofalne konsekwencje. Wiele faktów doświadczalnych wskazuje na udział tych białek w promocji procesu nowotworowego, także w fazie tworzenia przerzutów. Proces metastazy wymaga koordynacji różnych funkcji komórkowych, jak proliferacja, migracja, proteoliza składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i zahamowanie apoptozy, a mechanizm tego procesu jest jeszcze daleki od wyjaśnienia. Niemniej jednak wykazano udział białek Ras, Rho i Rac w stymulacji ekspresji genów białka CD44 (adhezja, migracja), proteaz ECM (degradacja macierzy), czynnika wzrostu endotelialnych komórek naczyń (angiogeneza) i PI3K (inhibicja apoptozy).

4.3. Cyklazy nukleotydowe

Cyklazy nukleotydowe to enzymy katalizujące reakcje przekształcenia odpowiednich trifosforanów nukleotydów w cykliczne formy odpowiednich mononukleotydów. Z punktu widzenia przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego najważniejsze są: cyklaza adenylanowa i cyklaza guanylanowa. Obie te cyklazy stymulują tworzenie cyklicznych nukleotydów (Rys. 4.7), pełniących funkcję klasycznych wtórnych przekaźników informacji hormonalnej. Cykliczne nukleotydy to nukleotydy, w których reszta fosforanowa estryfikuje równocześnie dwie grupy hydroksylowe rybozy, przy węglach 3' i 5'. cAMP i cGMP pośredniczą w aktywacji kinaz białkowych serynowo-treoninowych: kinazy białkowej A i kinazy białkowej G (zob. rozdział 5.1.1). Oprócz tego wymienione nukleotydy regulują działanie wybranych kanałów jonowych. Sygnał przenoszony przez cykliczne nukleotydy jest wygaszany (obniżenie poziomu cyklicznych nukleotydów) przez hamowanie aktywności cyklaz nukleotydowych i/lub degradację cyklicznych nukleotydów pod działaniem odpowiednich fosfodiesteraz (Rys. 4.7).

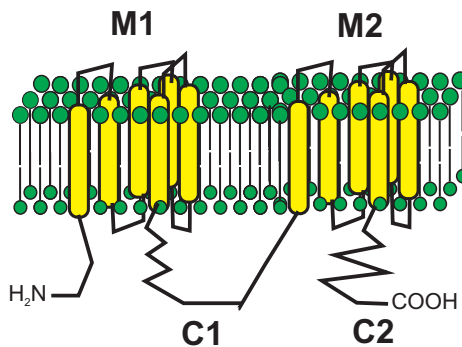
Cyklaza adenylanowa jest enzymem katalizującym powstawanie cyklicznego adenyzymonofosforanu (cAMP) z ATP. Dotychczas poznano strukturę dziewięciu izoenzymów cyklazy adenylanowej ssaków, oznaczonych symbolami od AC-1 do AC-9 (lub AC I – AC IX), różniących się sekwencją aminokwasową (50–80% homologii) i lokalizacją tkankową.



Rys. 4.7. Synteza i degradacja enzymatyczna „drugich przekaźników” informacji biologicznej: cAMP i cGMP

Wszystkie poznane izoenzymy występują w mózgu, a obecność izoenzymów AC-4, AC-5 i AC-7 stwierdzono we wszystkich badanych tkankach (jądrach, mózgu, nerkach, płucach, sercu, wątrobie). Cyklaza adenylnowa jest białkiem transbłonowym o m.cz. 110–180 kDa (w zależności od typu izoenzymu), w którym można wyróżnić dwie hydrofobowe domeny transbłonowe, każda sześciokrotnie przebijająca błonę komórkową, i dwie duże (wewnątrzkomórkowe) domeny hydrofilowe C1 i C2 (po około 300 aminokwasów każda) odpowiedzialne za wiązanie podjednostki α białek G (Rys. 4.8). Funkcjonuje wyłącznie w obrębie błony komórkowej i stanowi 0,001–0,01% wszystkich białek błonowych. Zarówno N-, jak i C-koniec tego polipeptydu zlokalizowane są wewnątrz komórki. Naturalnym regulatorem aktywności cykazy adenylnowej są białka G, poza izoenzymem AC-8 (i prawdopodobnie AC-1), którego stymulatorem jest kalmodulina. Ale aktywność poszczególnych izoform AC jest regulowana przez różne białka, a nawet podjednostki białek G. Wszystkie rodzaje AC są stymulowane działaniem białek G_s, natomiast tylko AC-2, AC-5 i AC-6 są hamowane działaniem białek G_i. Wynika stąd, że podjednostka α s stymuluje wszystkie izoformy AC, a hamuje tylko niektóre z nich. Kompleks podjednostek $\beta\gamma$ stymuluje wyłącznie AC-2, AC-4 i AC-7, a hamuje AC-1. Cyklaza adenylnowa jest jednym z najlepiej poznanych układów efektorowych, którego podstawową rolą jest udział w amplifikacji (wzmocnieniu) sygnałów zewnątrzkomórkowych w wyniku syntezy dużej liczby cząsteczek wtórnego przekaźnika (cAMP).

Cyklaza guanylanowa jest enzymem katalizującym powstawanie cGMP z GTP. Występuje w dwóch formach: rozpuszczalnej (sGC) – zlokalizowanej wewnątrz komórki i związanej (pGC) z błoną komórkową. sGC jest hemoproteiną o m.cz. około 150 kDa, zbudowaną z dwóch podjednostek, różniących się wielkością: α (m.cz. 73–82 kDa) i β (m.cz. 70–74 kD) i/lub sekwencją aminokwasów w zależności od pochodzenia (tkanka/gatunek). Różnice te nie dotyczą centrum katalicznego (sekwencja około 250 aminokwasów) GC, którego struktura pierwszorzędowa jest bardzo podobna dla izoform sGC i pGC. Aktywatorami sGC są: kwasy tłuszczowe i ich metabolity, tlenek azotu i cząsteczki zawierające grupę NO (np. nitrogliceryna). Mechanizm



Rys. 4.8. Transbłonowa lokalizacja cykazy adenylnowej. M1 i M2 – pętle zewnątrzkomórkowe, C1 i C2 – domeny wewnątrzkomórkowe wiążące podjednostki α białek G

aktywacji sGC jest niejasny. W przypadku NO i związków pochodnych aktywacja następuje po połączeniu NO z hemem GC. Duże ilości sGC stwierdzono w płucach, wątrobie, mózgu, sercu i mięśniach gładkich naczyń krwionośnych ssaków. pGC jest glikoproteiną zbudowaną z jednego łańcucha peptydowego o charakterze białka integralnego błony komórkowej. Znanych jest wiele form pGC, które podzielono na dwie grupy: enzymy związane z błoną komórkową (GC-A, GC-B i GC-C) oraz enzymy występujące w rzęskach pierwotniaków i układach fotoreceptorowych kręgowców (GC zależne od Ca^{2+}). Enzymy związane z błoną komórkową są monomerami o m.cz. 114–180 kDa i budowie typowej dla receptorów błonowych, których część efektorowa zawiera domenę katalityczną. GC-A i GC-B są receptorami hormonów sodopędnych, np. przedsionkowego peptydu sodopędnego (ANP), regulującego natriurezę, diurezę, wazodylatację, sekrecję aldosteronu. GC-C jest receptorem enterotoksyn bakteryjnych (np. enterotoksyny salmonelli), a konsekwencją nadprodukcji cGMP w śluzówce przewodu pokarmowego jest biegunka. Enzymy zależne od Ca^{2+} nie są receptorami dla ligandów zewnątrzkomórkowych. Najlepiej poznany przedstawiciel tej grupy GC, phot-GC (fotoreceptorowy) jest związany z cytoszkieletem segmentów zewnętrznych fotoreceptorów. Cząsteczka phot-GC jest białkiem o m.cz. 110–115 kDa, w którym można wyróżnić dużą domenę zewnątrzkomórkową (około 410 aminokwasów) oraz domenę katalityczną (250–260 aminokwasów), zlokalizowaną wewnątrz komórki. Mechanizm aktywacji phot-GC nie jest znany, przyjmuje się, że do aktywacji tej GC dochodzi przy dziesięciokrotnym spadku stężenia Ca^{2+} we wnętrzu fotoreceptora.

4.4. Tlenek azotu

Ostatnie kilkadziesiąt lat przyniosło lawinę doniesień na temat wolnych rodników i innych drobnocząsteczkowych związków pełniących ważną funkcję w wielu stanach fizjologicznych i patologicznych. Początkowo sądzono, że reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) i azotu (RNS, ang. *reactive nitrogen species*), podobnie jak tlenek węgla (CO) i siarkowodór (H_2S) są głównie cytotoksyczne. Dzisiaj wiemy, że związki te odgrywają ważną rolę w procesach obrony immunologicznej i uczestniczą w wielu drogach przenoszeniach sygnału. Najlepszym przykładem takiej cząsteczki pełniącej zarówno funkcję cytotoksyczną, jak i cytoprotekcyjną jest tlenek azotu.

Tlenek azotu (NO) jest gazem bezbarwnym, słabo rozpuszczalnym w wodzie, o właściwościach paramagnetycznych (wolny rodnik). W układach biologicznych NO jest cząsteczką sygnałową, odgrywającą istotną rolę w utrzymaniu homeostazy układu krążenia, w przewodnictwie nerwowym, niespecyficznej odpowiedzi odpornościowej organizmu. Szczególne zainteresowanie biologów NO zapoczątkowane zostało odkryciem przez S. Moncada i wsp. (1987) tego, że związek ten pełni funkcję śródbłonkowego czynnika rozkurczającego naczynia – EDRF (ang. *endothelium-derived relaxing factor*). Obecność NO stwierdzono w wielu różnych komórkach ssaków, w których jest on syntetyzowany z argininy w tzw. skróconym cyklu mocznikowym.

Przyjmuje się, że istnieją dwie podstawowe izoformy enzymów katalizujących syntezę NO: konstytutywna syntaza NO (cNOS) i indukowalna syntaza NO (iNOS).

Konstitutywna cNOS odpowiedzialna jest za ciągłe generowanie pikomolowych ilości NO, biorących udział w utrzymaniu homeostazy krew/ściana naczyń krwionośnych (eNOS) i w neurotransmisji (nNOS). iNOS (makrofagowa iNOS), aktywowana cytokinami, leukotrienami i toksynami bakteryjnymi, syntetyzuje nanomolowe ilości NO, który uczestniczy w odpowiedzi obronnej organizmu. Nie jest to jedyny opisany podział NOS. Proponowano też m.in. podział tych enzymów na zależne od kalmoduliny i Ca^{2+} (nNOS i eNOS) oraz niezależne od kalmoduliny i Ca^{2+} (iNOS) lub podział na izoformy mitochondrialne i cytozolowe.

Molekularny mechanizm działania tlenu azotu jest złożony i wielokierunkowy. NO może reagować bezpośrednio z jonami metali przejściowych, będącymi elementami grup prostetycznych enzymów i czynników transkrypcyjnych czy rodnikami lipidowymi, oddziaływać z rozpuszczalną formą cyklazy guanylanowej (sGC) i z hemoglobina lub pośrednio, przez związki powstałe w wyniku oddziaływania z anionorodnikiem ponadtlenkowym (nadtlenoazotyn) czy tlenem cząsteczkowym (tlenek azotu III (N_2O_3) i produkty jego rozpadu). W obecności rodników ponadtlenkowych (O_2^-) NO przekształcany jest w nadtlenoazotyn (ONOO^-). Ten bardzo reaktywny związek może utleniać reszty tiolowe do kwasu sulfonowego oraz modyfikować reszty aminokwasowe (Cys, Met, Trp, Tyr), powodując zmiany strukturalne i funkcjonalne peptydów oraz białek. Nadmierna produkcja nadtlenoazotynu prowadzi do upośledzenia wielu szlaków metabolicznych i rozwoju stanów patologicznych. Poziom nadtlenoazotynu obniża reduktaza azotynowa, która redukuje ten związek do tlenu azotu.

N_2O_3 ulega rozpadowi do jonu nitrozoniowego (NO^+) i azotynu. W wyniku reakcji jonu nitrozoniowego z grupami tiolowymi białek (reakcja S-nitrozylacji) powstają S-nitrozotiazole. Jest oczywiste, że taka modyfikacja (odwracalna) białek ma kluczowe znaczenie w modyfikacji struktury i funkcji wielu białek, m.in. tych, które biorą udział w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (kinazy i fosfatazy białkowe, białka G itp.).

Tlenek azotu pośredniczy w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów także na innej drodze. Udowodniono, że związek ten jest fizjologicznym aktywatorem cytoplazmatycznej cyklazy guanylanowej (sGC). Produkt jej działania, cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan (cGMP) może regulować aktywność wybranych enzymów, m.in.: kinaz białkowych aktywowanych cGMP (PKG, ang. *protein kinase G*), kinaz MAP, kinazy białkowej A (PKA), fosfodiesteraz, kanałów jonowych bramkowanych cGMP oraz niektórych czynników transkrypcyjnych (CREB, ATF-1, AP-1, NF- κ B). Wiadomo też, że NO pośredniczy w regulacji procesu fosforylacji wybranych białek (np. Akt i p53).

Tlenek azotu może także uczestniczyć w regulacji aktywności związków o działaniu hormonalnym (czynników wzrostowych i cytokin). Spektakularnym przykładem jest reaktywacja TGF β przez uniemożliwienie ponownego wiązania TGF β do LAP, po S-nitrozylacji LAP. Podobnie wpływ na aktywność konwertaz (ICE, TACE) może być odpowiedzialny za uwalnianie aktywnych form interleukin (IL-1 β , TNF- α).

Tlenek azotu pośredniczy w regulacji ekspresji wielu genów, zarówno na etapie transkrypcji, jak i na etapach potranskrypcyjnych. Pierwsza z tych możliwości związana jest m.in. z modyfikacją struktury czynników transkrypcyjnych. Wiele z tych białek zawiera motyw palca cynkowego, odpowiedzialnego za wiązanie z DNA.

Tlenek azotu ma zdolność usuwania jonów cynku, a w wyniku tego może hamować proces transkrypcji. Także S-nitrozylacja zmienia aktywność transkrypcyjną wybranych czynników transkrypcyjnych (NF- κ B, AP-1). Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów dotyczy wpływu tlenu azotu na niektóre białka uczestniczące w procesie translacji.

Przypuszcza się, że odpowiedź komórkowa na działanie NO jest zależna od jego stężenia. D.D. Thomas i wsp. zaproponowali pięć różnych poziomów stężenia tlenu azotu: a) poniżej 30 nM, aktywujące procesy z udziałem cGMP, b) 30–100 nM, sprzyjające procesowi fosforylacji Akt, c) 100–300 nM, stabilizujące HIF-1 α , d) >400 nM, sprzyjające procesowi fosforylacji p53 i e) >500 nM, powodujące stres nitrozowy i nieodwracalne zahamowanie oddychania mitochondrialnego.

Udział NO w regulacji ciśnienia i przepływu tkankowego krwi oraz hamowanie aktywacji płytek krwi, fibrynolizy i rozwoju blaszek miażdżycowych wskazuje na przeciwmiażdżycową funkcję tego związku. NO funkcjonuje także jako neurotransmitter, zarówno w ośrodkowym, jak i w obwodowym układzie nerwowym. Sugeruje się jego udział w procesach: rozwoju mózgu, uczenia się i pamięci oraz w regulacji czynności ruchowych i pobierania pokarmu. Niespecyficzne zwiększenie odporności organizmu na choroby infekcyjne i nowotworowe może być związane m.in. z cytostatycznym i cytotoksycznym działaniem NO, syntetyzowanego przez stymulowane komórki: makrofagów, leukocytów, limfocytów, hepatocytów, fibroblastów i innych. Mimo intensywnych badań wiedza o mechanizmie działania i funkcji fizjologicznej NO jest nadal niepełna.

Literatura uzupełniająca

- Abankwa D., Gorfe A.A., Hancock J.F. Ras nanoclusters: molecular structure and assembly. *Sem. Cell Dev. Biol.* 2007, 18, 599–607.
- Dikic I., Giordano S. Negative receptor signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003, 15, 128–135.
- Ehrhardt A., Ehrhardt G.R.A., Guo X., Schrader J.W. Ras and relatives-job and networking keep and old family together. *Exp. Hemat.* 2002, 30, 1089–1106.
- Eisenberg S., Henis Y.I. Interaction of Ras proteins with the plasma membrane and their roles in signaling. *Cell. Signal.* 2008, 20, 31–39.
- Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 2000, 105, 90–113.
- Hofseth L.J. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *Cancer Lett.* 2008, 268, 10–30.
- Kobilka B.K. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1768, 794–807.
- McCudden C.R., Hains M.D., Kimple R.J., Siderovski D.P., Willard F.S. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol. Life Sci.* 2005, 105, 551–577.
- Navaro A., Boveris A. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 60, 1534–1544.
- Offermanns S. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003, 105, 101–130.
- Oszejca K., Szemraj J., Bartkowiak J. Udział tlenu azotu w regulacji ekspresji genów. *Post. Biochem.* 2007, 53, 254–262.

- Siderovski D.P., Willard F.S. The GAPs, GEFs and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* 2005, 105, 51–66.
- Sobierajska K., Fabczak H., Fabczak S. Kinazy receptorów sprzężonych z białkami G – ich regulacja i funkcja w komórce. *Post. Biochem.* 2005, 51, 421–429.
- Thomas D.D., Ridnour LA, Isenberg JS. et al. The chemical biology of nitric oxide: implication in sellular signaling. *Free Radical Biol. Med.* 2008, 45, 18–31.
- Van der Weyden L., Adams D.J. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1776, 58–85.
- Vetter I.R., Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001, 105, 1299–1304.

5. Kinazy białkowe niereceptorowe

Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa jest regulowana na drodze odwracalnej fosforylacji głównie przez trzy układy:

- a) kinazy i fosfatazy białkowe (fosforylacja i defosforylacja Tyr, Ser i Thr);
- b) kinazy i fosfatazy lipidów (fosforylacja i defosforylacja fosfatydyloinozytoli);
- c) cyklazy i fosfodiesterazy (ATP-cAMP-AMP, GTP-cGMP-GMP).

Kinazy białkowe są fosfotransferazami katalizującymi reakcje fosforylacji reszt określonych aminokwasów w białkach. Odkrycie procesu odwracalnej fosforylacji białek przez Edwina Krebbsa i Eda Fischera, leżącej u podstaw hormonalnej regulacji aktywności wielu enzymów, uhonorowane zostało w 1992 roku nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Kowalencyjna modyfikacja struktury białka przez fosforylację reszt wybranych aminokwasów ma podstawowe znaczenie w aktywacji wielu enzymów wewnątrzkomórkowych. W przeciwieństwie do proteolizy fosforylacja jest procesem odwracalnym i realizowanym wyłącznie wewnątrzkomórkowo (wymaga nakładu energii uzyskiwanej z hydrolizy ATP). Wyniki prac prowadzonych w ramach poznania ludzkiego genomu (Human Genom Project) wykazały, że około 20% spośród dwudziestukilku tysięcy genów koduje białka zaangażowane w transdukcję sygnału. Wśród nich jest ponad 520 kinaz i 130 fosfataz białkowych, sprawujących ścisłą kontrolę nad odwracalną fosforylacją białek. Najlepiej poznano dotąd enzymy zaliczane do kinaz serynowo-treoninowych i kinaz tyrozynowych, z których niektóre mają podwójną swoistość. Mimo ogromnej ich różnorodności wszystkie poznane kinazy eukariotyczne mają zbudowaną z około 270 aminokwasów domenę katalityczną o wysokim stopniu homologii. Najbardziej konserwatywną część cząsteczki tych kinaz białkowych stanowi sekwencja -G-X-G-X-X-G-X₁₅₋₂₀-K- (tzw. motyw Rossmanna), odpowiedzialna za wiązanie ATP i zlokalizowana zazwyczaj bliżej N-końca peptydu. Motyw ten nazywany jest także pętlą P (P-loop) w odróżnieniu od pętli katalitycznej (C-loop) i pętli aktywacji (A-loop), usytuowanych w C-końcowej części łańcucha kinaz białkowych i wykazujących podobieństwo w sekwencji aminokwasów. Pozostałe części cząsteczek kinaz białkowych różnią się sekwencją aminokwasową, a domena katalityczna posiada krótkie sekwencje aminokwasowe odróżniające kinazy serynowo-treoninowe od kinaz tyrozynowych.

Kinazy białkowe są zazwyczaj dzielone na dziewięć grup na podstawie ich strukturalnego podobieństwa (a nie swoistości substratowej czy lokalizacji komórkowej) w obrębie jednej grupy. Zazwyczaj wyróżnia się: kinazy tyrozynowe (np. EGFR, PDGFR, Src, Abl), kinazy podobne do kinaz tyrozynowych (np. IRAK, MLK), kinazy AGC (m.in. PKA, PKG, PKC), kinazy zależne od Ca²⁺/kalmodyliny (CAMKs), kinazy CK1 (np. CK1, Worm 6), kinazy CMGC (CK2, MAPK, GSK3, CLK), kinazy kaskady MAP, receptory o aktywności cyklazy guanylanowej (RGC) mające

nieaktywną domenę kinazową, kinazy nietypowe i inne kinazy białkowe niewykazujące wyraźnego podobieństwa do pozostałych ww. kinaz białkowych. Ze względu na swoistość substratową, czyli rodzaj fosforylowanego aminokwasu, wyróżnia się kinazy białkowe serynowo-treoninowe, tyrozynowe i o podwójnej swoistości. W niniejszym rozdziale zostaną omówione niektóre niereceptorowe kinazy białkowe, istotne z punktu widzenia funkcjonowania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych.

5.1. Kinazy białkowe serynowo-treoninowe

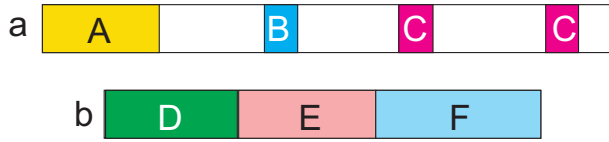
Seryno- i treoninoswoiste kinazy białkowe katalizują fosforylację białek na dwóch aminokwasach: Ser i Thr. Aktywność tych enzymów może być regulowana różnymi kofaktorami, drobno- i wielkocząsteczkowymi. Scharakteryzowano wiele kinaz serynowo-treoninowych biorących udział w przekazie sygnału wewnątrzkomórkowego, m.in.: kinazy AGC, cyklinozależne kinazy białkowe (kinazy cdk), kinazy aktywowane mitogenami (MAP), kinazy mTOR i kinazy zależne od Ca^{2+} /kalmoduliny, które zostaną omówione w tym rozdziale. Kinazy te uczestniczą w bardzo wielu procesach komórkowych, takich jak: transmisja sygnału hormonalnego, regulacja wzrostu komórkowego, regulacja metabolizmu węglowodanów, tłuszczy i białek, relaksacja mięśni, agregacja płytek krwi, proces widzenia i inne.

5.1.1. Kinazy białkowe AGC

Kinazy białkowe AGC (*cAMP dependent*, *cGMP dependent*, *protein kinase C*) są enzymami wykazującymi duży stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej, głównie w domenie kinazowej, aczkolwiek zarówno sposób ich aktywacji, jak i substraty komórkowe są całkowicie odmienne. Superrodzina tych kinaz liczy obecnie 63 białka, m.in. rodziny: PKA, PKB, PKC, PKG i PDK. Wszystkie wymienione poza PDK1 zawierają charakterystyczny motyw hydrofobowy -Phe-X-X-Phe-Ser/Thr-Tyr-. PDK1 (kinaza zależna od 3-fosfoinozytydu) jest uważana za kinazę nadrzędną, ponieważ może fosforylować inne kinazy AGC na resztach Ser/Thr znajdujących się w motywie hydrofobowym, co aktywuje te kinazy i pozwala związać odpowiedni substrat. Udział PDK1 w aktywacji kinaz AGC przedstawiono poniżej, na przykładzie aktywacji kinazy białkowej B.

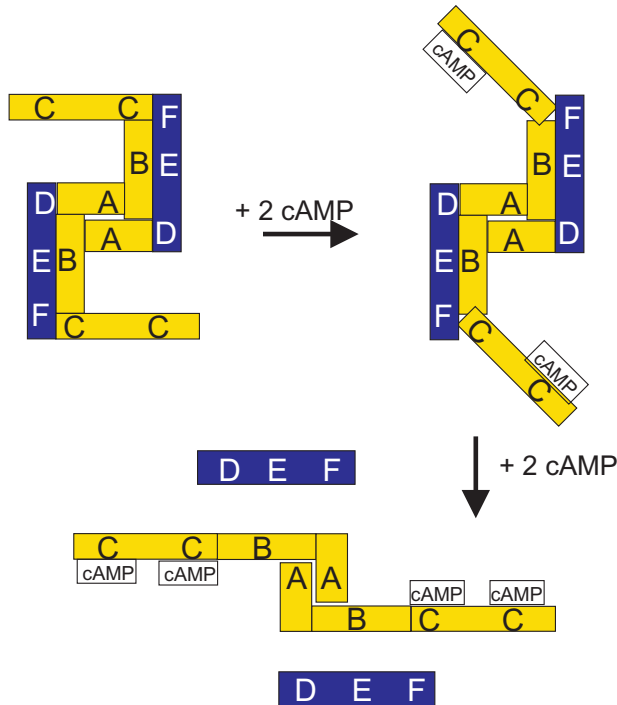
Kinaza białkowa A (PKA, ang. *protein kinase A*) jest zależną od cAMP kinazą białkową fosforylującą białka na serynie bądź na treoninie. PKA jest zbudowana z czterech podjednostek, dwóch regulatorowych (R) i dwóch katalitycznych (C). Obecnie znana jest struktura czterech podjednostek regulatorowych (RI α , RI β , RII α , RII β) oraz trzech podjednostek katalitycznych (C α , C β i C γ) człowieka. Podjednostki RI α , RII α i C α występują w większości tkanek, podjednostki RI β , RII β i C β – głównie w tkankach mózgowych.

Podjednostki regulatoryjne różnią się składem aminokwasowym i masą cząsteczkową (49–58 kDa), natomiast podjednostki katalityczne są podobnej wielkości (40 kDa).



Rys. 5.1. Domenowa budowa podjednostki regulatorowej (a) i katalitycznej (b) kinazy białkowej A (PKA). Domeny: dimeryzacji (A), autoinhibicji (B), wiążąca cAMP (C), wiążąca ATP (D), wiążąca substrat (E) i wiążąca podjednostki (F)

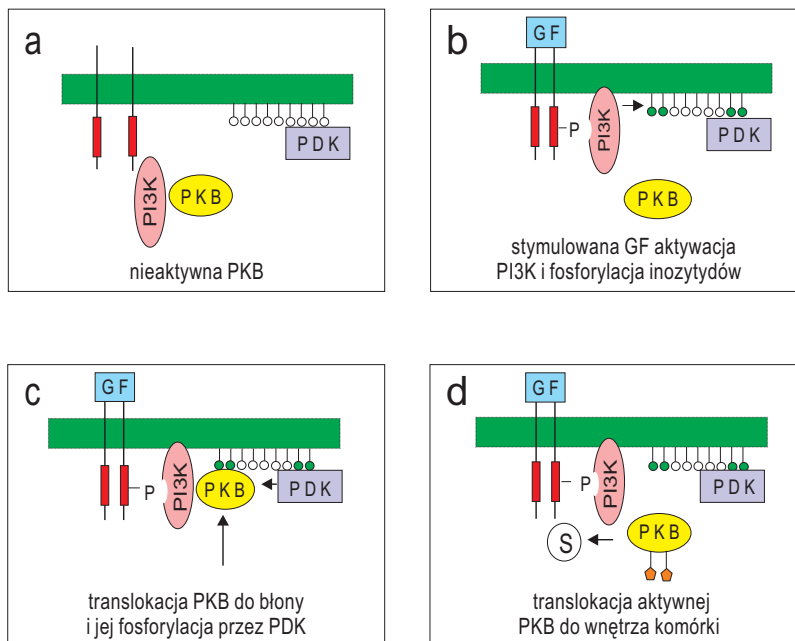
Wszystkie podjednostki regulacyjne mają podobną budowę domenową. Poczynając od N-końca, wyróżnia się domenę hydrofilową odpowiedzialną za tworzenie dimeru R-R (A), następnie domenę autoinhibicji (B) oraz dwie domeny wiążące cAMP (C), jedną wewnątrz cząsteczki, a drugą przy jej C-końcu (Rys. 5.1). W podjednostkach katalitycznych wyróżnia się domenę wiążącą ATP (D), znajdującą się na N-końcu łańcucha peptydowego, domenę (E) wiążącą substrat (wewnątrz cząsteczki) oraz domenę (F) odpowiedzialną za wiązanie z podjednostką regulacyjną.



Rys. 5.2. Schemat aktywacji kinazy białkowej A. ■ – podjednostka regulatorowa, ■ – podjednostka katalityczna. Domeny oznaczone tak samo jak na rysunku 5.1

Aktywacja PKA polega na związaniu dwóch cząsteczek cAMP z każdą z dwóch podjednostek R enzymu. Najpierw następuje przyłączenie jednej cząsteczki cAMP do miejsca wiążącego, znajdującego się przy C-końcu podjednostki R, co powoduje zmiany konformacyjne łańcucha peptydowego, umożliwiające przyłączenie drugiej cząsteczki cAMP. Skutkiem związania dwóch cząsteczek cAMP jest dysocjacja podjednostek R i C, a w konsekwencji odsłonięcie centrum aktywnego enzymu (Rys. 5.2). Jednym z mechanizmów zapobiegających niespecyficzej aktywacji PKA jest jej asocjacja ze swoistymi białkami dokującymi AKAP (zob. rozdział 3.4).

Substratami PKA jest wiele enzymów, kanałów jonowych, czynników transkrypcyjnych i białek chromosomowych. Preferowaną sekwencją jest motyw -Arg-Arg-X-Ser/Thr-X-. Kinaza białkowa A uczestniczy w regulacji wielu procesów życiowych, m.in. pośredniczy w działaniu wielu hormonów, czynników wzrostowych i cytokin, które regulują podstawowy metabolizm komórkowy, proliferację i różnicowanie oraz odpowiedź odpornościową organizmu. Z drugiej strony PKA reguluje także syntezę i sekrecję wielu związków o aktywności hormonalnej oraz uczestniczy w regulacji aktywności transkrypcyjnej. Istotną rolę w swoistości działania poszczególnych izoform PKA odgrywa subkomórkowa lokalizacja podjednostek regulacyjnych. Podjednostki RI występują w cytoplazmie, natomiast podjednostki RII zlokalizowane są w błonach plazmatycznych (komórkowych, retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego). Rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe PKA, zapewniane przez białka dokujące



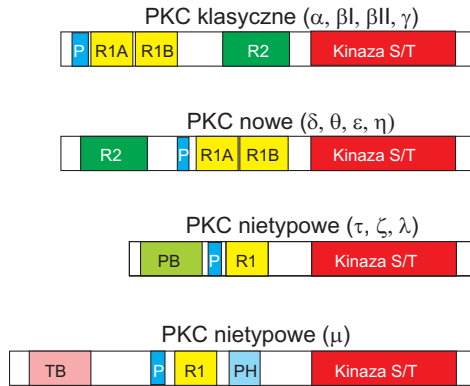
Rys. 5.3. Model aktywacji kinazy białkowej B (PKB/Akt). PI3K – kinaza 3-fosfoinozytydów, PKD – kinaza białkowa zależna od fosfatydyloinozytoli, GF – czynnik wzrostowy, S – substraty PKB, ○ – fosfoinozytyd, ● – 3-fosfoinozytyd, ◆ – fosfoseryna/fosfotreonina

AKAP, decyduje o dostępie do określonych substratów, a w rezultacie o swoistości działania różnych izoform kinazy białkowej A.

Kinaza białkowa B (PKB, ang. *protein kinase B*), znana jest także pod nazwą kinazy Akt (komórkowego odpowiednika produktu genu wirusowego *v-akt*). Scharakteryzowano trzy izoformy PKB ssaków: PKB α (c-Akt-1, RAC-PK α), PKB β (c-Akt2, RAC-PK β) i PKB γ (c-Akt-3, RAC-PK γ). N-końcowy fragment łańcucha kinazy białkowej B zawiera domenę PH, odgrywającą kluczową rolę w oddziaływaniu tej kinazy z fosfolipidami, uczestniczącymi w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (rozdział 3.1). Aktywność PKB wzrasta gwałtownie po działaniu insuliny i czynników wzrostowych. Pośrednim aktywatorem PKB jest kinaza 3-fosfoinozytydów (PI3K) (Rys. 5.3a). Przyjmuje się, że stymulowana PI3K synteza fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PI-3,4,5-P $_3$) i/lub fosfatydyloinozytolo-3,4-difosforanu (PI-3,4-P $_2$) (Rys. 5.3b) jest niezbędna dla translokacji PKB z cytozolu do błony komórkowej, gdzie staje się substratem dla kinaz białkowych zależnych od fosfatydyloinozytoli (głównie PDK1), które fosforylują ją (Rys. 5.3c) na treoninie 308 (Akt-1). Fosforylacja ta jest absolutnie niezbędna do aktywacji kinazy Akt. Natomiast fosforylacja seryny 517 (Akt-1) jest realizowana przez kompleks TORC2 (TOR-Rictor). O ile mechanizm fosforylacji Thr³⁰⁸ jest dobrze poznany, o tyle aktywacja kompleksu TORC2 i fosforylacja Ser⁵¹⁷ jest niejasna. Tylko fosforylacja obu ww. aminokwasów pozwala na pełną aktywację PKB, jej dysocjację od błony komórkowej i fosforylację substratów cytoplazmatycznych oraz jądrowych (Rys. 5.3d). Jak już wspomniano, PDK1 jest enzymem uczestniczącym w przenoszeniu sygnału na wiele różnych substratów, zarówno w sposób zależny (np. PKB), jak i niezależny (np. PKC) od PI3K.

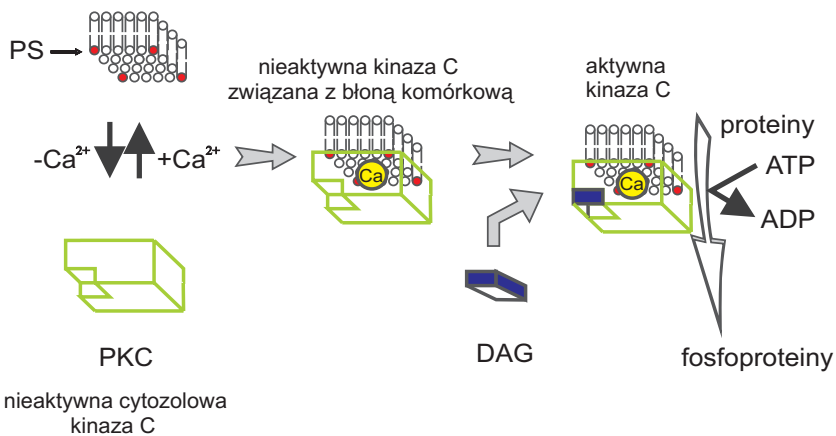
Wszystkie substraty PKB są fosforylowane w tym samym zasadowym motywie -Arg-X-Arg-X-X-Ser/Thr-. Znanych jest przynajmniej kilkanaście substratów, które dzieli się zazwyczaj na dwie grupy związków: cząsteczki uczestniczące w regulacji różnych procesów metabolicznych (synteza białek, metabolizm glikogenu, reakcje cyklu komórkowego) i substancje przekazujące sygnał do apoptozy. Do pierwszej grupy zalicza się m.in.: kinazę syntazy glikogenu-3, fosfodiesterazę 3B, białko adaptorowe IRS-1, inhibitor cyklin p21^{Cip/Waf} i kinazę Raf-1. Kinaza syntazy glikogenu-3 (GSK-3), której aktywność po fosforylacji obniża się, kontroluje z kolei takie procesy, jak synteza glikogenu (jest negatywnym regulatorem syntezy glikogenu) i synteza białek modulujących aktywność wybranych czynników transkrypcyjnych. Do tych ostatnich należy TCF/LEF-1 (ang. *T-cell factor/lymphocyte enhancer-binding factor-1*), uczestniczący w stymulacji ekspresji genów licznych białek, m.in. cykliny D1. Z kolei fosforylacja p21 powoduje zatrzymanie tego białka w cytoplazmie i zapobiega jego efektom antyproliferacyjnym. Natomiast do substratów PKB regulujących apoptozę należą m.in. proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2, głównie Bad i białko CREB (ang. *cAMP response element binding protein*), uczestniczące w regulacji transkrypcji. Dlatego aktywacja i dezaktywacja PKB są uważane za ważny etap w hormonalnej kontroli bardzo wielu procesów, nawet tak różnych, jak stymulacja wzrostu i apoptoza.

Kinaza białkowa C (PKC, ang. *protein kinase C*) jest kinazą białkową serynowo-treoninową, którą jej odkrywcy (M. Inoue i wsp.) określili jako kinazę białek histonowych zależną od jonów wapnia i fosfolipidów, aktywowaną przez diacyloglicerol



Rys. 5.4. Schemat budowy trzech rodzin izoform kinazy białkowej C (PKC). Domeny: R1 i R2 – regulatorowe, PB – wiążąca, P – pseudosubstratowa, TB – transbłonowa, PH – wiążąca 3-fosfoinozytydy, kinaza S/T – kinazy serynowo-treoninowej

(DAG). Występuje powszechnie w tkankach ssaków. Dotychczas scharakteryzowano 12 izoenzymów PKC ssaków, o określonej swoistości działania i różnej lokalizacji tkankowej. PKC α , δ i ζ występują powszechnie, PKC γ głównie w układzie nerwowym, PKC τ tylko w mięśniach szkieletowych i komórkach hematopoetycznych, a PKC ϵ głównie w skórze i płucach, ale większość komórek syntetyzuje więcej niż jeden typ PKC. Wiele izoform PKC ma podobną masę cząsteczkową, około 80 kDa, chociaż mogą występować znaczne odchylenia od tej wartości (np. PKC ϵ – 97 kDa, a PKC ζ – 64 kDa). Fizjologicznym aktywatorem PKC jest diacylglicerol, ale ze względu na zależność aktywacji od obecności bądź nieobecności jonów wapnia

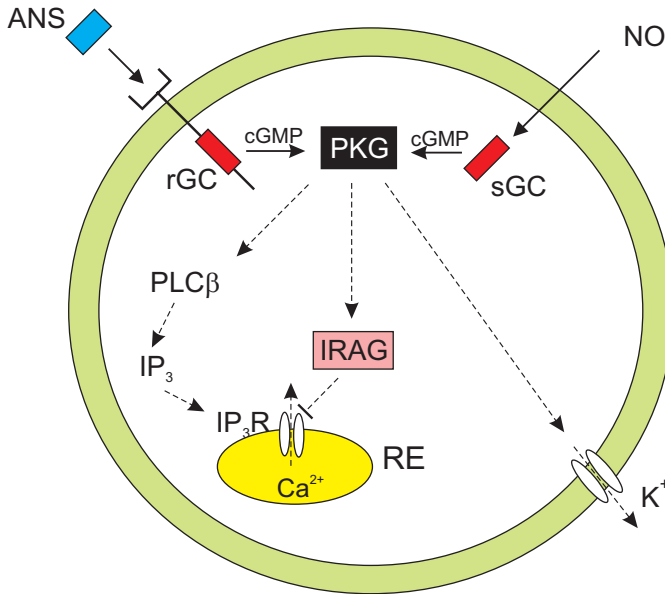


Rys. 5.5. Mechanizm aktywacji klasycznych kinaz białkowych C (PKC). PS – fosfatydyloseryna, DAG – diacylglicerol

i zdolności do wiązania estrów forbolu (które w niektórych przypadkach mogą zastępować DAG) przyjęto dzielić rodzinę PKC na trzy grupy. PKC klasyczne (α , β I, β II i γ) są zależne od Ca^{2+} i aktywowane przez estry forbolu, PKC nowe (δ , ϵ , η i θ) są niezależne od Ca^{2+} , ale mogą być aktywowane przez estry forbolu, oraz PKC nietypowe (ζ , λ , μ , τ), które są niezależne od Ca^{2+} i nie wiążą estrów forbolu (Rys. 5.4). Wszystkie trzy grupy enzymów mają domenę kinazy serynowo-treoninowej (S/T), zlokalizowaną przy C-końcu cząsteczki białka i różnie zlokalizowaną domenę pseudosubstratową (P). PKC klasyczne i nowe zawierają podwójną domenę regulatorową R1 (A i B) oraz pojedynczą domenę R2. W przypadku PKC klasycznych domena R2 jest zlokalizowana za domeną R1, co powoduje, że te izozymy wiążą jony wapnia i są regulowane przez diacyloglicerol (DAG). W przypadku PKC nowych domena R2 jest zlokalizowana przed domeną R1, czyniąc te enzymy niewrażliwymi na jony wapnia i regulowanymi wyłącznie przez DAG. Jeden z czterech izozymów PKC nietypowych (PKC μ) jest białkiem zakotwiczonym w błonie komórkowej domeną TM i zawiera dodatkowo domenę PH. Wszystkie PKC nietypowe pozbawione są domeny R2 i zawierają pojedynczą domenę R1, co powoduje, że są niezależne zarówno od jonów wapnia, jak i od diacyloglicerolu. Zamiast tego enzymy te zawierają domenę PB (ang. *protein binding*) odpowiedzialną za asocjację z innymi białkami mającymi taką samą domenę.

Aktywacja klasycznych izozymów PKC następuje po translokacji enzymu z cytozolu do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Wiązanie PKC z fosfolipidami błony zależy od obecności jonów wapnia i rodzaju fosfolipidów. Prawdopodobny mechanizm aktywacji PKC obejmuje kilka etapów (Rys. 5.5). W pierwszym cztery cząsteczki fosfatydyloseryny (PS) wiążą jeden jon Ca^{2+} poprzez grupy karboksylowe seryny. Następnie przyłącza się PKC, tworząc nieaktywny enzymatycznie kompleks PKC-4PS- Ca^{2+} . Związanie jednej cząsteczki DAG z tym kompleksem inicjuje zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu i jego aktywację, której wynikiem jest fosforylacja białek. Stechiometria i swoistość aktywacji PKC przez DAG jest charakterystyczna dla działania wtórnych przekaźników informacji biologicznej. Substratami tego enzymu *in vitro* jest bardzo wiele różnych białek, m.in.: kinaza fosforylaza glikogenu, syntaza glikogenu, miozyna, aktyna, troponina, liczne białka transportujące i białka kanałów jonowych, receptory (hormonów, neurotransmiterów i czynników wzrostowych), niektóre czynniki zaangażowane w regulację transkrypcji i translacji. PKC stymuluje także m.in. usytuowany w błonie komórkowej układ wymiany jonów Na^+/H^+ . Układ ten wykorzystuje skierowany do wnętrza komórki gradient jonów sodowych do aktywnego wypychania protonów na zewnątrz komórki i odgrywa podstawową rolę w homeostazie wewnątrzkomórkowego pH. Wiele procesów wewnątrzkomórkowych zależnych jest od pH, m.in. istotną rolę w sygnalizacji mitogennej odgrywa stymulowana podniesieniem pH inicjacja syntezy białek, zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego.

Na podstawie aktywności biologicznej PKC postuluje się jej udział w takich procesach, jak: a) regulacja lipogenezy i glikogenolizy, b) modyfikacja funkcji białek kurczliwych, c) pośredniczenie w sekrecji hormonów, neurotransmiterów i enzymów trawiennych, d) regulacja wewnątrzkomórkowego pH, e) regulacja procesów transkrypcji i translacji oraz f) regulacja wzrostu komórkowego.



Rys. 5.6. Wybrane sygnały wewnątrzkomórkowe z udziałem kinazy białkowej G (PKG). ANS – przedśionkowy peptyd natriuretyczny, NO – tlenek azotu, sGC/rGC – cyklasta guanylanowa niereceptorowa/receptorowa, PLCβ – fosfolipaza Cβ, IP₃ – inozytolo-(1,4,5)-trifosforan, IP₃R – receptor IP₃, RE – retikulum endoplazmatyczne, IRAG – zasocjowany z receptorem IP₃ substrat PKG

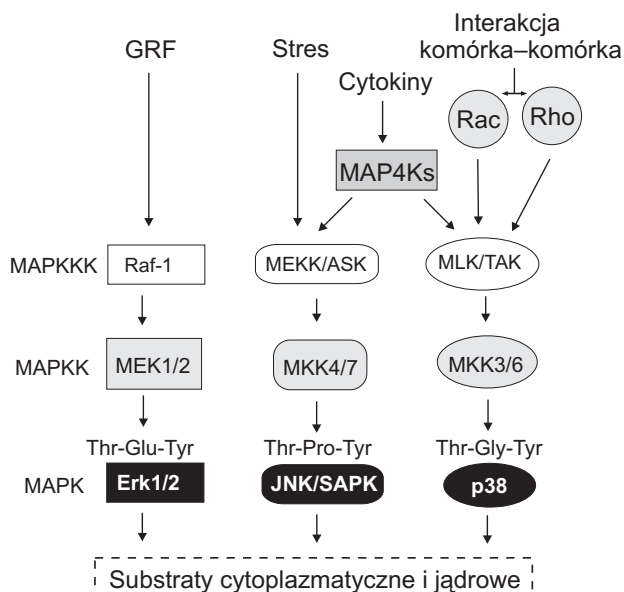
Kinaza białkowa G (PKG, ang. *protein kinase G*) jest zależną od cGMP kinazą białkową serynowo-treoninową. Znane są trzy izoformy PKG (CWKS): PKGI (cGKIα), PKGII (cGKIβ) i PKGIII (cGKII) ssaków, kodowane przez dwa geny. Wszystkie fosforylują substraty białkowe w motywie -Arg-Lys-Arg-Lys-X-Ser-Thr- i wykazują podobne cechy strukturalne: a) N-końcową domenę zamka leucynowego (Leu-Ile), b) domenę autoinhibicji, c) domenę regulatorową, zawierającą dwa miejsca wiążące cGMP, d) domenę wiążącą ATP i e) domenę katalityczną. Dwie izoformy cGKI (α i β) różnią się budową zamka leucynowego (Leu-Ile) i odpowiedzią na fizjologiczny aktywator (cGKIα jest aktywowana przy dziesięciokrotnie niższym stężeniu cGMP niż cGKIβ), swoistością substratową oraz lokalizacją tkankową. cGMP-zależne kinazy białkowe są kluczowymi enzymami, pośredniczącymi w kaskadach sygnałowych inicjowanych tlenkiem azotu i peptydami natriuretycznymi (Rys. 5.6).

Enzymami uczestniczącymi w syntezie cGMP i aktywacji cGKs są aktywowane NO rozpuszczalne (sGC) lub aktywowane peptydami natriuretycznymi receptorowe (rGC) cyklasty guanylanowe (zob. rozdziały 4.3 i 4.4). Substratami są różne białka wewnątrzkomórkowe, m.in.: białka regulujące aktywność kanałów jonowych (głównie Ca²⁺), takie jak fosfolipaza C, substrat kinazy PKG zasocjowany z receptorem IP₃ (IRAG, ang. *IP₃-receptor-associated cGMP kinase substrate*), podjednostki wiążące miozynę, np. MYPT1 (ang. *myosin phosphate targeting subunit 1*), białka regulujące aktywność białek G, np. RGS2 (ang. *regulator of G-protein signalling 2*), białka

uczestniczące w reorganizacji cytoszkieletu, np. VASP (ang. *vasodilator stimulated phosphoprotein*) i małe białka G – RhoA. Kinazy białkowe G biorą udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych, jak: skurcz mięśni gładkich, aktywacja płytek krwi, plastyczność synaptyczna, sekrecja jelitowa i inne.

5.1.2. Kinazy białkowe aktywowane mitogenami

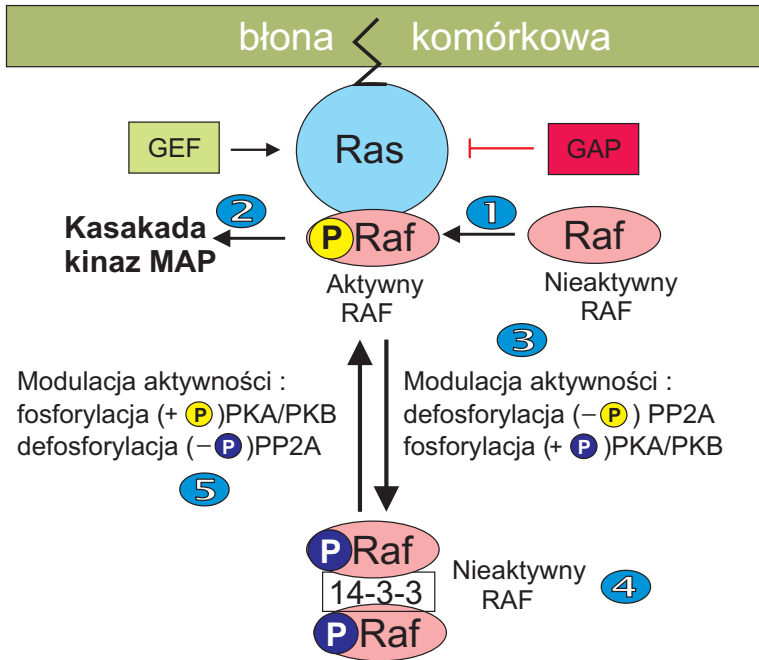
Kinazy białkowe aktywowane w odpowiedzi na stymulację mitogenną nazywane są kinazami MAP (ang. *mitogen activated protein*). Pierwsza kinaza MAP została odkryta przez Sturgilla i Raya w roku 1986 i nazwana kinazą białkową 2 zasocjowaną z mikrotubulami (kinazą MAP-2). Później kinaza ta okazała się strukturalnie i funkcjonalnie podobna do wielu innych kinaz fosforylowanych w odpowiedzi na działanie mitogenów, dlatego zmieniono jej nazwę na kinazę MAP i zaliczono do wielogenowej rodziny kinaz białkowych MAP. Kinazy MAP są często określane jako kinazy serynowo-treoninowe ukierunkowane proliną, preferowana bowiem przez nie sekwencja substratowa to -Pro-X-(Ser/Thr)-Pro-. Niektóre z tych enzymów mają rzadko spotykaną podwójną swoistość substratową (MAPKK fosforylują w MAPK zarówno reszty treoniny, jak i tyrozyny). Białka te są kluczowym ogniwem łańcucha kaskady enzymatycznej, określanej jako kaskada fosforylacji kinaz MAP. Kaskada ta uważana jest za wspólny dla wszystkich organizmów eukariotycznych,



Rys. 5.7. Trzy kaskady kinaz MAP: Erk, JNK/SAPK i p38. MAPKKK – kinaza kinazy kinazy MAP, MAPKK – kinaza kinazy MAP, MAPK – kinaza MAP, Rac/Rho – małe białka G. GRF – receptor czynnika wzrostowego. Pozostałe objaśnienia w tekście

zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych, mechanizm łączący odbiór informacji zewnątrzkomórkowej przez receptory błonowe z biologiczną odpowiedzią komórki. Składnikami występującymi we wszystkich wariantach kaskady kinaz MAP, zarówno u kręgowców, jak i u drożdży, są kinaza MAP (MAPK), kinaza aktywująca MAPK (MAPKK) oraz kinaza kinazy aktywującej MAPK (MAPKKK). Wyróżnia się przynajmniej trzy różne, równoległe kaskady kinaz MAP ssaków (Rys. 5.7), nazywane w zależności od kinazy wykonawczej kaskadami: kinazy regulowanej czynnikami zewnętrznymi – Erk (ang. *extracellular signal-related kinase*), kinazy fosforylującej N-terminalną część Jun/kinazy białkowej aktywowanej przez czynniki stresowe – JNK/SAPK (ang. *c-jun N-terminal/stress-activated protein kinase*) i kinazy p38. Wszystkie te kinazy efektorowe zawierają charakterystyczny motyw podwójnej fosforylacji: -Thr-Glu-Tyr- (Erk), -Thr-Pro-Tyr- (JNK) i -Thr-Gly-Tyr- (p38), fosforylowany działaniem kinaz MAPKK. W obrębie kaskady kinaz Erk wyróżnia się dwa szlaki sygnałowe MAPKKK→MAPKK→MAPK. Jeden z udziałem Raf-1 (A-Raf, B-Raf) → MEK1/2 → Erk1/2 i drugi angażujący MEK-K2/3 → MEK5.Erk5. Ponadto sugeruje się obecność dwóch innych kaskad kinaz MAP, ale poza kinazami wykonawczymi Erk3/4 i Erk7 pozostali ich uczestnicy są nieznanymi.

Przyjmuje się, że kaskady enzymatyczne uruchamiane aktywacją MAPKKK są częścią inicjowanej różnymi czynnikami odpowiedzi komórek docelowych, prowadzącą do regulacji ekspresji określonych genów. Kaskada Erk pośredniczy głównie w odpowiedzi komórki na działanie zewnątrzkomórkowych czynników wzrostowych i hormonów. Kaskada JNK/SAPK jest aktywowana w odpowiedzi na różne czynniki stresowe (stres termiczny, UV, podwyższona osmolarność, stres oksydacyjny) i cytokiny. Natomiast kaskada p38 pośredniczy w procesach zapalnych (stymulacja syntezy cytokin prozapalnych, indukowane CSFs i EPO różnicowanie komórek obrony immunologicznej) oraz w sygnalizacji indukowanej interakcją międzykomórkową. Udowodniono, że istnieją swoiste białka dokujące (zob. rozdział 3.4), wiążące poszczególne elementy kaskady enzymatycznej w jedną całość i przyspieszające znacznie proces katalizy. Białkami inicjującymi kaskadę kinaz Erk są białka Ras, które aktywują kinazę Raf-1 (MAPKKK). Mechanizm tej aktywacji jest złożony (Rys. 5.8) i nie do końca poznany. Poszczególne etapy tego procesu to translokacja Raf-1 z cytoplazmy do błony komórkowej, asocjacja z białkami Ras oraz interakcja z białkami 14-3-3 i chaperonami molekularnymi. W poszczególnych etapach aktywacji i dezaktywacji biorą udział kinazy i fosfatazy serynowo-treoninowe, m.in.: PKA, PKB i PP2A. Aktywna kinaza Raf-1 fosforyluje kinazę MEK (MAPKK) na dwóch resztach Ser, a ta z kolei fosforyluje reszty Thr 183 i Tyr 185 kinazy Erk (MAPK). Kinazy MAP mogą fosforylować rozmaite substraty białkowe, biorące udział zarówno w poprzednich, jak i w następnych etapach przekazywania sygnału. W pierwszym przypadku są to takie białka, jak MEK, Raf-1 i GEF, co wskazuje na udział MAPK w regulacji aktywności kaskady na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. W drugim przypadku są to białka zaangażowane pośrednio (kinazy aktywowane kinazami MAP, które po translokacji do jądra fosforylują czynniki transkrypcyjne) lub bezpośrednio (czynniki transkrypcyjne, polimeraza II RNA) w regulację aktywności transkrypcyjnej komórki.



Rys. 5.8. Hipotetyczny mechanizm aktywacji i dezaktywacji kinazy Raf. 1 – wiązanie z Ras, 2 – stymulacja kaskady kinaz MAP, 3 – modulacja aktywności Raf, 4 – oligomeryzacja Raf przy udziale białek 14-3-3, 5 – modulacja aktywności Raf. GEF – czynnik stymulujący wymianę nukleotydów guaninowych, GAP – białko aktywujące GTP-azę, PKA/PKB – kinazy białkowe A i B, PP2A – fosfataza PP2A

Substratami kaskady enzymatycznej kinaz MAP są także białka cytozolowe (np. PLA₂, PTP2C), białka cytoszkieletu (np. MAP1, MAP2, Tau) oraz białka transbłonowe (m.in. receptory czynników wzrostowych).

Kaskady kinaz JNK/SAPK i p38 aktywowane są głównie stresem (oksydacyjnym, UV, osmolarnym). Drogi aktywacji kinaz JNK i p38 są podobne. Kinazy te są aktywowane przez MAPKK o podwójnej swoistości, zaliczane do czterech rodzin, określonych jako MKK (ang. *MAP kinase kinase*). Enzymy MKK3 i MKK6 fosforylują kinazy p38, a enzymy MKK4 i MKK7 fosforylują kinazy JNK. Kinazy MKK są aktywowane przez liczną grupę MAPKKK, do której należą kinazy MEKK (ang. *mitogen activated extracellular kinase kinase*), kinazy MLK (ang. *mitogen activated like kinase*), ASK (ang. *apoptosis signal regulated kinase*) i TAK (ang. *transforming growth factor β - activated kinase*), a te z kolei przez małe białka wiążące nukleotydy guanylowe (Rac, Rho). Substratami kinaz JNK i p38 są przede wszystkim czynniki transkrypcyjne, takie jak: AP-1, ATF2, Elk1, NF- κ B, MEF-2C.

Wiele danych doświadczalnych wskazuje, że wielkość i czas trwania aktywności kinaz MAP (zwłaszcza MAPK) wpływają na specyficzność sygnału kinazy wykonawczej. Inaktywacja tych kinaz jest regulowana przez defosforylację reszt

fosfotreoniny i/lub fosfotyrozyny zlokalizowanych w pętli aktywacyjnej. Ta defosforylacja może być realizowana przez fosfatazy serynowo-treoninowe (PP2A, PP2C), fosfatazy tyrozynowe (STEP, HePTP) lub fosfatazy o podwójnej swoistości (MKPs) (rozdział 6). Szczególną rolę w regulacji aktywności MAPKs przypisuje się rodzinie enzymów określanych nazwą fosfataz kinaz MAP (MKPs, ang. *MAP kinase phosphatases*).

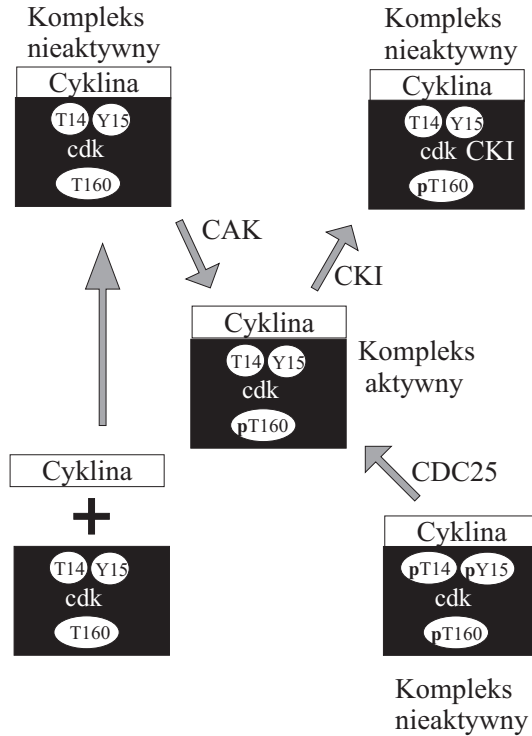
5.1.3. Kinazy regulujące cykl komórkowy

Podział komórek ssaków jest regulowany przez kilka rodzin kinaz serynowo-treoninowych, które umożliwiają progresję przez różne fazy cyklu komórkowego. Należą do nich m.in.: kinazy cyklinozależne, polokinazy, kinazy Aurora i kinazy Nrk (podobne do NIMA).

a. Kinazy cyklinozależne

Kinazy cdk (ang. *cyclin dependent kinase*) zaangażowane są m.in. w regulację przebiegu cyklu komórkowego. Dotychczas opisano dwanaście kinaz cyklinozależnych ssaków, z których pięć (cdk1, cdk2, cdk3, cdk4 i cdk6) jest bezpośrednio zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. Kinaza cdk1 bierze udział w przejściu z fazy G2 do M, kinazy cdk2, cdk4 i cdk6 w przejściu G1–S, a kinaza cdk3 w przejściu G0–G1–S. Substratami tych enzymów *in vitro* są liczne białka strukturalne (cytoplazmatyczne i jądrowe), czynniki transkrypcyjne, produkty genów supresorowych oraz wiele innych. Kinazy cdk mają w swojej strukturze motyw typowy dla kinaz białkowych serynowo-treoninowych, zbudowany z bogatej w struktury β części aminoterminalnej, α -helikalnej części karboksyterminalnej i zlokalizowanej pomiędzy nimi sekwencji o aktywności enzymatycznej. Regulacja aktywności cdk jest skomplikowana i przebiega na wielu różnych poziomach. Główną rolę przypisuje się cyklinom.

Kinaza cdk1 wiąże preferencyjnie cykliny typu A (A1 i A2) oraz typu B (B1, B2 i B3). Ponadto kinaza ta może także tworzyć potrójne kompleksy z cyklinami B i cyklina F. Kinaza cdk2 wiąże głównie cykliny A i cykliny E (E1 i E2) oraz z mniejszym powinowactwem cykliny: D1, D2, B1 i B3. Kinaza cdk3 może tworzyć kompleksy z cyklinami: E, A i C, natomiast kinazy cdk4 i cdk6 preferują cykliny D1, D2 i D3. Nie wszystkie kinazy cdk biorą bezpośredni udział w regulacji cyklu komórkowego. Niektóre kinazy cdk wpływają na realizację cyklu komórkowego tylko pośrednio. cdk5 kontroluje architekturę komórek nerwowych (fosforyluje dynaminę, białko tau i aktyne). cdk7 kontroluje pośrednio cykl jako kinaza aktywująca kinazy cdk (CAK, ang. *cdk activating kinase*) i transkrypcję jako składnik trimerycznego czynnika transkrypcyjnego TFIID (cdk7, cyklina H i MAT1). Głównie reguluje transkrypcję przez fosforylację C-końca polimerazy II RNA, cykliny H i wewnątrzkomórkowej domeny receptora Notch. Kompleks cdk9–cyklina T pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego, zaangażowanego w elongację RNA. Kinaza cdk10 jest słabo poznana,

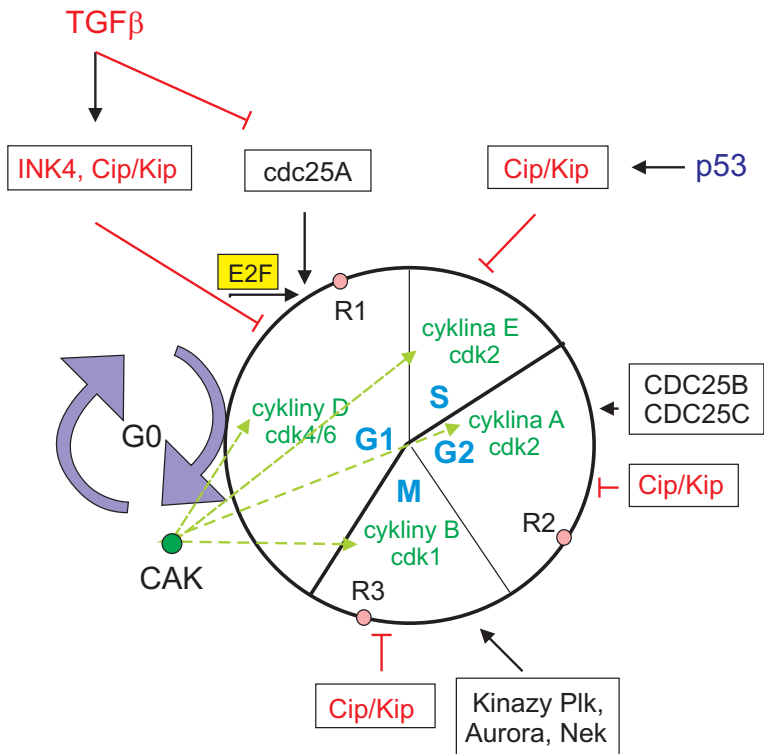


Rys. 5.9. Proponowane mechanizmy regulacji aktywności kinaz cyklinozależnych (cdk). CAK – kinaza aktywująca cdk, CKI – inhibitory kinaz cdk, CDC25 – fosfataza CDC25

a kompleks cdk11–cyklina L reguluje różne procesy, takie jak: *splicing* RNA, transkrypcja i apoptoza. Poziom kinaz cdk, podobnie jak innych białek, jest wynikiem balansu pomiędzy ich syntezą i ubikwitynozależną degradacją. Aktywność kinaz cdk jest regulowana głównie na trzech drogach: fosforylacji/defosforylacji enzymu, tworzenia bądź dysocjacji kompleksów cdk–cyklina lub wiązania z odpowiednimi inhibitorami (Rys. 5.9). Połączenie kinazy cdk z odpowiednią cyklina powoduje powstanie nieaktywnego kompleksu cdk–cyklina, który wymaga fosforylacji treoniny 160 (w przypadku cdk1) do przejścia w stan aktywny. Enzymami katalizującymi tę reakcję są kinazy aktywujące cdk (CAK). Aktywny kompleks cdk–cyklina (cdk1) może być dezaktywowany na drodze fosforylacji treoniny 14 i tyrozyny 15 i ponownie aktywowany pod działaniem fosfataz cdc25. Aktywność kinaz cdk może być także hamowana działaniem swoistych inhibitorów CKI. Dysocjacja kompleksów cdk–cyklina powoduje utratę aktywności kinaz cyklinozależnych, podobnie jak defosforylacja Thr 160.

Cykliny są to białka warunkujące prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. Stanowią podjednostki regulatorowe cyklinozależnych kinaz białkowych. Zidentyfikowano 29 białek określanych mianem cyklin, oznaczanych dużymi literami alfabetu, ale tylko niektóre z nich współdziałają z kinazami cdk i uczestniczą

w regulacji cyklu komórkowego. Białka te dzieli się zazwyczaj na trzy grupy, w zależności od ich uczestnictwa w regulacji poszczególnych faz cyklu komórkowego (Rys. 5.10). Cykliny D1–D3 i cyklina E są syntetyzowane w fazie G1 i odpowiedzialne za przejście komórek przez tę fazę cyklu. Miejsca promotorowe genów cyklin D mają miejsca wiążące szereg czynników transkrypcyjnych. Cyklina D1 wiąże m.in. AP-1, STAT, NF- κ B, a cyklina D2 – Myc. Najważniejszym substratem kompleksów cykliny D–cdk4/6 jest białko retinoblastomy (Rb). Cyklina A jest syntetyzowana w późnej fazie G1 i umożliwia wejście i przejście komórek przez fazę S. Scharakteryzowano dwie cykliny typu B ssaków: B1 i B2, których poziom komórkowy rośnie w fazie G2 i osiąga maksimum w fazie mitozy. Cyklina B1 aktywuje cdk1 i reguluje wejście oraz wyjście komórek z fazy M, a cyklina B2 uczestniczy prawdopodobnie w remodelowaniu aparatu Golgiego, zachodzącym podczas mitozy. Udział cyklin w fizjologicznej regulacji procesów wzrostu potwierdzają m.in. następujące fakty:



Rys. 5.10. Cztery fazy cyklu komórkowego, kontrolowane przez różne kompleksy cyklina/kinaza cyklinozależna (cdk) oraz ich aktywatory (CAK, cdc25) i inhibitory (INK4 i Cip/Kip). TGF β – transformujący czynnik wzrostowy typu β , E2F – czynnik transkrypcyjny E2F, p53 – białko supresorowe p53, R1–R3 – punkty restrykcyjne

- a) obniżenie syntezy cykliny D1 hamuje wyjście komórek z fazy G1;
- b) mikroiniekcja przeciwciał dla cykliny E uniemożliwia wejście komórek w fazę S;
- c) zależne od gęstości zahamowanie wzrostu związane jest z obniżeniem poziomu cykliny A i wzrostem stężenia inhibitora p27;
- d) rozpoczęcie procesu mitozy jest absolutnie zależne od syntezy cyklin B, a jego zakończenie od enzymatycznej degradacji tych białek.

Cykliny są konserwatywnymi ewolucyjnie białkami o m.cz. 40–60 kDa, z wyraźnie wyróżnioną domeną funkcjonalną (około 150 reszt aminokwasowych), nazywaną boksem cyklinowym. Sekwencja ta jest odpowiedzialna za wiązanie cyklin z kinazami cdk. Jak już wspomniano, genom ludzki koduje 29 białek zawierających jeden lub dwa boksy cyklinowe, ale część z nich (cykliny: I, J, M, O, P i S) nie ma typowych partnerów enzymatycznych – kinaz cdk i nazywana jest cyklinami sierocymi.

Dezaktywacja kinaz cdk jest wynikiem hamowania ich aktywności przez swoiste inhibitory (CKI, ang. *cyclin kinase inhibitor*) lub przez enzymatyczną, ubikwityno-zależną degradację cyklin. Odkrycie CKI otworzyło nowy, istotny także z praktycznego punktu widzenia, rozdział w badaniach mechanizmów kontroli wzrostu komórkowego. Pozwoliło na powiązanie biochemicznych aspektów zahamowania cyklu komórkowego z różnymi procesami fizjologicznymi, takimi jak: zewnątrzkomórkowe sygnały hamujące wzrost komórkowy, odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA, supresja tumorogenezy czy regulacja różnicowania. Wszystkie CKI można zaliczyć do jednej z dwóch rodzin: inhibitory Cip/Kip (p21^{Cip/Waf}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2}) preferujące kompleksy cyklina–cdk i inhibitory INK4 (p15, p16, p18, p19), współzawodniczące z cyklinami o wiązanie do kinaz cdk4 i cdk6.

Inhibitor p27^{Kip} odgrywa kluczową rolę w decyzji, czy komórka podejmuje nowy cykl życiowy, czy przechodzi w stan spoczynku (fazę G0). Stężenie tego inhibitora gwałtownie rośnie, kiedy komórka przechodzi w stan spoczynku, i gwałtownie spada, kiedy komórka wchodzi w cykl komórkowy. Wzrost stężenia p27^{Kip} może być indukowany wieloma różnymi czynnikami antymitotycznymi, m.in. bezpośrednim kontaktem komórka–komórka czy zewnątrzkomórkowymi inhibitorami wzrostu (np. TGFβ). Białkami docelowymi dla tego inhibitora są przede wszystkim kompleksy: cdk2–cyklina E i cdk1/2–cyklina A. Poziom komórkowy tego inhibitora jest regulowany na drodze degradacji ubikwitynozależnej, na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego przez kompleks cdk2–cyklina E.

Inhibitor p27^{Kip} wiąże się także z kompleksami cdk2 z cyklinami A i E, powodując ich inaktywację i zatrzymanie cyklu komórkowego. Charakterystyczną właściwością p27^{Kip} jest regulacja jego poziomu na etapie transkrypcji przez białko p53, podczas odpowiedzi na uszkodzenie DNA.

Inhibitory z rodziny INK4 wiążą się głównie z kinazami cdk4/6, uniemożliwiając ich wiązanie z cyklinami D (1–3). Regulacja poziomu tych inhibitorów jest skomplikowana i zależna od rodzaju komórek. Trudno przecenić rolę tych białek w regulacji wzrostu komórkowego, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Ograniczając się tylko do jednego przykładu, inhibitorów p21, można powiedzieć, że:

- a) białka te oddziałują z różnymi kompleksami cdk–cykliny, przede wszystkim z kompleksem cdk4–cyklina D1, a stopień inhibicji zależy od liczby cząsteczek inhibitora związanego przez kompleks cdk–cyklina (po związaniu jednej cząsteczki p21 kompleks cdk4–cyklina D1 jest nadal aktywny, dopiero związanie wielu cząsteczek inhibitora hamuje całkowicie aktywność kinazową tego kompleksu);
- b) ekspresja genu p21 jest regulowana bezpośrednio przez białko supresorowe p53 (promotor genu p21 zawiera dwa miejsca wiążące p53);
- c) iniekcja p21 do komórek nowotworowych powoduje zahamowanie wzrostu w fazie G1, zmianę morfologii i przyspiesza różnicowanie.

Degradacja cyklin przebiega w proteasomach 26S, po uprzedniej ubikwitynacji tych białek. Ten proces wymaga wcześniejszej fosforylacji cyklin (m.in. Thr²⁸⁶ w cyklinie D1 i Thr³⁸⁰ w cyklinie E). Ubikwitynacja cyklin przebiega przy udziale swoistych ligaz E3, kompleksów białkowych nazywanych SCF (ang. *Skip1-Cullin1-F-box*) i APC (ang. *Anaphase-Promoting Complex*). SCF jest aktywny w trakcie całego cyklu komórkowego, w odróżnieniu od APC. Głównymi substratami kompleksu SCF są białka regulujące przejście komórki przez fazy G1/S: cykliny A i E, inhibitory p21 i p27 oraz fosfatazy cdc25. Kompleks APC człowieka zbudowany jest z 12 różnych podjednostek, a regulacja jego aktywności jest bardzo skomplikowana. Kompleks APC jest aktywny w fazie G1 (substratami są m.in. białka: CDC20, polokinaza 1 i kinaza Aurora A), aktywność spada w fazie S, jest nieaktywny w fazie G2 (co jest warunkiem progresji przez tę fazę) i wzrasta w fazie M (substratami są m.in. cyklina B1 i sekuryna).

b. Polokinazy

Jedną z powszechnie występujących w organizmach eukariotycznych kinaz serynowo-treoninowych niereceptorowych jest rodzina polokinaz (Plks, ang. *polo-like kinases*). W organizmach ssaków występują cztery takie białka (Plk1–Plk4). Nazwa tej grupy enzymów została przyjęta dla podkreślenia obecności w C-końcowej części cząsteczki tych związków motywów nazwanych boksem polo (PBM), których tandem tworzy domenę poloboksu (PBD, ang. *polobox domain*). Domena ta wiąże się do ufosforylowanych sekwencji -Ser-pSer(pThr)-Pro-, a odpowiedzialna jest za rozpoznawanie swoistych substratów i określoną lokalizację komórkową. Podstawową rolą biologiczną tych związków jest udział w regulacji cyklu komórkowego. Przyjmuje się, że decydują o transporcie innych białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego do i z jądra komórkowego oraz ich określonej lokalizacji we wrzecie mitotycznym. Polokinazy biorą również udział w kontroli poprawności i kolejności poszczególnych wydarzeń zachodzących w cyklu komórkowym.

c. Kinazy Aurora

Białka Aurora są kinazami pełniącymi rozliczne funkcje w procesie podziału komórki. Pierwsze z tych białek zostało odkryte w 1995 roku jako wynik mutacji w genach muszki owocowej, skutkującej uniemożliwieniem separacji centrosomu.

Nazwa wzięła się stąd, że defekt bieguna wrzeciona mitotycznego u mutanta przypominał światło zorzy polarnej. W organizmie człowieka występują trzy kinazy Aurora: A, B i C, u *Drosophila* i *C. elegans* dwie, homologiczne do ludzkich A i B, a u drożdży jedna, podobna do B. Ludzkie kinazy wykazują 67–76% podobieństwa w sekwencji aminokwasowej w obrębie domeny katalitycznej. Aurory A i B występują powszechnie w tkankach człowieka. Aurora A jest zlokalizowana na centrosomach i odgrywa istotną rolę w wielu etapach mitozy. Aurora B jest składnikiem kompleksu wędrującego po chromosomach (CPC, ang. *chromosome passenger complex*), utworzonego przez: wewnętrzne białko centrosomu (INCENP, ang. *inner centrosome protein*), surwiwinę, borelinę i białko dysku telofazy (TD-60, ang. *telophase disc-60 kDa protein*). Aurora B zaangażowana jest w: uszeregowanie chromosomów, orientację kompleksu kinetochory–mikrotubule, aktywację punktu kontrolnego tworzenia wrzeciona mitotycznego i cytokinezę. Aurora C występuje w jądrach i uczestniczy w spermatogenezie, a także może zastępować Aurorę B w kompleksie pasażerskim.

d. Kinazy Nrk

Kinazy Nrk (ang. *NIMA related kinase*), czyli kinazy podobne do NIMA (ang. *never in mitosis, gene A*) są rodziną kinaz serynowo-treoninowych zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. Pierwszą z nich była tytułowa kinaza wyizolowana z *Aspergillus nidulans*. NIMA jest białkiem o m.c. 79 kDa, w którym sekwencja kinazowa jest zlokalizowana przy N-końcu łańcucha peptydowego, natomiast C-końiec zawiera region, *coiled-coil* istotny dla tworzenia oligomerów, i dwie sekwencje PEST (-Pro-Gln-Ser-Thr-), odpowiedzialne za ubikwitynozależną degradację białka. Aktywacja tej kinazy jest niezbędna do wejścia komórki w fazę mitozy, a jej inaktywacja do wyjścia z tej fazy.

Wszystkie kinazy Nrk (Nek) są strukturalnie podobne do N-końcowej części łańcucha białkowego, ale różnią się od NIMA budową C-końcowej części niekatalitycznej. Spośród 13 znanych kinaz Nrk człowieka (NEK1, NEK2A i NEK2B, NEK3–NEK10, NEK11L i NEK11S) białka Nek6, Nek7 i Nek9 odgrywają istotną rolę w procesie mitozy.

5.1.4. Białka mTOR

Odkrycie na początku lat 70. XX wieku przeciwgrzybiczych właściwości ekstraktów bakterii *Streptomyces hygroscopicus* doprowadziło do oczyszczenia aktywnej substancji rapamycyny (nazwanej od rejonu wschodniej Islandii „Rapa Nui”, gdzie znaleziono te bakterie). Kolejne doświadczenia wykazały, że związek ten hamuje także proliferację i wzrost komórek eukariotycznych, począwszy od drożdży, a skończywszy na człowieku. Okazało się, że celem działania rapamycyny są białka TOR (ang. *target of rapamycin*). W przypadku ssaków znane jest tylko jedno takie białko mTOR (ang. *mammalian TOR*), określane także skrótami:

FRAP (ang. *FKBP12-rapamycin-associated protein*), RAFT (ang. *rapamycin and FKBP12 target*) lub RAPT (ang. *rapamycin target*). Nazwy te wynikają z faktu, że naturalnym, wewnątrzkomórkowym „receptorem” rapamycyny jest niewielkie białko FKBP12 (ang. *FK506-binding protein*) o m.cz. 12 kDa. Białko to jest powszechnie występującą izomerazą peptydylo-propylową, uczestniczącą m.in. w procesie fałdowania białek, która wiążąc się z N-końcową częścią mTOR, hamuje jego aktywność.

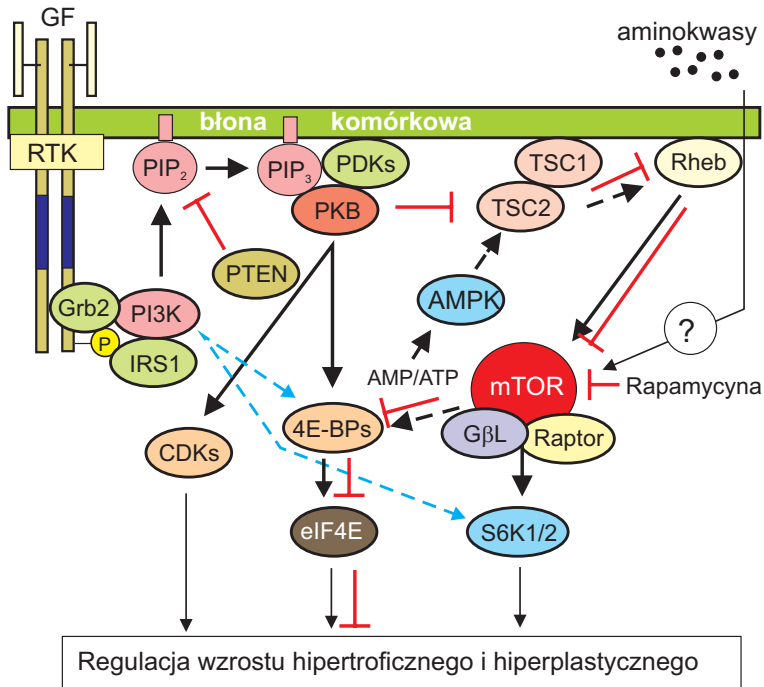
mTOR jest ewolucyjnie konserwatywną kinazą serynowo-treoninową, która reguluje zarówno wzrost hiperplastyczny, jak i hipertroficzny poprzez zdolność do integracji różnych sygnałów, inicjowanych składnikami odżywczymi i energetycznymi komórki oraz sygnałami zewnątrzkomórkowymi (czynnikami wzrostowymi, hormonami, neurotransmiterami). Wystarczająca ilość substancji pokarmowych i budulcowych oraz odpowiedni poziom czynników wzrostowych są niezbędne do wzrostu i przeżycia komórek. Zahamowanie wzrostu hiperplastycznego, spowodowane niewystarczającą ilością składników pokarmowych, prowadzi do zahamowania proliferacji, a w końcowym rezultacie do śmierci komórki. Centralnym białkiem, które koordynuje wzrost hiperplastyczny i hipertroficzny, jest białko TOR. Oprócz udziału w kontroli wzrostu i różnicowania komórek mTOR uczestniczy w regulacji procesów istotnych dla rozwoju i funkcjonowania układu nerwowego, takich jak plastyczność synaptyczna, procesy uczenia się i zapamiętywania. mTOR jest zaangażowane w regulację wielu procesów komórkowych (translację, transkrypcję, degradację białek, reorganizację cytoszkieletu).

TOR jest dużym białkiem (290 kDa), wykazującym 40–60% podobieństwa sekwencji aminokwasowej w organizmach drożdży, robaków, much i ssaków. mTOR jest zbudowane z 2549 reszt aminokwasowych o określonej, ale nie w pełni zrozumiałej budowie domenowej (Rys. 5.11). Badania prowadzone metodami modelowania molekularnego sugerują, że większa część cząsteczki mTOR (poza domeną kinazową) ma budowę helikalną. N-końcowy fragment mTOR zawiera tandem powtórzeń HEAT (ang. *Huntington, elongation factor 1A, protein phosphatase 2A A-subunit, TOR*), które mogą tworzyć struktury odpowiedzialne za interakcję z innymi białkami. W środkowej części łańcucha znajduje się około 500-aminokwasowa domena FAT, a za nią domena FRB (ang. *FKBP12-rapamycin binding*) wiążąca kompleks rapamycyny. Przy C-końcu łańcucha mTOR zlokalizowana jest domena kinazowa oraz niewielka (około 100 reszt aa) domena FATC. Domeny FAT i FATC są obecne we wszystkich białkach zaliczanych do rodziny PIKK (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) kinase-related kinase*), w której skład wchodzi m.in. białka uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego (ATM, ATR i DNA-PK).



Rys. 5.11. Domenowa budowa białka mTOR. Objasnienia w tekście

Kompleks rapamycyna–FKBP12 wiąże się z domeną FRB i hamuje przekaz sygnału przez białko mTOR. Tworzy ono dwa różne kompleksy, określane jako mTORC1 i mTORC2. Składnikiem obu kompleksów, oprócz mTOR, jest białko GβL (ang. *G protein β-subunit like protein*), które ułatwia interakcję mTOR z innymi składnikami kompleksów, białkami Raptor (ang. *regulatory associated protein of mTOR*) i Rictor (ang. *rapamycin-insensitive companion of mTOR*). Głównym odbiorcą sygnału od białka mTOR są dwie rodziny białek regulujących proces translacji (Rys. 5.12). Jedną z nich są kinazy rybosomalnego białka S6 (S6Ks), a drugą białka wiążące czynnik inicjujący (eIF4E), określane skrótem 4E-BPs. Białko Raptor wiąże kinazy S6Ks i białka 4E-BPs, a Rictor zwiększa swoistość działania mTORC2. Przyjmuje się, że kompleks mTORC1 uczestniczy głównie w regulacji translacji i transkrypcji, natomiast kompleks mTORC2 bierze udział w reorganizacji cytoszkieletu. Genom ssaków zawiera dwa geny kinaz S6K: S6K1 i S6K2, z których w wyniku alternatywnego *splicingu* mogą być syntetyzowane po dwie różne izoformy enzymów. Trzy z nich występują w jądrze, a tylko jedna S6K1 w cytoplazmie. Aktywność S6K1



Rys. 5.12. Integracja sygnału inicjowanego czynnikami wzrostowymi (GF) i składnikami odżywczymi przez białko mTOR. RTK – kinaza tyrozynowa receptorowa, Grb2 i IRS1 – białka adaptorowe, PI3K – kinaza 3-fosfoinozytydów, PIP₂ i PIP₃ – fosforany fosfatydyloinozytoli, PDKs – kinazy zależne od fosfatydyloinozytoli, PTEN – fosfataza homologiczna do tensyny, PKB – kinaza białkowa B, TSC – białka supresorowe stwardnienia guzowatego, Rheb – małe białko G, GβL – białko podobne do podjednostki β białek G, AMPK – kinaza zależna od AMP, CDKs – kinazy cyklinozależne, 4E-BPs – białka wiążące eIF4E, eIF4E – czynnik inicjacji translacji 4E, S6K1/2 – kinazy białkowe S6 1 i 2

jest regulowana na drodze fosforylacji przynajmniej ośmiu reszt seryny i treoniny, stymulowanej działaniem czynników wzrostowych i substancji odżywczych. Aktywacja S6K może być modulowana działaniem PI3K, PDK1, PKB, mTor, PKC ξ i λ oraz Cdc42 i Rac1. Substratami S6K są m.in.: białko rybosomalne S6 (stymuluje syntezę białek oraz wzrost hiperplastyczny) i czynnik transkrypcyjny CREMt (stymuluje transkrypcję).

4E-BP jest represorem czynnika inicjującego translację eIF4E, a więc jest inhibitorem biosyntezy białka, regulowanym przez skoordynowane działanie mTOR i PI3K. Kiedy brakuje wystarczającej ilości substancji odżywczych i GF, białko 4E-BP jest nisko ufosforylowane i zasocjowane z eIF4E. Stymulacja czynnikami wzrostowymi prowadzi do fosforylacji wielu reszt seryny i treoniny oraz dysocjacji kompleksu. Scharakteryzowano dotychczas trzy izoformy białka 4E-BP ssaków.

Aktywność mTOR jest zależna od wewnątrzkomórkowego poziomu aminokwasów i glukozy, a inhibicja jego aktywności przez rapamycynę powoduje odpowiedź komórki analogiczną do jej głodzenia. Proponowano wiele mechanizmów wyjaśniających uzależnienie aktywności mTOR od poziomu aminokwasów, ale żadna z hipotez nie jest wystarczająco dobrze udokumentowana. Natomiast hipotezy wyjaśniające uzależnienie aktywności mTOR od poziomu energetycznego komórki wydają się racjonalne. Wykazano, że obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu ATP hamuje realizowaną przez mTOR fosforylację S6K1 i 4E-BP1 (Rys. 5.12). Uzależnienie aktywności mTOR od poziomu energetycznego komórki można tłumaczyć także stymulacją kinazy zależnej od AMP (AMPK). Stwierdzono bowiem, że wysoki stosunek AMP/ATP stymuluje aktywność AMPK, a ta z kolei może hamować funkcję mTOR, poprzez fosforylację kompleksu białek TSC1 i TSC2 (ang. *tuberous sclerosis complex*) i w odróżnieniu od fosforylacji TSC przez PKB, spowodować podwyższenie ich aktywności supresorowej. Udowodniono, że równoczesna fosforylacja TSC2 przez AMPK i kinazę syntazy glikogenu (GSK3 β) może znacznie obniżyć aktywność małego białka G – Rheb (ang. *Ras homolog enriched in brain*) i w konsekwencji hamować aktywację mTOR.

TSC1 (hamartyna) i TSC2 (tuberyna) tworzą heterodimer, który wykazuje funkcję represora nowotworu. Kompleks ten hamuje cykl komórkowy i proliferację komórek. Fosforylacja TSC2 powoduje rozpad kompleksu i spadek jego aktywności. Mutacje w genach TSC1 i TSC2 są przyczyną dziecięcej choroby *tuberous sclerosis*, która jest autosomalnym schorzeniem występującym u jednego na 6000 dzieci. W jej wyniku tworzą się guzy w wielu organach (mózg, serce, nerki, płuca, skóra), powodujące wiele problemów medycznych, chociaż rzadko (2%) są złośliwe. Nadekspresja TSC1 i TSC2 *in vitro* ogranicza wzrost hiperplastyczny komórek, dlatego sugeruje się, że fizjologiczną rolą TSC jest ograniczenie wzrostu komórek i tkanek.

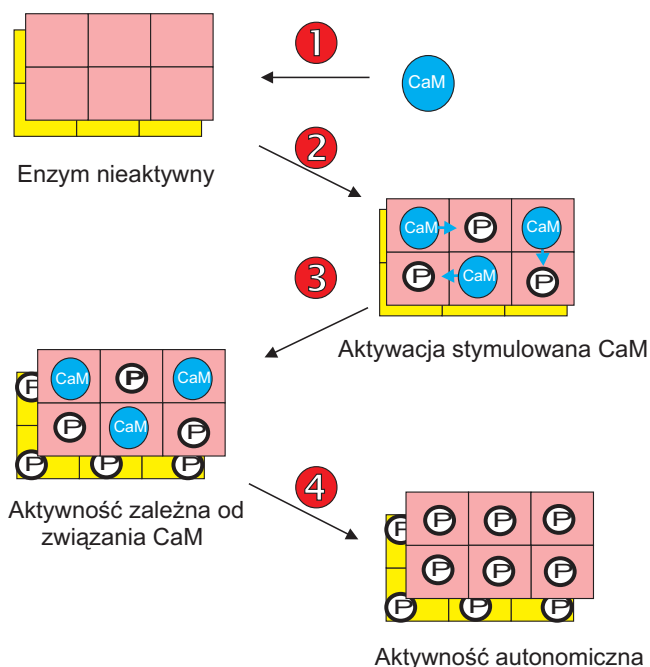
Sygnal inicjowany czynnikami wzrostowymi, hormonami lub neurotransmiterami uruchamia wiele wewnątrzkomórkowych dróg sygnałowych, także zależną od PI3K/PDK1/PKB. Ta droga może być hamowana przez fosfatazę PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog*), która defosforyluje fosfoinozytol w pozycji 3 (zob. rozdział 6.3). Aktywacja PKB(Akt) uruchamia różne drogi sygnałowe, m.in. te, które stymulują kinazy cyklicznie zależne (cdk), umożliwiając przejście przez cykl komórkowy. Z drugiej strony, aktywna kinaza białkowa B (PKB) fosforyluje TSC2 i powoduje

zniesienie supresorowej funkcji kompleksu TSC, co z kolei aktywuje białko Rheb. Aktywuje ono mTOR, które z kolei aktywuje S6K1 i inaktywuje 4E-BP1 (represor eIF4E), uwalniając aktywny czynnik eIF4E. S6K1 i eIF4E niezależnie od siebie stymulują proces translacji.

Zaproponowany mechanizm nie jest jedyną możliwością aktywacji S6K1 i eIF4E, wiadomo bowiem, że aktywność obu białek może być stymulowana przez PI3K/PKB na drodze niezależnej od białka mTOR. Ponadto należy wyraźnie powiedzieć, że S6Ks i 4E-BPs nie są jedynymi substratami kinazy mTOR. Istnieje wiele dowodów na interakcję mTOR z innymi białkami sygnałowymi, takimi jak: kinaza białkowa C (PKC), fosfatazy białkowe z rodziny (PP) czy inhibitory kinaz cyklinozależnych (CKIs).

5.1.5. Kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} /kalmoduliny

Wiele funkcji regulowanych stężeniem jonów wapnia jest realizowanych za pośrednictwem kalmoduliny, która tworzy kompleksy z udziałem różnych białek efektorowych (zob. rozdział 7.1). Ważnymi białkami tego typu są kinazy zależne od Ca^{2+} /kalmoduliny (CaMKs, ang. *Ca/calmodulin mediated protein kinases*). Tę rodzinę kinaz białkowych dzieli się zazwyczaj na enzymy wielofunkcyjne (wielosubstratowe) i swoiste substratowo. Przykładem tych ostatnich są: kinaza lekkiego łańcucha miozyny (MLCK), kinaza



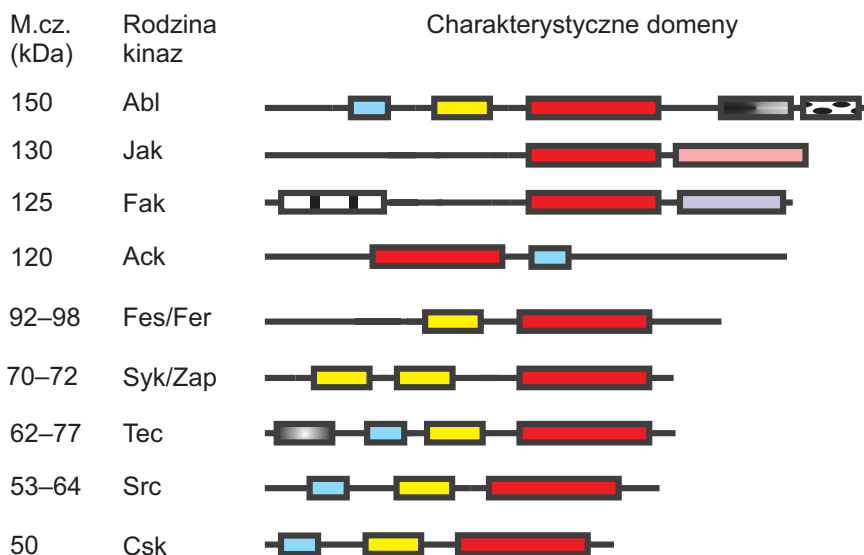
Rys. 5.13. Schemat aktywacji CaMKII. 1. Przylączenie Ca^{2+} /kalmoduliny. 2. Fosforylacja krzyżowa Thr²⁸⁶, 3. Utworzenie aktywnej formy CaMKII. 4. Oddysocjowanie CaM

fosforylasy glikogenu (GPK) czy zależna od Ca^{2+} /kalmoduliny kinaza III (CaMKIII). Do enzymów wielofunkcyjnych należą: CaMKI, CaMKII i CaMKIV. CaMKI (podobnie jak większość CaMKs, poza kinazą fosforylasy i CaMKII) jest monomerycznym białkiem o m.cz. około 40 kDa, występującym we wszystkich tkankach o nieokreślonej dotąd roli fizjologicznej. Posiada podobną do CaMKIV (białko o m.cz. około 60 kDa) specyficzność substratową i funkcję biologiczną (regulacja transkrypcji genów), a różną od niej lokalizację komórkową. CaMKI występuje głównie w cytoplazmie, a CaMKIV w jądrze komórek mózgowych i grasicy. Substratem CaMKIII jest czynnik elongacyjny 2 (EF2) regulujący proces translacji. Mechanizm aktywacji kinaz CaMK jest podobny i zależy od kompleksu Ca^{2+} /kalmodulina, aczkolwiek w przypadku CaMKII i CaMKIV istotną rolę odgrywa także zjawisko autofosforylacji.

Kinaza CaMKII jest oligomerem o m.cz. około 550 kDa, występującym powszechnie w tkankach zwierząt i ludzi. Znanych jest kilka izoform tego enzymu (α , β , γ , δ), różniących się strukturą budujących je monomerów i lokalizacją tkankową. CaMKII α i CaMKII β występują wyłącznie w mózgu, a pozostałe w wielu tkankach. W budowie łańcucha monomeru wyróżnia się domenę katalityczną, domenę regulatorową (zawierającą miejsca wiązania kompleksu Ca^{2+} /kalmodulina) i region autoinhibicji. Oligomer jest tworzony przez dwa heksameryczne pierścienie, każdy zbudowany z sześciu takich samych monomerów (α – δ). W nieobecności Ca^{2+} /kalmoduliny enzym występuje w formie nieaktywnej, co jest spowodowane wzajemnym blokowaniem miejsc wiążących substrat i ATP przez ściśle upakowanie monomerów obu pierścieni. Wzrost stężenia Ca^{2+} powoduje związanie Ca^{2+} /kalmoduliny do C-końca monomerów i zmianę ich struktury, umożliwiającą wyjście kompleksu ze stanu autoinhibicji. To z kolei umożliwia autofosforylację (transfosforylację różnych podjednostek na Thr²⁸⁶) (Rys. 5.13). Raz ufosforylowana treonina powoduje, że enzym staje się niezależny od obecności Ca^{2+} /kalmoduliny. W konsekwencji autofosforylacji: a) wzrasta powinowactwo CaMKII do kalmoduliny, co wydłuża czas jego aktywacji, b) nawet po oddysocjowaniu Ca^{2+} /kalmoduliny pozostaje jeszcze 20–80% aktywności CaMKII, a całkowita dezaktywacja jest możliwa tylko po działaniu odpowiednich fosfataz, c) wyeksponowane zostają miejsca wiązania substratów. Substratami CaMKII są m.in.: syntaza glikogenowa, hydroksylaza tyrozyny, hydroksylaza tryptofanu, synapsyna I, MAP2 (ang. *microtubule associated protein 2*), syntaza NO, kanały wapniowe, EGFR, PP2A, rybosomalne białko S6. Różnorodność substratów fosforylowanych przez CaMKs powoduje, że przypisuje się im istotną rolę w takich procesach, jak: regulacja funkcjonowania neuronów, metabolizm węglowodanów, reorganizacja cytoszkieletu, wzrost i różnicowanie komórek.

5.2. Kinazy białkowe tyrozynowe

Kinazy tyrozynowe niereceptorowe są produktami niektórych onkogenów wirusowych lub onkogenów komórkowych. Wszystkie zawierają podobnie zbudowaną domenę kinazową. Cechą charakterystyczną białek eukariotycznych jest obecność dodatkowej sekwencji N-końcowej, odpowiedzialnej za przyłączenie kwasu mirstynowego, umożliwiającego ich zakotwiczenie w błonie komórkowej. Obecność



Rys. 5.14. Rodzina kinaz tyrozynowych niereceptorowych. Domeny: – kinazy tyrozynowej, – pseudokinazy, – wiążąca integryny, – SH3, – SH2, – wiążąca DNA, – wiążąca aktyne, – PH, – wiążąca CDC42, – wiążąca białka adhezyjne

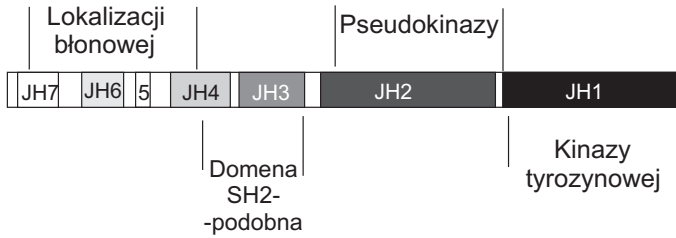
niektórych z nich stwierdzono także w jądrze komórkowym, gdzie – jak się przypuszcza – uczestniczą m.in. w regulacji cyklu komórkowego i kontroli transkrypcji wybranych genów. Większość tych kinaz zawiera również domeny SH2 i SH3 odpowiedzialne za ich interakcję z białkami komórkowymi.

Kinazy tyrozynowe niereceptorowe pośredniczą w przenoszeniu sygnału inicjowanego przez niektóre cytokiny (głównie przez interleukiny i interferony), czynniki wzrostowe, antygeny i integryny. Wyróżnia się dziewięć rodzin kinaz tyrozynowych niereceptorowych (Rys. 5.14) różniących się wielkością cząsteczki i swoistością substratów. Należy także wyraźnie powiedzieć, że w odróżnieniu od kinaz tyrozynowych receptorowych mechanizm aktywacji poszczególnych enzymów może być różny. Kinazy Janusa (Jak) są aktywowane na drodze fosforylacji, kinaza Src m.in. na drodze defosforylacji, kinaza Abl przez wycięcie N-końcowej części łańcucha, a kinaza Csk po zmianie konformacyjnej odsłaniającej centrum aktywne, blokowane uprzednio przez domeny SH2 i SH3.

5.2.1. Kinazy Janusa

Dotychczas poznano cztery kinazy Janusa (Jak) kręgowców (Jak1–3, Tyk2) oraz jedną u muszki owocowej (Hop). Nowo wyizolowane pod koniec lat 80. kinazy Jak1 i Jak2 wśród wielu znanych już innych kinaz zostały nazwane początkowo *Just*

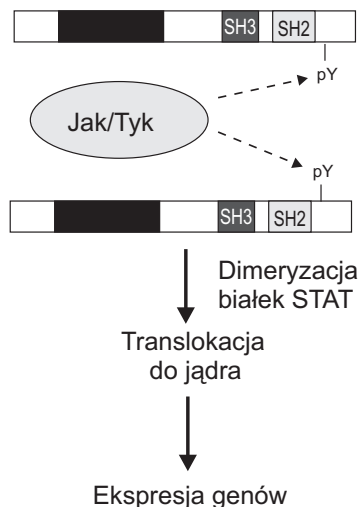
Domeny:



Rys. 5.15. Domenowa budowa białek Jak. JH – domeny homologiczne występujące we wszystkich białkach Jak

another kinase, w skrócie Jak. Ponieważ później okazało się, że wszystkie kinazy Jak mają dwie prawie identyczne domeny przenoszące reszty fosforanowe (kinazową i pseudokinazową), zmieniono uzasadnienie ich nazwy na kinazy Janusa, rzymskiego boga o dwóch twarzach.

Kinazy te aktywowane są głównie przez receptory cytokin typu I oraz niektóre receptory metabotropowe (np. receptor angiotensyny) i onkogeny (np. *v-abl*). Występują powszechnie w tkankach ssaków z wyjątkiem kinazy Jak3, która znajduje się wyłącznie w komórkach hematopoetycznych. Wszystkie kinazy ssacze są białkami o zbliżonej wielkości cząsteczki (110–140 kDa), zawierającymi siedem konserwatywnych strukturalnie subdomen, które mogą tworzyć większe domeny odpowiedzialne za określone funkcje tych białek (Rys. 5.15). Poczynając od C-końca cząsteczki kinazy Janusa, zawierają dwie domeny kinazowe: domenę kinazy tyrozynowej (PTK, ang. *phosphotyrosine kinase*) JH1 oraz nieaktywną enzymatycznie domenę pseudokinazową (KLD, ang. *kinase-like domain*) JH2. Domena JH1 zawiera motyw KE/DYY, a fosforylacja pierwszej z tyrozyn jest istotna dla pełnej aktywności kinazowej Jak. Domena JH2 reguluje aktywność kinazy tyrozynowej na drodze autoinhibicji i jest prawdopodobnie odpowiedzialna za specyficzność substratową kinaz Jak. Następne domeny (JH3–JH4) uczestniczą w interakcji z receptorami cytokin (SLD, ang. *SH2-like domain*), w których działaniu głównie pośredniczą, a domeny JH5–JH7 i część JH4 są odpowiedzialne za lokalizację komórkową białek Jak (FERM, ang. *Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin*). Niektóre z tych białek pośredniczą także w sygnalizacji inicjowanej receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej i receptorami zasocjowanymi z białkami G. W wyniku tego zmiany struktury tych związków powodują liczne stany patologiczne. Aktywacja kinaz Jak uzależniona jest od zmian konformacyjnych zasocjowanych z nimi receptorów. Swoistość receptorową kinaz Jak w stosunku do rodziny cytokin omówiono w drugiej części tej monografii. Kinazy Jak mają słabą aktywność enzymatyczną i dopiero transfosforylacja Jak zasocjowanych z „receptorami cytokin” (po ich uprzedniej dimeryzacji indukowanej związaniem liganda) aktywuje domenę kinazową tych białek. Kinazy Jak fosforylują z kolei krzyżowo podjednostki oligomerów receptorów, co umożliwia przyłączenie do nich białek mających domeny SH2 lub PTB, w tym białek STAT (cytoplazmatycznych



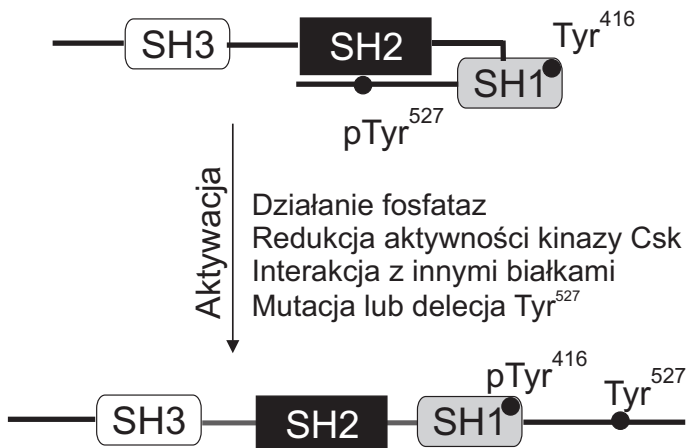
Rys. 5.16. Fosforylacja białek STAT przez zasocjowane z receptorem kinazy Jak oraz dimeryzacja białek STAT i ich translokacja do jądra komórki

czynników transkrypcyjnych). Białka STAT (patrz rozdział 8.2) po fosforylacji przez kinazy Jak ulegają dimeryzacji (głównie w wyniku interakcji domeny SH2 jednego białka z fosfotyrozyną drugiego) i translokacji do jądra komórkowego, gdzie regulują ekspresję określonych genów (Rys. 5.16). Ich wynikiem jest określona odpowiedź komórki na działanie ligandów zewnątrzkomórkowych. Mutacje i translokacje genów kinaz Jak, prowadzące do stałej aktywacji tych białek, powodują różne stany patologiczne i są przede wszystkim związane z nowotworami krwi, m.in. z ostrą białaczką limfoblastyczną, ostrą białaczką szpikową, ostrą białaczką megakarioblastyczną itp. Spośród wszystkich kinaz Jak Jak3 jako jedyna asocjuje wyłącznie z podjednostką γ_c receptorów z rodziny IL-2/IL-4, dlatego uszkodzenie zarówno Jak3, jak i podjednostki γ_c powoduje podobny fenotyp immunoniewydolności SCID i X-SCID.

5.2.2. Kinazy Src

Odkrycie tej rodziny kinaz białkowych tyrozynowych jest związane z badaniami nad mechanizmem transformacji komórek zwierzęcych wirusem Rousa. Okazało się, że białko transformujące tego wirusa, produkt genu *v-src*, posiada aktywność kinazy białkowej tyrozinoswoistej, podobnie jak jego komórkowy odpowiednik kodowany przez gen *c-src*. Obecnie znanych jest wiele białek homologicznych z białkiem Src, takich jak Yes, Fgr, Lck, Fyn, Hck, Lyn i Blk, tworzących rodzinę kinaz Src. Większość z nich jest swoista tkankowo, a ekspresja ich genów zachodzi głównie w komórkach hematopoetycznych. Rodzinę Src można podzielić na dwie podrodziny: Lyn-podobne (Lyn, Hck, Lck i Blk) oraz Src-podobne (Src, Yes, Fyn i Fgr), na podstawie homologii sekwencji C-końcowych. Tylko białka zaliczane do drugiej

podrodziny występują powszechnie w tkankach organizmów dojrzałych. Wszystkie kinazy rodziny Src mają podobną budowę domenową, czyli domenę katalityczną, usytuowaną przy C-końcu cząsteczki oraz domeny SH2 i SH3 bliżej N-końca łańcucha białkowego (Rys. 5.14). Wszystkie kinazy mają na N-końcu łańcucha sekwencje (50–70 reszt aminokwasowych) różniące się składem aminokwasowym, ale wszystkie wykazują w tym rejonie miejsca mirystylacji (a czasami palmitynacji). Aktywność katalityczna rodziny kinaz Src jest regulowana przez innego przedstawiciela kinaz tyrozynowych niereceptorowych, kinazę Csk. Enzym ten fosforyluje reszty tyrozyny, zlokalizowane przy C-końcu łańcucha (w przypadku mysiej kinazy Src jest to Tyr⁵²⁷, u człowieka Tyr⁵³⁰). Powstała fosfotyrozyna oddziałuje z domeną SH2, usytuowaną bliżej N-końca cząsteczki Src. Interakcja obu części łańcucha jest ponadto stabilizowana oddziaływaniem domeny SH3 z bogatym w prolinę regionem łącznikowym Src. Zaangażowanie domen SH2 i SH3 w wiązania wewnątrzcząsteczkowe powoduje, że kinaza Src jest niezdolna do interakcji międzycząsteczkowej i nieaktywna katalitycznie (zablokowane centrum aktywne). Aktywacja kinazy Src (Rys. 5.17) może zachodzić poprzez defosforylację ww. fosfotyrozyny (527/530) pod działaniem fosfataz białkowych, obniżenie aktywności kinazy Csk, dla której substratem jest Src, współzawodnictwo o domenę SH2 przez ufosforylowane reszty tyrozynowe innych białek (np. receptorów czynników wzrostowych i cytokin) lub przez związanie domeny SH3 z motywem bogatym w prolinę (-P-X-X-P-) białek docelowych. W przypadkach patologicznych aktywację Src może powodować delecja lub mutacja Tyr (527/530). Defosforylacja tej fosfotyrozyny prowadzi do autofosforylacji Tyr, zlokalizowanej w pętli aktywacyjnej (Tyr⁴¹⁶ u myszy), i stabilizacji aktywnej konformacji enzymu. Wiele fosfataz, takich jak: receptorowe PTP α i PTP λ oraz cytoplazmatyczne PTP1B, SHP-1 i SHP-2, może defosforylować C-końcową tyrozynę (527/530) kinazy c-Src.



Rys. 5.17. Mechanizmy aktywacji kinazy niereceptorowej Src

Kinazy zaliczane do rodziny Src są aktywowane w odpowiedzi na wiele różnych czynników zewnętrznych, takich jak: czynniki wzrostowe, cytokiny, antygeny, stres oksydacyjny, a także pośrednio przez ligandy działające przez receptory GPCR (np. trombina) lub przez receptory integrynowe (białka macierzy zewnątrzkomórkowej). Substratami kinaz Src są liczne białka zlokalizowane zarówno w pobliżu błony komórkowej (np. białka cytoszkieletu, białka Ras, PI3K), jak i produkty onkogenów komórkowych (np. c-Myc).

Kinazy Src uczestniczą w regulacji wielu procesów komórkowych, takich jak: metabolizm, przeżywalność, proliferacja, różnicowanie i migracja.

5.2.3. Kinazy Abl

Rodzina kinaz Abl znacznie różni się budową od pozostałych cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych, głównie obecnością dwóch domen zlokalizowanych przy C-końcu łańcucha peptydowego: wiążącej F-aktynę i wiążącej DNA, a to decyduje o jej swoistej funkcji biologicznej. Cytoplazmatyczna rola kinaz Abl związana jest z obecnością domeny wiążącej F-aktynę, która oddziałuje z mikrotubulami i kontroluje w ten sposób organizację cytoszkieletu. Obecność domeny wiążącej DNA implikuje wielokierunkowe oddziaływania Abl z materiałem genetycznym komórki i tłumaczy udział tych kinaz w kontroli cyklu komórkowego, regulacji transkrypcji i naprawie DNA. Uważa się, że głównym regulatorem lokalizacji subkomórkowej Abl są białka 14-3-3, które wiążą ufosforylowaną kinazę i zatrzymują ją w cytoplazmie. Fosforylacja białek 14-3-3 powoduje uwolnienie kinazy Abl i jej translokację do jądra komórkowego.

Abl jest zlokalizowana w różnych przestrzeniach subkomórkowych, takich jak: jądro, cytoplazma, mitochondria, retikulum endoplazmatyczne. Oddziałuje z różnymi białkami komórkowymi, uczestniczącymi w przekazie sygnału wewnątrzkomórkowego (kinazy, fosfatazy, czynniki transkrypcyjne itp.), dzięki czemu może brać udział w różnych procesach komórkowych.

Mechanizm fizjologicznej aktywacji kinazy Abl jest związany z obecnością reszty kwasu mirystynowego na N-końcu cząsteczki enzymu. Uważa się, że reszta kwasu mirystynowego zaangażowana jest w autoinhibicję tej kinazy, prawdopodobnie przez jego wiązanie z częścią domeny kinazowej, powodując zablokowanie dostępności substratu przez domeny SH2 i SH3 (podobnie jak w przypadku kinazy Src). Enzymatyczne odcięcie C-końcowej części łańcucha (zawierającej kwas mirystynowy) powoduje odsłonięcie domeny kinazowej, fosforylację pętli aktywacyjnej, co skutkuje przejściem kinazy w stan aktywny. Możliwa jest także konkurencja ligandów o wysokim powinowactwie do domen SH2 i/lub SH3, odsłonięcie pętli aktywacyjnej i jej fosforylacja. Patologiczna aktywacja kinazy Abl związana z translokacją chromosomową i powstaniem fuzyjnych białek Abl-Bcr o znacznie podniesionej aktywności enzymatycznej jest przyczyną chronicznej białaczki mieloidalnej.

Literatura uzupełniająca

- Avruch J. MAP kinase pathways: The first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1773, 1150–1160.
- Backert S., Feller S.M., Wessler S. Emerging roles of Abl family tyrosine kinases in microbial pathogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 2008, 33, 80–90.
- Boggon T.J., Eck M.J. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 2004, 23, 7918–7927.
- Corbalan-Garcia S., Gomez-Fernandez J.C. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1761, 633–654.
- Fingar D.C., Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004, 23, 3151–3171.
- Gertis N., Kostenko S., Shiryaev A., Johannessen M. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cell. Signal.* 2008, 20, 1592–1607.
- Gold M.G., Barford D., Komender D. Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006, 16, 693–701.
- Hanada M., Feng J., Hemmings B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1697, 3–16.
- Hay N., Sonenberg U. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004, 18, 1926–1945.
- Hernandez S.E., Krishnaswami M., Miller A.L., Koleske A.J. How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends Cell Biol.* 2004, 14, 36–44.
- Hofmann F. The biology of cyclic cGMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 1–4.
- Hou Y., Gupta N., Schoenlein P. et al. An antitumor role for cGMP-dependent protein kinase. *Cancer Lett.* 2006, 240, 60–68.
- Ikezoe T. Aurora kinases as an anti-cancer target. *Cancer Lett.* 2008, 262, 1–9.
- Ingle E. Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1784, 56–65.
- Jarzyna R. Kinaza białkowa aktywowana przez AMP – kluczowe znaczenie w regulacji metabolizmu. *Post. Biochem.* 2006, 52, 283–288.
- Koivunen J., Aaltonen V., Peltonen J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett.* 2006, 235, 1–10.
- Kondoh K., Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1773, 1227–1237.
- Luo C., Laaja P. Inhibitors of JAKs/STATs and the kinases: possible new luster of drugs. *Drug Dis. Today* 2004, 9, 268–275.
- Malumbres M., Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2007, 17, 60–65.
- Malumbres M., Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 2005, 30, 630–641.
- Martin D.E., Hall M.N. The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005, 17, 158–166.
- Mishra N.S., Tuteja R., Sopory S.K. Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2006, 452, 55–68.
- Murray A.W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004, 116, 221–234.
- Ng S.S., Papadopoulou K., McInerney C.J. Regulation of gene expression and cell division by Polo-like kinases. *Curr. Genet.* 2006, 50, 73–80.

- Nicholson K.M., Anderson N.G. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 2002, 14, 381–395.
- O’Connell M.J., Krien M.J.E., Hunter T. Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.* 2003, 13, 221–228.
- Penzes P., Cahill M.E., Jones K.A., Srivastava D.P. Convergent CaMK and Rac signal control dendritic structure and function. *Trends Cell Biol.* 2008, 18, 405–413.
- Perycz M., Świech Ł., Malik A., Jaworski J. mTor w fizjologii i patologii układu nerwowego. *Post. Biol. Kom.* 2007, 34, 511–525.
- Ruvinsky I., Meyuhos O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem. Sci.* 2006, 31, 342–348.
- Sale E.M., Sale G.J. Protein kinase B: signaling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol. Life Sci.* 2008, 65, 113–127.
- Sarbassov D.D., Ali S.M., Sabatini D.M. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005, 17, 596–603.
- Schlossmann J., Hofmann F. cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov. Today* 2005, 10, 627–634.
- Shapiro G.I. Cyclin-dependent kinase pathways as target for cancer treatment. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 1770–1783.
- Soderling T.R. The Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *TIBS* 1999, 24, 232–236.
- Sturgill T.W. MAP kinase: It’s been longer than fifteen minutes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008, 371, 1–4.
- Swulius M.T., Waxham M.N. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol. Life Sci.* 2008, 65, 2637–2657.
- Toker A. Akt signaling: a damaging interaction makes good. *Trends Biochem. Sci.* 2008, 33, 356–359.
- Vainchenker W., Dusa A., Constantinescu S.N. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Sem. Cell Devel. Biol.* 2008, 19, 385–393.
- Van de Weerd B.C.M., Littler D.R., Klompmaker R. et al. Polo-box domains confer target specificity to the Polo-like kinase family. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1783, 1015–1022.
- Van Leuken R., Clijsters L., Wolthuis R. To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1786, 49–59.
- Wang X., Tournier C. Regulation of cellular functions by the Erk5 signalling pathway. *Cell. Signal.* 2006, 18, 753–760.
- Wilks A.F. The JAK kinases: not just another kinase drug discovery target. *Sem. Cell Devel. Biol.* 2008, 19, 319–328.
- Witters L.A., Kemp B.E., Means A.R. Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends Biochem. Sci.* 2006, 31, 13–16.
- Zhang X. Aurora kinases. *Curr. Biol.* 2008, 18, R146–R148.

6. Fosfatazy, fosfolipazy i kinaza PI3K

Fosfatazy białkowe (PP, ang. *protein phosphatase*) są liczną grupą enzymów, którą na podstawie ich swoistości substratowej dzieli się zazwyczaj na dwie rodziny: fosfatazy serynowo-treoninowe i fosfatazy tyrozynowe. Substratami pierwszej z nich są białka zawierające fosfoserynę i/lub fosfotreoninę, substratami drugiej – białka ufosforylowane na tyrozynie. Fosfatazy o funkcji podwójnej (mieszanej swoistości), defosforylujące wszystkie trzy fosfoaminokwasy, zaliczane są do rodziny fosfataz tyrozynowych, ze względu na znacznie większe powinowactwo do fosfotyrozyny niż do fosfotreoniny i fosfoseryny. Przykładowo, jedna z najlepiej poznanych fosfataz o podwójnej funkcji VHR (ang. *vaccinia H1-related dual-specificity phosphatase*) defosforyluje fosfotyrozynę z szybkością 40-krotnie większą niż fosfotreoninę i 500-krotnie większą niż fosfoserynę. Do tej rodziny fosfataz zalicza się także fosfatazy uczestniczące w regulacji cyklu komórkowego (*cdc25*, ang. *cell division cycle 25*), których substratami są cyklinozależne kinazy białkowe (cdk). Dotychczas poznano ponad 130 fosfataz białkowych człowieka.

Podstawową funkcją fosfataz białkowych jest regulacja poziomu fosfoaminokwasów (fosfoseryny, fosfotreoniny i fosfotyrozyny) w białkach fosforylowanych działaniem kinaz białkowych. Ta kowalencyjna modyfikacja struktury białek jest powszechną i podstawową cechą przenoszenia sygnałów wewnątrzkomórkowych, regulujących wiele procesów życiowych, m.in. wzrost, różnicowanie, przeżycie i śmierć komórek. Udział PP w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej można sprowadzić do defosforylacji białek sygnałowych, głównie enzymów lub produktów ich działania. Natomiast regulacja aktywności fosfataz białkowych może zachodzić wskutek: a) fosforylacji, b) utleniania reszt cysteinowych, c) dimeryzacji bądź d) przez związanie liganda (w przypadku kinaz receptorowych).

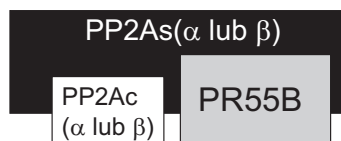
6.1. Fosfatazy serynowo-treoninowe

Fosfatazy serynowo-treoninowe są enzymami powszechnie występującymi w organizmach eukariotycznych, ale ich funkcja w organizmach roślinnych jest słabo poznana. Dlatego w niniejszym opracowaniu ograniczono się do organizmów zwierzęcych. Odkrycie tej grupy enzymów związane jest z badaniami regulacji metabolizmu glikogenu, a dokładniej z konwersją aktywnej fosforylasy glikogenu „a” do nieaktywnej formy „b” przez enzym, który nazwano fosfatazą białkową 1 (PP1). Fosfatazy zaliczane do tej rodziny katalizują usuwanie grup fosforanowych z białek zawierających fosfoserynę i/lub fosfotreoninę. W przeciwieństwie do fosfataz tyrozynowych, których liczba jest porównywalna do liczby kinaz tyrozynowych, znamy stosunkowo niewiele (w porównaniu z liczbą kinaz) podjednostek katalitycznych fosfataz serynowo-treoninowych

Tabela 9. Rodziny fosfataz serynowo-treoninowych

Rodzina	Podrodzina	Podjednostki katalityczne	Białka regulatorowe
PPP	PP1	cztery	kilkadziesiąt
	PP2A	dwie	kilka
	PP2B	trzy	kilka
	PP4	jedna	kilka
	PP5	jedna	kilka
	PP6	jedna	jedno
	PP7	dwie	?
PPM	PP2C	dziesięć	?
FCP	FCP-1	cztery	?

(PSTPs, ang. *protein serine/threonine phosphatases*). Ten pozorny niedobór jest równoważony różnorodnością kompleksów enzymatycznych tworzonych przez podjednostki katalityczne fosfataz serynowo-treoninowych z białkami regulatorowymi. Te ostatnie nie tylko wpływają na aktywność i swoistość substratową podjednostek katalitycznych, lecz także na lokalizację komórkową kompleksów enzymatycznych. Na podstawie różnic w budowie i wrażliwości na określone inhibitory wyróżnia się zazwyczaj trzy rodziny fosfataz serynowo-treoninowych: PPP (ang. *phosphoprotein phosphatase*), PPM (ang. *protein phosphatase metal-ion dependent*) i FCP (ang. *transcription initiation factor IIF – association component of CTP phosphatase*) (Tabela 9). Ta ostatnia rodzina stymuluje defosforylację C-końcowej domeny (CTD) dużej podjednostki polimerazy RNAII. Najliczniejszą ze znanych fosfataz jest PPP, w której skład wchodzi kilka podrodzin (PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 i PP7). Wszystkie one mogą występować w formie oligomerów (zazwyczaj di- i trimerów). Możliwość tworzenia oligomeru przez fosfatazę PP2A przedstawia rysunek 6.1. Podstawową strukturę tego kompleksu enzymatycznego tworzą dwie podjednostki: katalityczna (PP2Ac) oraz strukturalna (PP2As), z których każda występuje w dwóch izoformach α i β . Trzecim składnikiem kompleksu może być jedna z podjednostek regulatorowych: PR55B lub PR55B'' (każda



Rys. 6.1. Skład podjednostkowy kompleksu fosfatazy PP2A. Podjednostki: PP2As – strukturalna, PP2Ac – katalityczna, PR – regulatorowa

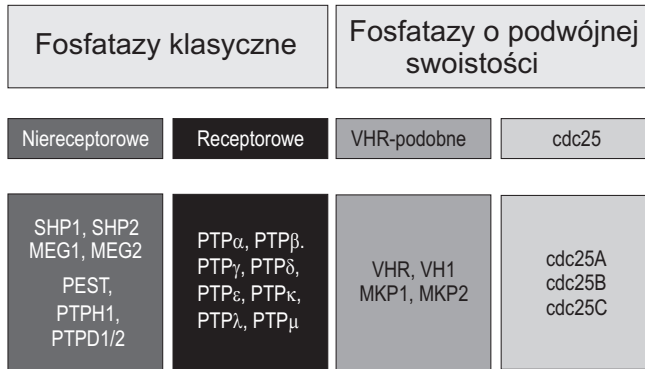
z nich może występować w pięciu izoformach) ewentualnie PR55B' (trzy izoformy). Krańcowym przykładem złożoności kompleksów enzymatycznych fosfatyz białkowych jest PP1, którą u ssaków mogą tworzyć cztery podjednostki katalityczne (α , β , $\gamma 1$, $\gamma 2$) oraz jedno z ponad 50 białek regulatorowych i/lub docelowych (substratów). Wiele z tych białek zawiera charakterystyczną sekwencję -R-V-X-F-, odpowiedzialną za wiązanie podjednostki katalitycznej. Większość z PPP (oprócz PP2B) jest inaktywowana działaniem specyficznych, naturalnych toksyn: kwasu okadaikowego (pochodna kwasów tłuszczowych) i mikrocystyn (cykliczne peptydy izolowane z cyjanobakterii), a tylko jedna (PP1) działaniem syntetycznych inhibitorów I-1 i I-2. Członkowie poszczególnych podrodzin wykazują duże podobieństwo sekwencji ich domen katalitycznych, ale różnią się swoistością substratów. Przykładowo, PP1 preferencyjnie defosforyluje podjednostkę β (B) kinazy fosforylasy (glikogenu), a PP2A defosforyluje podjednostkę α (A) kinazy fosforylasy. Nie ulega wątpliwości, że podstawową funkcją tych enzymów jest kontrola szlaków metabolicznych inicjowanych działaniem kinaz białkowych serynowo-treoninowych. Istnieją dowody doświadczone na to, że reakcje fosforylacji i defosforylacji są integrowane w czasie i przestrzeni przez swoiste białka dokujące AKAPs (zob. rozdział 3.4).

In vivo asocjacja podjednostek katalitycznych z różnymi białkami regulatorowymi (i docelowymi) prowadzi do powstania kompleksów o zróżnicowanym tkankowym profilu ekspresji i lokalizacji wewnątrzkomórkowej, które kontrolują m.in.: replikację DNA, transkrypcję, *splicing* RNA, translację, progresję przez cykl komórkowy, różnicowanie i apoptozę.

6.2. Fosfatazy tyrozynowe

Do rodziny fosfatyz białkowych tyrozynowych (PTPs, ang. *protein tyrosine phosphatases*) zalicza się zarówno fosfatazy wewnątrzkomórkowe o różnej wielkości cząsteczek (nisko- i wysokocząsteczkowe), jak i fosfatazy transbłonowe, nazywane także fosfatazami receptorowymi (zob. rozdział 2.2.3). Mimo ograniczonej homologii sekwencji aminokwasowej poszczególnych podrodzin PTPs, wszystkie te enzymy zawierają w centrum aktywnym konserwatywną ewolucyjnie sekwencję -Cys-X₅-Arg-. Na podstawie podobieństwa strukturalnego i funkcjonalnego wyróżnia się cztery główne rodziny PTPs (Rys. 6.2): duże (klasyczne) fosfatazy tyrozynowe (receptorowe i niereceptorowe), fosfatazy o podwójnej swoistości (podobne do VH1), fosfatazy cdc25 i fosfatazy drobnocząsteczkowe (LMW).

Charakterystyczną cechą dużych fosfatyz tyrozynowych (m.c. 30–50 kDa) jest obecność domeny katalitycznej, zbudowanej z około 240–250 reszt aminokwasowych, w której występuje motyw 11-aminokwasowy -(Ile/Val)-His-Cys-X-Ala-Gly-X-Gly-Arg-(Ser/Thr)-Gly-. Duże PTPs hydrolizują fosfotyrozynę z szybkością 100 000 razy większą niż fosfoserynę i fosfotreoninę. Fosfatazy klasyczne dzieli się zazwyczaj na receptorowe i niereceptorowe (Rys. 6.3). Różnice w budowie PTPs niereceptorowych dotyczą sekwencji C- i N-końcowych, odpowiedzialnych za unikalne właściwości tych enzymów. Enzymy te często zawierają poza domenami katalitycznymi także inne domeny, zaangażowane w odpowiednią lokalizację



Rys. 6.2. Rodziny i wybrani przedstawiciele białkowych fosfataz tyrozynowych

wewnątrzkomórkową i regulację aktywności katalitycznej. Przykładowo fosfatazy SHP1 i SHP2 zawierają parę domen SH2, wiążących białka zawierające fosfotyrozynę i przekazujących sygnał od receptorów czynników wzrostowych. Fosforylacja domen niekatalitycznych, zawierających serynę bądź treoninę, zmienia często aktywność i/lub lokalizację fosfataz.

Fosfatazy tyrozynowe transbłonowe mają zlokalizowany w ich części wewnątrzkomórkowej tandem domen katalitycznych, z których jedna jest zazwyczaj nieaktywna (pseudokatalityczna). Zewnątrzkomórkowa część fosfataz tyrozynowych transbłonowych zawiera szereg motywów, występujących w cząsteczkach adhezyjnych, takich jak immunoglobuliny, fibronektyna typu III czy anhydraza węglanowa, i mają potencjalne miejsca wiązania ligandów. Taka budowa jest charakterystyczną cechą receptorów błonowych o aktywności enzymatycznej (zob. rozdział 2.4) i dlatego fosfatazy te określane są często mianem fosfataz tyrozynowych receptorowych.

Rodzinę fosfataz o podwójnej swoistości dzieli się zazwyczaj na fosfatazy VHR-podobne, fosfatazy cdc25 i fosfatazę PTEN, aczkolwiek substratami tej ostatniej nie są białka, tylko fosfolipidy.

Najwcześniej odkrytą fosfatazą o podwójnej swoistości (DSPs, ang. *dual specificity phosphatases*) jest fosfataza VH1 (*vaccinia virus late H1 gene*), która swoiście defosforyluje wirusowe białko histonopodobne, niezbędne dla replikacji wirusa. Ludzki homolog VH1, określane skrótem VHR, jest enzymem o nieznanym celu. Natomiast dwa ludzkie białka o podobnej sekwencji (PAC-1 i CL-100) należą do enzymów stymulowanych sygnałem mitogennym, które defosforylują pThr i pTyr kinaz MAP i określane są skrótem MPKs (ang. *MAP kinase phosphatases*), najliczniejszej grupy wśród fosfataz VHR-podobnych. Obecnie znanych jest dziewięć ssaczych MPKs, różniących się swoistością substratową i lokalizacją komórkową. Rekombinowana MPK3 jest około 100-krotnie bardziej aktywna w stosunku do Erk2 niż do p38. Część z nich, np. CL-100 (MPK1) zlokalizowana jest w jądrze komórkowym, a część, np. PYST1 (MPK3), głównie w cytoplazmie.

Fosfatazy cdc25 zostały po raz pierwszy wykryte i opisane w drożdżach (*Schizosaccharomyces pombe*). Znane są trzy fosfatazy cdc25 ssaków: A, B i C, które

defosforylują reszty tyrozyny i treoniny kinaz cyklinozależnych, działające w fazie G1/S (cdc25A) oraz w fazie G2/M (cdc25B i cdc25C) cyklu komórkowego. Głównym celem działania fosfataz cdc25 są reszty pThr¹⁴ i pTyr¹⁵ cząsteczek kinaz cdk człowieka. Mimo że należą do fosfataz o podwójnej funkcji, ich centrum aktywne różni się znacznie od rodziny VHR.

Fosfatazy drobnocząsteczkowe (LMW-PTP) są rodziną enzymów o m.cz. około 18 kDa zaangażowanych w regulację wzrostu komórkowego. Defosforylują one receptory wielu czynników wzrostowych oraz białka RhoGAP, uczestniczące m.in. w reorganizacji cytoszkieletu. Są aktywowane przez fosforylację dwóch reszt tyrozyny (Tyr¹³¹ i Tyr¹³²), co powoduje ich translokację do błony komórkowej. Nie ma żadnego podobieństwa struktury pierwszorzędowej fosfataz niskocząsteczkowych do pozostałych grup PTPs, z wyjątkiem sekwencji Cys-X₅-Arg i obecności Asp w centrum aktywnym tych enzymów.

6.3. Fosfatydyloinozytyle w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej

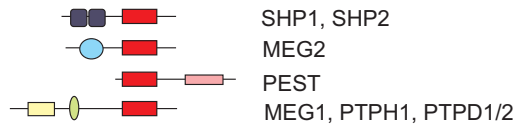
Fosfatydyloinozytyle stanowią niewielką część fosfolipidów (fosfoglicerydów) budujących błony komórek zwierzęcych. W odróżnieniu od innych fosfoglicerydów składnikiem tych lipidów jest *mio*-inozytol, sześciowęglowy alkohol cykliczny. Poszczególne fosforany fosfatydyloinozytoli (fosfoinozytydy) różnią się stopniem fosforylacji reszty inozytolowej. Praktycznie jest możliwa fosforylacja wszystkich węgli tego alkoholu. Oprócz nieufosforylowanej postaci inozytoli, fosfatydyloinozytoli (PI), najczęściej jednak występują pochodne ufosforylowane na węglach 4 i 5 inozytoli. Lipidy zawierające inozytol stanowią 10–20% wszystkich komórkowych fosfolipidów, z czego fosfatydyloinozytol (PI) stanowi około 80%, a fosfatydyloinozytolo-4-monofosforan (PI-4-P) i fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan (PI-4,5-P₂) większość z pozostałych fosfoinozytydów. Pod działaniem enzymów zmieniających stopień fosforylacji (np. kinazy 3-fosfoinozytydów, PI3K) powstają pochodne fosforanowe mające specyficzne właściwości, wykorzystywane w określonych drogach sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Fosfoinozytydy ufosforylowane w pozycji 3 są z kolei substratami fosfatazy PTEN.

6.3.1. Kinaza 3-fosfoinozytydów (PI3K) i fosfataza PTEN

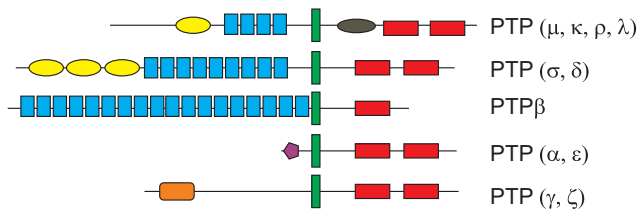
PI3K jest to enzym katalizujący reakcje fosforylacji grupy -OH związanej z węglem 3 *mio*-inozytoli, wchodzącego w skład fosfatydyloinozytoli (PI, PIP i PIP₂). Wynikiem działania tego enzymu jest synteza fosfatydyloinozytolo-3-monofosforanu (PI-3-P) z fosfatydyloinozytoli (PI), fosfatydyloinozytolo-3,4-difosforanu (PI-3,4-P₂) z fosfatydyloinozytolo-4-monofosforanu (PI-4-P) oraz fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PI-3,4,5-P₃) z fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforanu (PI-4,5-P₂). Produkty działania PI3K stanowią niewielką część komórkowych fosfatydyloinozytoli, ale są niezwykle ważne w regulacji aktywności wielu enzymów komórkowych, m.in. kinazy białkowej B (zob. rozdział 5.1).

Klasyczne

niereceptorowe



receptorowe



O podwójnej swoistości

VHR



cdc25



Rys. 6.3. Domenowa budowa wybranych fosfatyz tyrozynowych. Domeny: ■ – fosfatazy tyrozynowej, ■ – PEST, ■ – fibronektynopodobne, ■ – SH2, ● – PDZ, ● – immunoglobulinopodobne, ● – kadherynopodobne, ■ – FERM, ● – DSP, ◆ – glikozylowane

Na podstawie różnic w swoistości substratowej wyróżnia się trzy klasy PI3K. Klasa I katalizuje reakcje tworzenia PI-3-P, PI-3,4-P₂ i PI-3,4,5-P₃, klasa II – syntezę PI-3-P i PI-3,4,5-P₃, a klasa III – tylko PI-3-P. PI3K klasy I są heterodimerami zbudowanymi z podjednostki regulacyjnej (adaptorowej) i podjednostki katalitycznej. Znane są obecnie trzy izoformy podjednostki katalitycznej (p110) oraz siedem izoform podjednostki regulacyjnej, powstających w wyniku alternatywnego składania trzech genów. Podjednostka regulatorowa p85 (występująca w dwóch izoformach α i β) jest zbudowana z 724 reszt aminokwasowych i zawiera jedną domenę SH3 i dwie domeny SH2. Region położony pomiędzy domenami SH2 zawiera miejsce wiązania z podjednostką katalityczną.

Ze względu na rodzaj białka aktywującego podzielono klasę I PI3K na dwie podklasy: IA i IB, z których pierwsza odbiera sygnał od receptorowych kinaz tyrozynowych, a druga od receptorów związanych z białkami G. Nie ma zgodności co do molekularnego mechanizmu aktywacji PI3K klasy IA, ale wydaje się prawdopodobne,

że może to następować co najmniej na dwóch różnych drogach: przez wiązanie jednej lub obu domen SH2 podjednostki regulatorowej do fosfotyrozyn kinaz receptorowych lub przez wiązanie białek Ras (GTP) bezpośrednio z N-końcowym regionem podjednostki katalitycznej.

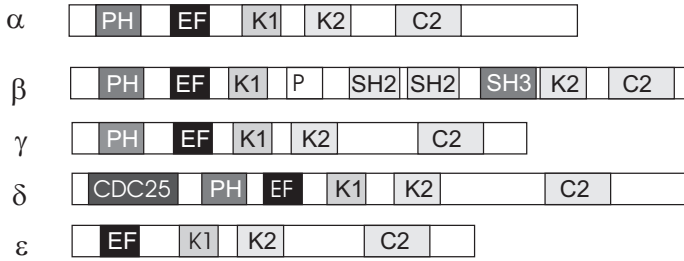
Stężenie produktów działania PI3K w komórkach spoczynkowych jest bardzo niskie, w przypadku PI-3-P stanowi około 1/10 poziomu komórkowego izomeru PI-4-P, a poziom PI-3,4-P i PI-3,4,5-P jest praktycznie niewykrywalny. Natomiast po aktywacji receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej stężenie di- i trifosforanów inozytoli gwałtownie rośnie, co wskazuje na ich udział w wewnątrzkomórkowym przeniesieniu sygnału. Żaden z wymienionych wyżej fosforanów fosfatydyloinozytoli nie jest substratem dla fosfolipazy C (PLC), co dowodzi, że związki te nie są prekursorami w syntezie odpowiednich fosforanów inozytoli. Sposób generowania tych fosforanów w odpowiedzi na stymulację zewnątrzkomórkową świadczy jednak o tym, że mogą one pełnić rolę wtórnych przekaźników odpowiedzi hormonalnej, niezależnie od produktów działania PLC. Dotychczas uzyskane wyniki wskazują, że PI3K pośredniczy w regulacji wzrostu i różnicowania komórek, sekrecji komórkowej i reorganizacji cytoszkieletu. PI3K uczestniczy także pośrednio w regulacji aktywności kinazy syntazy glikogenu 3 (GSK-3), poprzez indukowaną kinazą białkową B (PKB) inaktywację tego enzymu. Należy zaznaczyć, że niektóre izoformy PI3K mają także aktywność kinazy serynowo-treoninowej, ale jej biologiczne uzasadnienie jest trudne.

Fizjologicznymi substratami niektórych fosfataz o podwójnej swoistości nie są białka, ale fosfolipidy. Najlepiej scharakteryzowanym enzymem jest PTEN, który jest absolutnie specyficzny w stosunku do fosforanów fosfatydyloinozytoli, ufosforylowanych w pozycji 3, głównie fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PI-3,4,5-P₃). PTEN odwraca działanie PI3K i przez to jest ważnym regulatorem sygnalizacji realizowanej z udziałem kinazy białkowej B (Akt). Ze względu na skutki biologiczne jej działania jest zaliczana do grupy supresorów nowotworowych. Strukturalnie jest podobna do fosfataz o podwójnej funkcji (Rys. 6.3). Poczynając od N-końca, zawiera domeny: fosfatazową, wiążącą lipidy (C2) i 50-aminokwasową sekwencję wiążącą domenę PDZ. Fosforylacja trzech aminokwasów w tej części cząsteczki PTEN (Ser³⁸⁰, Thr³⁸² i Thr³⁸³) obniża aktywność PTEN i jej zdolność do asocjacji z substratami.

6.3.2. Fosfolipaza C

Istotną rolą produktów degradacji fosfoinozytydów jest ich udział w przekazie sygnałów zewnątrzkomórkowych jako tzw. wtórnych przekaźników informacji hormonalnej. Enzymem, który rozkłada fosfatydyloinozytyle do cząsteczek sygnałowych, jest fosfolipaza C.

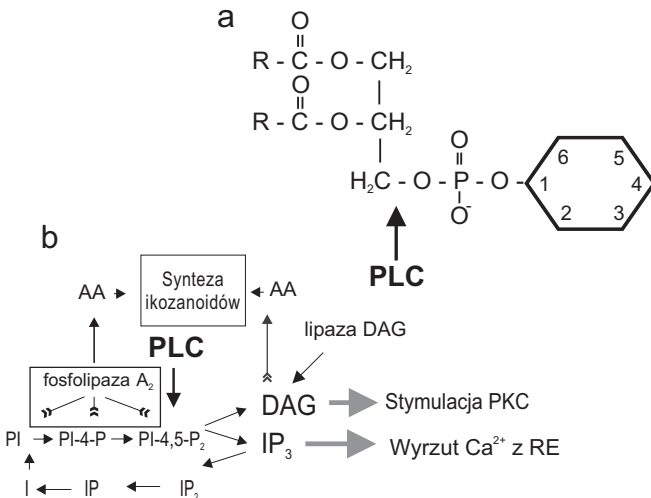
Fosfolipaza C (PLC) jest enzymem katalizującym hydrolizę wymienionych wyżej fosfolipidów zawierających inozytol. Wyróżnia się pięć typów fosfolipazy C, oznaczanych greckimi literami α – ϵ (Rys. 6.4). W obrębie każdego typu fosfolipazy C ssaków poznano dotychczas kilka izoenzymów. Poszczególne typy fosfolipazy C różnią się budową cząsteczki białka i mechanizmem aktywacji, natomiast nie różnią się swoistością działania, a substratem przez nie preferowanym jest PI-4,5-P₂.



Rys. 6.4. Różnice w budowie domenowej izoform fosfolipazy C (PLC). PH – domena wiążąca 3-fosfoinozytydy, EF – motyw dłoni EF, K1 i K2 – domeny katalityczne, CDC25 – domena fosfatazy *cdc25*, C2 – domena wiążąca fosfolipidy w sposób zależny od Ca^{2+} , SH2 i SH3 – domeny wiążące krótkie sekwencje aminokwasowi (zob. rozdział 3.1)

Wynikiem działania fosfolipazy C na PI-4,5-P_2 jest powstanie dwóch cząsteczek: 1,2-diacyloglicerolu (DAG) i 1,4,5-trifosfoinozytoli (IP_3), z których każda może pełnić funkcję wtórnego przekaźnika informacji biologicznej (Rys. 6.5).

DAG jest fizjologicznym stymulatorem kinazy białkowej C, natomiast IP_3 pełni funkcję regulatora cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia. $\text{PLC}\beta$ aktywowana jest przez białka G_q , $\text{PLC}\gamma$ – przez kinazy tyrozynowe receptorowe i niereceptorowe, a mechanizm aktywacji $\text{PLC}\delta$ jest nieznan. Przepuszcza się, że rolę fizjologicznego regulatora $\text{PLC}\delta$ może odgrywać spermina lub sfingomielina.



Rys. 6.5. a. Schemat budowy fosfatydyloinozytoli (PI) i miejsce działania fosfolipazy C (PLC), b. Cykl fosforanów inozytoli i mobilizacja drugich przekaźników: 1,2-diacyloglicerolu (DAG), 1,4,5-trifosfoinozytoli (IP_3) i kwasu arachidonowego (AA). PKC – kinaza białkowa C, RE – retikulum endoplazmatyczne

PLC γ zawiera dwie domeny SH2, co determinuje sposób jej aktywacji i ogranicza liczbę aktywatorów do białek zawierających ufosforylowaną tyrozyne. Wysoki poziom fosforylacji PLC γ (rzędu 1 mol fosfo-Tyr/1 mol białka) oraz doskonała korelacja fosforylacji z obrotem fosfatydyloinozytoli *in vivo* wskazują, że enzym ten jest fizjologicznym substratem wielu receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej, głównie czynników wzrostowych i niektórych cytokin. PLC β pośredniczy w sygnalizacji transbłonowej stymulowanej ligandami działającymi przez receptory R7G, takimi jak: hormony, neurohormony, neurotransmitery, chemokiny i wiele innych.

Literatura uzupełniająca

- Bauman E.B., Saper M.A. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *TIBS* 1996, 21, 413–417.
- Cho S.-H., Lee Ch.-H., Ahn Y. et al. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂-mediated cell signaling. *FEBS Lett.* 2004, 560, 7–13.
- Cully M., Downward J. SnapShot: PTEN signaling pathways. *Cell* 2008, 133, 550–550.e1.
- Farkas I., Dombradi V., Miskei M., Szabados L., Koncz C. Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant. Sci.* 2007, 12, 169–176.
- Florio T. Somatostatin/somatostatin receptor signaling: Phosphotyrosine phosphatases. *Mol. Cell Endocrinol.* 2008, 286, 40–48.
- Gallego M., Virshup D.M. Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleep. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005, 17, 197–202.
- Garcia A., Cayla X., Guernon J. et al. Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* 2003, 85, 721–726.
- Ishida A., Shigeri Y., Taniguchi T., Kameshita I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol. Therap.* 2003, 100, 291–305.
- Majerus P.W., Zou J., Marjanovic J., Kisseleva M.V., Wilson M.P. The role of inositol signaling in the control of apoptosis. *Adv. Enzyme Regul.* 2008, 48, 10–17.
- Radu A., Neubauer V., Akagi T., Hanafusa H., Georgescu M.-M. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol. Cell Biol.* 2003, 6139–6149.
- Tonks N.K., Neel B.G. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001, 13, 182–195.
- Tonks N.K., Neel B.G. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* 1996, 87, 365–368.

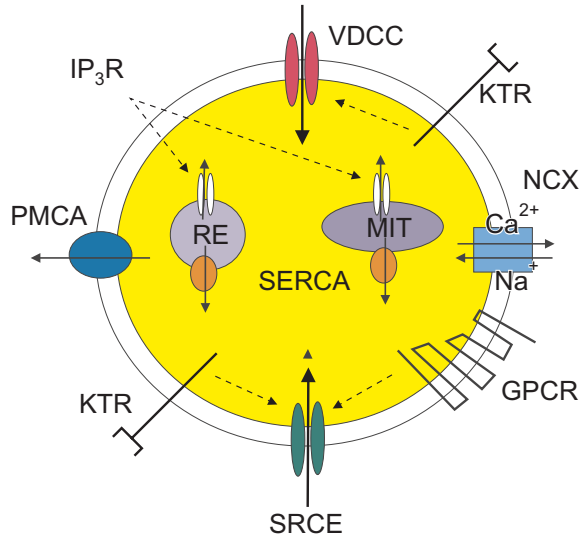
7. Białka wiążące wapń

Gradient stężenia jonów wapnia na granicy błony komórkowej jest bardzo duży. Stężenie zewnątrzkomórkowe (około 1,5 mM) jest około 10 000 razy większe niż w cytoplazmie komórki. Także gradient stężenia w poprzek błon retikulum endoplazmatycznego i mitochondriów, aczkolwiek znacznie mniejszy, pozwala na wypływ jonów Ca^{2+} z tych organelli do cytoplazmy. Dlatego w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia biorą udział liczne układy, ulokowane w błonach, służące zarówno napływowi tych jonów do cytoplazmy, jak i usuwaniu nadmiaru tych jonów.

Kontrola stężenia Ca^{2+} w czasie i zmian w jego lokalizacji wewnątrzkomórkowej są wytłumaczeniem zdolności jonów wapnia do pełnienia funkcji czynnika regulującego tak różne procesy, jak ekspresja genów, apoptoza, reorganizacja cytoszkieletu, degradacja białek, egzo- i endocytoza i wiele innych.

Uproszczony schemat napływu i wypływu jonów wapnia do cytoplazmy ilustruje rysunek 7.1. Napływ Ca^{2+} do komórki jest realizowany głównie przez kanały jonowe, takie jak: kanał wapniowy regulowany napięciem VDCC (ang. *voltage-dependent Ca^{2+} channel*) czy kanał regulowany podwyższonym stężeniem Ca^{2+} SRCE (ang. *signal regulated Ca^{2+} entry*). Znane są trzy rodziny kanałów VDCC: typu L, typu R i typu T. Większość hormonów i neurotransmiterów reguluje aktywność VDCC poprzez receptory sprzężone z białkami G (GPCR). Natomiast kanał SRCE jest ściśle powiązany ze stymulowaną zewnątrzkomórkowo aktywacją fosfolipazy C (PLC), zarówno przez receptory GPCR, jak i receptory o aktywności kinazy tyrozynowej KT. Podniesienie cytoplazmatycznego poziomu jonów wapnia może nastąpić także po stymulowanym wyrzucie tych jonów z organelli wewnątrzkomórkowych, głównie z siateczki endoplazmatycznej lub z mitochondriów. Najczęściej w procesie tym uczestniczą receptory IP_3 (inozytolo-1,4,5-trifosforanu), a w ich aktywacji uczestniczy IP_3 uwalniany z fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforanu (PIP_2) pod działaniem PLC. Receptor IP_3 jest kanałem jonowym bramkowanym ligandem, po którego otwarciu następuje wyrzut do cytoplazmy około 50% zapasów Ca^{2+} gromadzonych w tych organellach.

Obniżenie cytoplazmatycznego poziomu jonów wapnia zachodzi zarówno przez usunięcie go na zewnątrz komórki, jak i przez zapakowanie go z powrotem do organelli wewnątrzkomórkowych. Pierwszy z wymienionych procesów jest realizowany bezpośrednio, głównie w wyniku działania pompy jonowej PMCA (ang. *plasma membrane Ca^{2+} ATP-ase*) i wymiennika jonowego $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX (ang. *Na/Ca exchange*) lub pośrednio przez aktywację kanału K^+ , hiperpolaryzację błony komórkowej i obniżenie aktywności VDCC. W drugim pośredniczy ATP-aza sarko/endoplazmatyczna SERCA (ang. *sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATP-ase*), pompująca jony wapnia do organelli wewnątrzkomórkowych wbrew gradientowi stężeń tych jonów.



Rys. 7.1. Główne kanały jonowe, regulujące wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia. VDCC – kanał wapniowy regulowany napięciem, IP_3R – receptor inozytolo-1,4,5-trifosforanu, PMCA – pompa wapniowa błony plazmatycznej, NCX – wymiennik jonowy Na/Ca , KT – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej, GPCR – receptor zasocjowany z białkami G, SERCA – ATP-aza wapniowa retikulum sarko/endoplazmatycznego, SRCE – kanał wapniowy regulowany sygnałem, RE – retikulum endoplazmatyczne, MIT – mitochondrium

Właściwe stężenie jonów wapnia jest elementem krytycznym w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów żywych. U wielu organizmów większość jonów Ca^{2+} jest kompleksowana przez fosforany, tworząc egzo- i endoskeletony, które nie tylko wchodzą w skład elementów strukturalnych, lecz także buforują poziom Ca^{2+} płynów zewnątrzkomórkowych do wartości około 10^{-3} M. Natomiast stężenie wolnego wapnia cytoplazmatycznego jest około 10 000 razy mniejsze (10^{-7} M), stwarzając potencjalną możliwość importu wapnia zewnątrzkomórkowego. Wiele różnych stymulacji zewnątrzkomórkowych uruchamia transport jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki lub uwalnia wapń z zapasów wewnątrzkomórkowych w porcjach elementarnych nazywanych iskrami, podmuchami lub falami w zależności od tego, jaki obszar powierzchni wewnątrzkomórkowej pokrywają. Ten wolny wapń może funkcjonować jak wtórny przekaźnik informacji zewnątrzkomórkowej w bardzo krótkim przedziale czasu, ponieważ białka wiążące wapń i pompy wapniowe szybko doprowadzają jego stężenie do poziomu podstawowego. Krótkie, pulsacyjne zmiany stężenia jonów Ca^{2+} wywierają swoiste i różne działania na metabolizm komórkowy, które zależą od sposobu wnikania wapnia do komórki, miejsca jego działania wewnątrz komórki oraz sposobu modulacji sygnału. Typ kanału jonowego lub wewnątrzkomórkowego receptora jonów Ca^{2+} ma poważny wpływ na rodzaj ewentualnych skutków biologicznych. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa posiada także istotny wpływ na rodzaj odpowiedzi komórkowej, ponieważ wapń generowany w cytoplazmie w pobliżu

blony komórkowej może mieć zupełnie inne działanie niż ten sam wapń generowany w jądrze komórkowym. Także określona częstotliwość i amplituda pulsacji stężenia jonów Ca^{2+} może kodować różną informację biologiczną. Sygnał wapniowy jest odbierany przez liczne białka wewnątrzkomórkowe i zamieniany na zróżnicowaną odpowiedź biologiczną komórki. Grupę tę dzieli się zazwyczaj na: białka regulatorowe, białka buforujące/transportujące i białka sensorowe. Dla niektórych z tych białek, np. kinazy białkowej C, jony wapnia są bezpośrednim regulatorem ich aktywności biologicznej. Inne białka wiążące wapń są pośrednikami w przekazaniu sygnału na następne ogniwa odpowiedzi biologicznej komórki. Wśród nich są białka buforujące lub transportujące jony Ca^{2+} (np. parwalbumina, kalbindyna) oraz białka sensorowe, zmieniające swoją konformację po związaniu jonów wapniowych (m.in. troponina C, kalmodulina, aktyny, białka S100). Zadaniem białek buforujących jest ograniczenie fluktuacji cytoplazmatycznego poziomu jonów Ca^{2+} i utrzymanie jego stężenia na poziomie fizjologicznym. Niezdolność do buforowania poziomu jonów wapnia powoduje zazwyczaj śmierć komórki. Istnieje także grupa białek, które mają zdolność buforowania nadmiaru jonów Ca^{2+} , a równocześnie pełnią funkcję regulatorową w stosunku do określonych enzymów lub kanałów jonowych (np. aneksyny). Stężenie niezwiązanych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórki może wzrosnąć do 1–10 μM po stymulacji zewnętrznej (np. hormonalnej). Może to być wynikiem zarówno napływu wapnia zewnątrzkomórkowego, jak i uwalniania jonów Ca^{2+} z organelli wewnątrzkomórkowych (jądra, mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego). Różnice w cytoplazmatycznym poziomie wapnia stanowią sygnał do aktywacji wielu procesów metabolicznych, inicjowany aktywacją regulatorowych białek wiążących wapń. Za wiązanie jonów wapnia odpowiedzialne są charakterystyczne struktury białkowe. Wyróżnia się trzy typy takich struktur różniące się geometrią pętli wiążącej: motyw dłoni EF (o strukturze skręt–pętla–skręt), motyw Geisowa, nazywany także aneksynowym (zbudowany z rozdzielonych par struktur skręt–pętla–skręt) oraz domenę C2 (zbudowaną z wielu struktur β), które stanowią różne, lecz ściśle określone strukturalnie domeny wiążące jony Ca^{2+} . Motyw dłoni EF, którego obecność stwierdzono w ponad 200 białkach, występuje m.in. w kalmodulinie, troponinie C, parwalbuminie, kalcyklinie i kalwaskulinie, natomiast motyw Geisowa jest obecny głównie w aneksynach, a C2 m.in. w PKC (cPLA2 α) i w synaptosomach.

7.1. Kalmodulina

Molekularne i komórkowe mechanizmy leżące u podstaw integracji działania wielu białek wiążących jony wapnia w swoistą odpowiedź komórkową są niejasne. Większość wiadomości na ten temat pochodzi z prac dotyczących działania kalmoduliny (CaM). To niewielkie białko (148 reszt aminokwasowych) występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych. Konserwatywna ewolucyjnie cząsteczka kalmoduliny zawiera cztery motywy dłoni EF. Pierwsze dwa tworzą globularną strukturę N-końcową, połączoną krótkim, giętym łącznikiem z odcinkiem C-końcowym, zawierającym dalsze dwa motywy dłoni EF. Każdy z tych motywów może wiązać jeden jon Ca^{2+} . Znaczna część konformacji kalmoduliny ma strukturę α -helikalną, co ma istotne

znaczenie w jej oddziaływaniu z białkami docelowymi. W nieobecności jonów Ca^{2+} region N-końcowy apo-CaM przyjmuje konformację „zamkniętą”, w której helisy obu motywów dłoni EF są połączone razem. Natomiast C-końcowy odcinek apo-CaM przyjmuje konformację półotwartą, co może umożliwiać kalmodulinie oddziaływanie częścią C-końcową z niektórymi białkami wiążącymi CaM, przy spoczynkowym stężeniu jonów wapnia.

Aktywacja kalmoduliny zachodzi wówczas, gdy stężenie jonów wapnia w cytoplazmie przekroczy poziom $0,5 \mu\text{M}$. Zaktywowana kalmodulina reguluje aktywność bardzo wielu białek pełniących różne funkcje biologiczne, takich jak: enzymy, pompy jonowe, białka adhezyjne itp. Do enzymów aktywowanych przez kalmodulinę należą m.in.: kinaza CaM II, kinaza fosforylasy glikogenu, kinaza DNA, kinaza białkowa zależna od jonów Ca^{2+} , kinaza lekkiego łańcucha miozyny, cyklaza guanylanowa, cyklaza adenylanowa, fosfodiesteraza cyklicznych nukleotydów, ATP-azy związane z funkcjonowaniem pomp wapniowej i magnezowej. Niektóre z tych enzymów mogą z kolei regulować wiele różnych procesów, np. zależna od kalmoduliny kinaza II (kinaza CaM II) reguluje metabolizm substratów energetycznych, przepuszczalność dla jonów, syntezę i sekrecję niektórych neurotransmiterów. Wskazuje to na funkcjonalną uniwersalność kalmoduliny i podkreśla rolę jonów Ca^{2+} jako wtórnego przekaźnika informacji biologicznej. Pierwotnie przypuszczano, że mechanizm rozpoznawania i aktywacji tak licznych białek polega na wiązaniu przez kompleks kalmodulina- Ca^{2+} odpowiednich sekwencji aminokwasowych, tworzących dodatnio naładowane, amfipatyczne α -helisy w białkach docelowych. Udowodniono, że regiony te nie wiążą samej kalmoduliny, co wskazuje na istotną rolę wapnia w indukowaniu zmian konformacyjnych w kalmodulinie, prawdopodobnie przez odsłanianie ujemnie naładowanych części helisy, zlokalizowanych w pobliżu miejsc wiążących wapń.

Obecnie rozróżnia się przynajmniej sześć klas białek wiążących kalmodulinę (A-F) w zależności od różnic w mechanizmie regulacji białek efektorowych, zależnym bądź niezależnym od obecności jonów wapnia.

- A.** Do pierwszej (A) zaliczane są białka wiążące pozbawioną jonów wapnia CaM (apo-CaM) w sposób nieodwracalny, przy spoczynkowym cytoplazmatycznym stężeniu jonów Ca^{2+} . W tym przypadku CaM jest jedną z podjednostek białka o określonej funkcji, jak to ma miejsce w kinazie fosforylasy glikogenu, enzymu, który dysocjuje na podjednostki w warunkach redukujących i który jest aktywowany w obecności jonów wapnia.
- B.** Białka należące do klasy B także wiążą CaM w nieobecności jonów Ca^{2+} , lecz oddysocjują od kalmoduliny w wysokim, cytoplazmatycznym stężeniu jonów tego pierwiastka. Przykładem takiego białka jest neuromodulina, która może funkcjonować jako wewnątrzkomórkowy rezerwuar CaM i uwalniać ją przy wzroście poziomu jonów Ca^{2+} .
- C.** Białka klasy C (np. kalcyneuryna) tworzą nieaktywne kompleksy z CaM przy niskim (spoczynkowym) stężeniu jonów wapnia, w którym CaM jest częściowo wysycona tymi jonami (< 2 moli Ca^{2+} /mol CaM). Przy wysokiej koncentracji jonów tworzy się kompleks białko klasy C-CaM o wysokim powinowactwie, aktywowany CaM.

- D.** Czwarta klasa białek (klasa D) wiąże CaM w obecności jonów wapnia, lecz w tym przypadku kalmodulina hamuje ich aktywność. Do tej grupy białek należą m.in. niektóre kinazy receptorów związanych z białkami G oraz receptor trifosforanu inozytolu (IP₃) typu 1.
- E–F.** Białka efektorowe klasy E (zależne od CaM kinazy białkowe I, II i IV) są stymulowane przez CaM w sposób zależny od stężenia jonów wapnia, a ich aktywność jest regulowana przez inne kinazy CaM-zależne (kinazy kinaz CaM), zaliczane do klasy F.

7.2. Aneksyny

Aneksyny najczęściej definiowane są jako białka wiążące jony wapnia i fosfolipidy. W odróżnieniu od kalmoduliny, która wiąże jony wapnia przez motywy dłoni EF (miejsce wiązania typu 1), aneksyny zawierają struktury wiążące wapń określane motywem Geisowa (lub miejscem wiązania typu 2). Są konserwatywną ewolucyjnie grupą białek, występującą we wszystkich organizmach eukariotycznych (oprócz drożdży) i niewystępującą w organizmach prokariotycznych. Scharakteryzowano 12 genów aneksyn ssaków (ANXA 1–11 i ANXA 13), kodujących 15 białek (A1–A5, A6a i A6b, A7a i A7b, A8–A11, A13a i A13b). Aneksyny A1–A5, A8–A11 i A13 zbudowane z 316–357 reszt aminokwasowych mają cztery motywy Geisowa w cząsteczce, podobnie jak aneksyny A7 i A11, lecz te ostatnie są znacznie większe (466–505 reszt aa). Aneksyny A6 zawierają w cząsteczce osiem motywów Geisowa i są większe (około 670 reszt aa) od wszystkich pozostałych. Niektóre rodzaje aneksyn mogą występować w formie homodimerów lub heterodimerów z białkami S100. Mimo podobieństwa strukturalnego (zwłaszcza w okolicy domen wiążących wapń) aneksyny różnią się aktywnością biologiczną i potencjalną funkcją fizjologiczną. Wyjaśnieniem tych różnic jest zdolność oddziaływania poszczególnych aneksyn z wieloma składnikami komórki, zarówno drobnocząsteczkowymi (cholesterol, kwasy tłuszczowe, fosfolipidy), jak i z wielkocząsteczkowymi (różne białka).

Aneksyny zlokalizowane są głównie w cytoplazmie, lecz niektóre z nich (A1 i A2) mają zdolność przemieszczania się do jądra komórkowego, chociaż tylko A2 posiada sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS). Przypuszcza się, że translokacja A1 następuje wskutek zmiany struktury, spowodowanej ograniczoną proteolizą. Translokacja aneksyn do jądra komórkowego sugeruje, że mogą uczestniczyć w procesach proliferacji i różnicowania komórkowego lub w stabilizacji genomu. Część aneksyn wiąże się odwracalnie lub nieodwracalnie ze składnikami błony komórkowej i cytoszkieletu, a niewielka ich ilość jest wydzielana na zewnątrz komórki, gdzie pośredniczy w interakcji komórka–macierz zewnątrzkomórkowa. Oddziaływanie z błoną komórkową i błonami organelli komórkowych może wskazywać na udział aneksyn w budowaniu ich struktury i regulacji ich funkcji. Aneksyny zaangażowane są ponadto w kontrolę wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺, regulację transportu pęcherzykowego, hamowanie aktywności fosfolipazy A2 (PLA₂) i kinazy białkowej C (PKC), regulację egzocytozy i endocytozy oraz metabolizm cholesterolu.

Literatura uzupełniająca

- Cho W., Stahelin R.V. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1761, 838–849.
- Hayes M.J., Moss S.E. Annexins and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 322, 1166–1170.
- Montell C. The latest waves in calcium signaling. *Cell* 2005, 122, 157–163.
- Morgan R.O., Martin-Almedina S.M., Iglesias J.M., Gonzales Ch. Frenandez MP. Evolutionary perspectives on annexin calcium-binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1742, 133–140.
- Morgan R.O., Martin-Almedina S., Garcia M., Jhoncon-Kooyip J., Fernandez M.-P. Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1763, 1238–1249.
- Papp B., Brouland P., Geleba S., Sanborn B.M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics. *Semin. Cell Develop. Biol.* 2007, 18, 305–314.
- Shemarova I.V., Nesterov V.P. Evolution of Ca²⁺-signaling mechanisms. Role of calcium ions in signal transduction in lower eukaryotes. *J. Evolut. Biochem. Physiol.* 2005, 41, 303–313.

8. Czynniki transkrypcyjne

Mechanizm regulacji transkrypcji u *Eukaryota* jest procesem bardzo skomplikowanym, w którym bierze udział wiele różnych czynników. W grupie podstawowych białek zaangażowanych w ten proces można wyróżnić polimerazy RNA, ogólne (podstawowe) czynniki transkrypcyjne, specyficzne czynniki transkrypcyjne, wieloskładnikowy kompleks mediatora i białka modyfikujące aktywność chromatyny.

Czynniki transkrypcyjne są to białka (polipeptydy) wiążące się z sekwencjami promotorowymi (lub wzmacniającymi) genów, regulującymi inicjację i przebieg ich transkrypcji. Wyróżnia się zazwyczaj czynniki związane z polimerazą RNA II, określane jako podstawowe czynniki transkrypcyjne (GTFs, ang. *general transcription factors*), oraz specyficzne czynniki stymulowane zewnątrzkomórkowo, do których należą zarówno białka cytoplazmatyczne, jak i jądrowe. Do podstawowych czynników transkrypcyjnych (GTFs) zalicza się rodzinę czynników TFII (ang. *transcription factor II*), w której skład wchodzi TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF i TFIIH o zróżnicowanej budowie i funkcji. Przykładowo, TFIID są złożonym kompleksem białkowym zbudowanym z białka wiążącego TATA box (TBP, ang. *TATA box-binding protein*) i związanych z nim wielu czynników, określanymi skrótem TAFs (ang. *TATA box-binding protein-associated factors*). Czynniki te wraz z polimerazą RNA i innymi białkami tworzą podstawowy kompleks jądrowy, inicjujący transkrypcję (TIC, ang. *transcription initiation complex*).

Do specyficznych (swoistych dla określonych sekwencji DNA) należą m.in.: oprócz omówionych wcześniej receptorów superrodziny hormonów steroidowych cytoplazmatyczne (nieaktywne transkrypcyjnie) białka: NF- κ B, NFATc, STAT, SMAD, NICD oraz białka jądrowe (AP-1, Myc, p53 i wiele innych). Nie sposób omówić w tak krótkim przeglądzie wszystkich znanych czynników transkrypcyjnych, których są tysiące, dlatego omówiono tylko niektóre z nich.

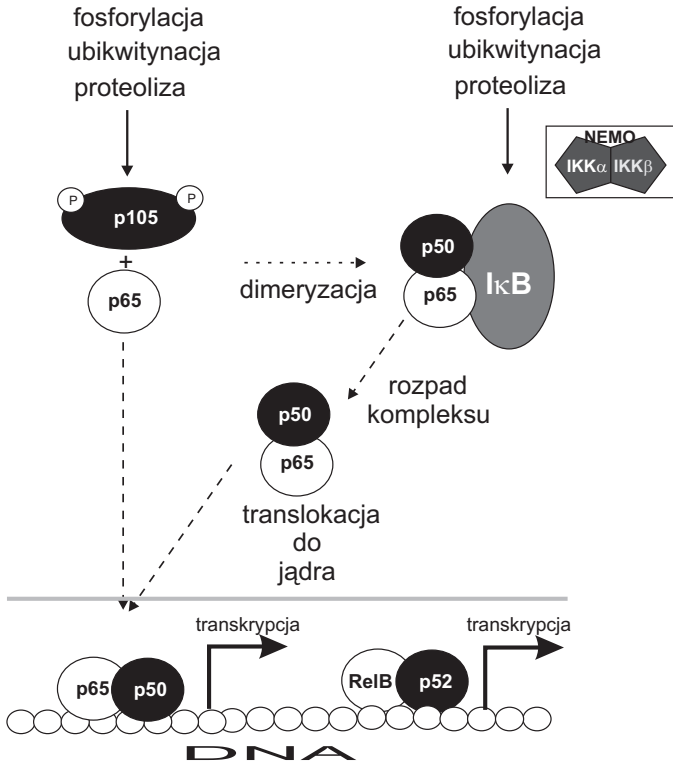
Wszystkie swoiste czynniki transkrypcyjne oddziałujące ze specyficznymi sekwencjami DNA mają charakterystyczne domeny, odpowiedzialne za takie ich właściwości, jak: wiązanie DNA, oligomeryzacja i regulacja aktywności transkrypcyjnej. Domeny wiążące DNA można podzielić na trzy podstawowe grupy: homodomeny, palce cynkowe i suwaki leucynowe. Wśród homodomen (>150 białek człowieka) wyróżnia się dwa rodzaje nazwane helisa–skręt–helisa (HTH) lub helisa–pętla–helisa (HLH). Motywy helikalne tej domeny penetrują duży rowek i rozpoznają sekwencję 6-nukleotydową, a giętkie ramię penetruje mniejszy rowek DNA. Inne tego typu domeny, palce cynkowe, występują w ponad 600 ludzkich białkach. Klasyczne palce cynkowe zbudowane są z 30 reszt aminokwasowych. Podstawową rolę spełniają konserwatywne reszty Cys i His wiążące koordynacyjnie jon cynku. Szczyt palca penetruje większy rowek i rozpoznaje trzy trypleto-we sekwencje zasad azotowych. Zwiększenie liczby palców zwiększa swoistość

rozpoznania. Receptory hormonów steroidowych zawierają także domeny palców cynkowych, lecz różniące się od klasycznych tym, że jon cynku jest wiązany przez cztery reszty Cys. Rozpoznają dwie ściśle określone sekwencje 6-nukleotydowe rozdzielone 1–5 resztami dowolnych nukleotydów. Suwaki leucynowe zbudowane są z dwóch subdomen: *regionu zasadowego*, który rozpoznaje swoiste sekwencje (pary sekwencji czterech nukleotydów o odwrotnej orientacji rozdzielonych jednym nukleotydem) oraz powtarzających się sekwencji leucynowych (tworzących tzw. suwak leucynowy), które uczestniczą w dimeryzacji monomerów (utrwalonej oddziaływaniami hydrofobowymi Leu-Leu/Ile).

Ważną funkcją czynników transkrypcyjnych jest ich zdolność do dimeryzacji, warunkowana obecnością swoistych domen, odpowiedzialnych za ten proces. Istnieje wiele klas takich białek, które rozpoznają podobne, charakterystyczne motywy w DNA. Pozwala to czynnikom transkrypcyjnym tworzyć zarówno homodimery, jak i heterodimery, zwiększające dokładność (jednoznaczność) rozpoznania odpowiednich sekwencji DNA.

8.1. NF- κ B

Rodzina czynników transkrypcyjnych NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*) obejmuje dimeryczne białka wiążące się z sekwencją DNA (-5'-GGGRNNYYCC-3'), znaną jako miejsce wiązania κ B, gdzie: R – nukleotyd purynowy, Y – nukleotyd pirymidynowy, N – dowolny nukleotyd, w części promotorowej i/lub wzmacniającej różnych genów. W komórkach ssaków wyróżnia się pięć białek należących do rodziny podzielonych na dwie grupy. Do pierwszej zalicza się białka o m.cz. około 65 kDa (RelA, RelB, C-Rel), a do drugiej białka p50 i p52 powstające z większych prekursorów p105 i p100. NF- κ B to homo- i heterodimery ww. białek, które regulują ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną, proces zapalny, proliferację, inhibicję apoptozy, odpowiedź na stres, a zaburzenia w ich funkcjonowaniu są odpowiedzialne za liczne stany chorobowe. W tworzeniu aktywnych form czynnika NF- κ B podwójną rolę gra proces ubikwitynacji i degradacji enzymatycznej białek biorących w nim udział. Po pierwsze, powstanie aktywnych podjednostek p50 i p52 z ich prekursorów wymaga kolejno: fosforylacji, ubikwitynacji i degradacji enzymatycznej. Po drugie, większość NF- κ B jest utrzymywana w cytoplazmie w formie nieaktywnej przez interakcję z rodziną białek I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B δ , Bcl-3, I κ Bz i I κ BNS). Pierwsze cztery zapobiegają translokacji NF- κ B z cytoplazmy do jądra komórkowego, ostatnie trzy są obecne w jądrze i uczestniczą bezpośrednio w regulacji aktywności transkrypcyjnej. Aktywacja kompleksów NF- κ B-I κ B polega na fosforylacji białek I κ B przez kompleks kinazy IKK, czego następstwem jest poliubikwitynacja I κ B i ich degradacja enzymatyczna przez proteasom 26S. Klasyczną drogę aktywacji NF- κ B przedstawia schemat zamieszczony na rysunku 8.1. Aktywny czynnik NF- κ B (dimer) ulega translokacji do jądra komórkowego i aktywuje transkrypcję określonych genów. Liczba aktywowanych genów może dochodzić do kilkudziesięciu i jest zależna od rodzaju podjednostek NF- κ B, typu komórek docelowych oraz współdziałania z różnymi koaktywatorami transkrypcji.



Rys. 8.1. Tworzenie aktywnych czynników NF-κB, ich translokacja do jądra komórkowego i stimulacja ekspresji genów. NEMO – niezbędny modulator NF-κB, IKK – kinaza IκB. Pozostałe objaśnienia w tekście

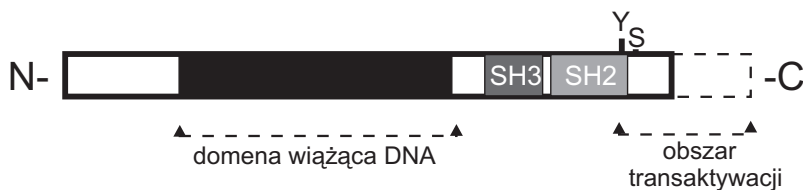
Aktywatorami zewnątrzkomórkowymi NF-κB są m.in.: cytokiny, czynniki wzrostowe i antygeny. Czynniki zaliczane do rodziny NF-κB pośredniczą w przenoszeniu informacji przez wiele szlaków wewnątrzkomórkowych. Deregulacja ekspresji genów NF-κB, a szczególnie ich nadmierna aktywacja, była stwierdzona w wielu chorobach zapalnych i nowotworowych.

8.2. Białka STAT

Białka STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) uczestniczą głównie, chociaż nie wyłącznie, w przekazaniu sygnału zewnątrzkomórkowego od receptorów asocjujących z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi do jądra komórkowego. Białka te mogą być także aktywowane pośrednio lub bezpośrednio przez kinazy tyrozynowe receptorowe, kinazy tyrozynowe niereceptorowe (Src, Abl) i receptory związane z białkami G. Białka STAT są przykładem czynników transkrypcyjnych, których aktywacja zachodzi w cytoplazmie komórki. Obecnie

znana jest sekwencja siedmiu różnych białek STAT o m.cz. 80–115 kDa (1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6). Prawie dla wszystkich tych białek (oprócz STAT2) wykazano istnienie różnych izoform, powstałych w wyniku alternatywnego składania (*splicingu*), w tym także cząsteczek o skróconych częściach C-końcowych (np. STAT1 β , STAT3 β). Intensywne badania chimer tych białek dowiodły, że w strukturze STAT można wyróżnić N-końcową domenę zamka leucynowego (prawdopodobnie odpowiedzialną za dimeryzację STAT i kooperatywne ich wiązanie do podwójnej nici DNA), domenę wiążącą DNA, domenę SH3 (odpowiedzialną za wiązanie domen bogatych w prolinę innych białek), domenę SH2 (którą łączą się z fosfotyrozynami zaktywowanych wiązaniem ligandu receptorów cytokin) i domenę C-końcową, odpowiedzialną za transaktywację białek STAT (Rys. 8.2). W tej ostatniej domenie zlokalizowane są reszty tyrozyny (Y) i seryny (S), których fosforylacja przez odpowiednie kinazy białkowe jest odpowiedzialna za przejściową aktywację i dezaktywację białek STAT. Wszystkie występują w cytoplazmie komórki w monomerycznej formie nieaktywnej (nieufosforylowanej). Związanie białek STAT z receptorem umożliwia ich aktywację poprzez fosforylację na tyrozynie i dimeryzację cząsteczek STAT. Dimery ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiążą się do swoistych sekwencji regulatorowych DNA i indukują transkrypcję określonych genów, m.in. cykliny D1. Trudnym do wyjaśnienia zjawiskiem jest mechanizm translokacji dimerów STAT z cytoplazmy do jądra komórkowego. Białka STAT nie mają klasycznej sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS) i nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jaka struktura jest odpowiedzialna za tę translokację. Wiadomo natomiast, że w jądrze dimery STAT wiążą się z sekwencją TTN₅AA DNA oraz z funkcjonalnymi domenami innych białek współuczestniczących w regulacji transkrypcji genów.

Standardowy, powszechnie przyjęty model aktywacji białek STAT zakłada, że po zewnątrzkomórkowej stymulacji cytokinami latentne białka są pobierane z cytozolowej puli monomerów i po aktywacji transportowane do jądra. Należy zaznaczyć, że nie jest to jedyna, znana hipoteza na temat działania białek STAT. W 1999 roku M.I. Ndubuisi i wsp. zaproponowali model tzw. statosomu. Zakłada on, że w cytozolu oprócz monomerów i dimerów białek STAT występują wielkocząsteczkowe (m.cz. 200–400 kDa) kompleksy STAT z innymi, bliżej niescharakteryzowanymi białkami, określane mianem statosomów typu I (statosom I). Te kompleksy miałyby pośredniczyć w aktywacji (prezentacji białek STAT receptorom, ich fosforylacji i oligomeryzacji), a następnie w formie statosomów typu II (m.cz. 1–2 MDa) w translokacji białek STAT do jądra komórkowego.

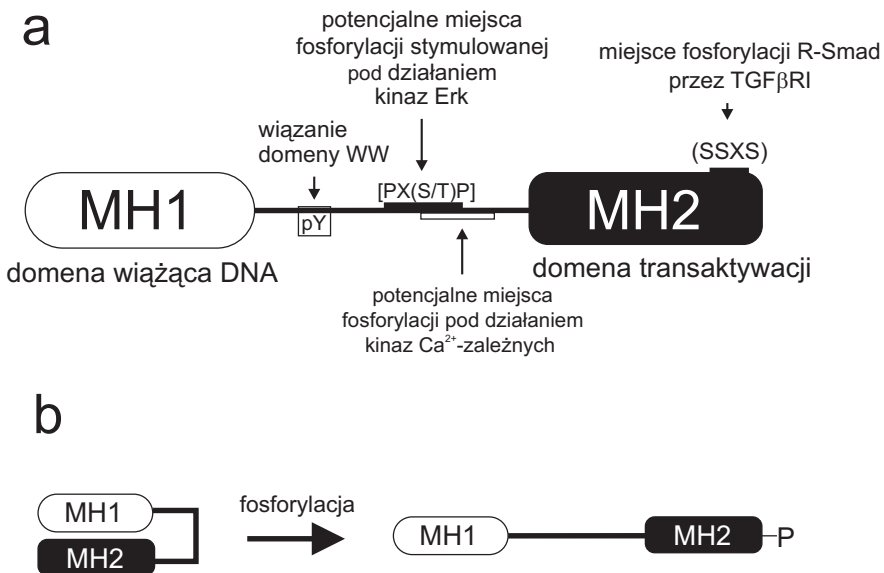


Rys. 8.2. Schemat domenowej budowy białek STAT. Potencjalne miejsca fosforylacji przez kinazy białkowe tyrozynowe (Y) i serynowo-treoninowe (S)

Aktywność białek STAT jest także kontrolowana przez swoiste inhibitory białkowe. Wyróżnia się trzy typy białek hamujących aktywację STAT: fosfatazy SHP-1 i SHP-2, białka SOCs (ang. *suppressor of cytokine signalling*), asocjujące z pętlą aktywacyjną białek JAK oraz białka PIAS (ang. *protein inhibitor of activated STAT*), hamujące wiązanie ufosforylowanych dimerów STAT do DNA.

8.3. Białka Smad

Badania genomów *Drosophila* i *Caenorhabditis elegans* doprowadziły m.in. do identyfikacji konserwatywnej ewolucyjnie rodziny genów, kodujących białka pośredniczące w wewnątrzkomórkowym przekazie sygnału, inicjowanego czynnikami zaliczanymi do superrodziny TGF β . Nazwa tych białek powstała z połączenia dwóch nazw: białka kodowanego przez gen muszki owocowej – Mad (ang. *mothers against dpp*) i białek kodowanych przez geny *C. elegant*, zmutowane u osobników małych – Sma (ang. *small*). Ssacze homologi tych białek określane są skrótem Smad, dla podkreślenia ich funkcjonalnego podobieństwa do białek bezkręgowców. Obecnie znanych jest osiem różnych białek zaliczanych do rodziny Smad, które są dzielone na trzy grupy: R-Smad, Co-Smad i I-Smad. Do pierwszej należą białka Smad regulowane receptorowo (R-Smad); zalicza się do nich Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 i Amad8. Po ufosforylowaniu białka te tworzą heterokompleksy ze wspólnym partnerem Co-Smad (ang. *common-Smad*). U ssaków występuje jedno takie białko Smad4 (choć trwają intensywne badania nad wyizolowaniem

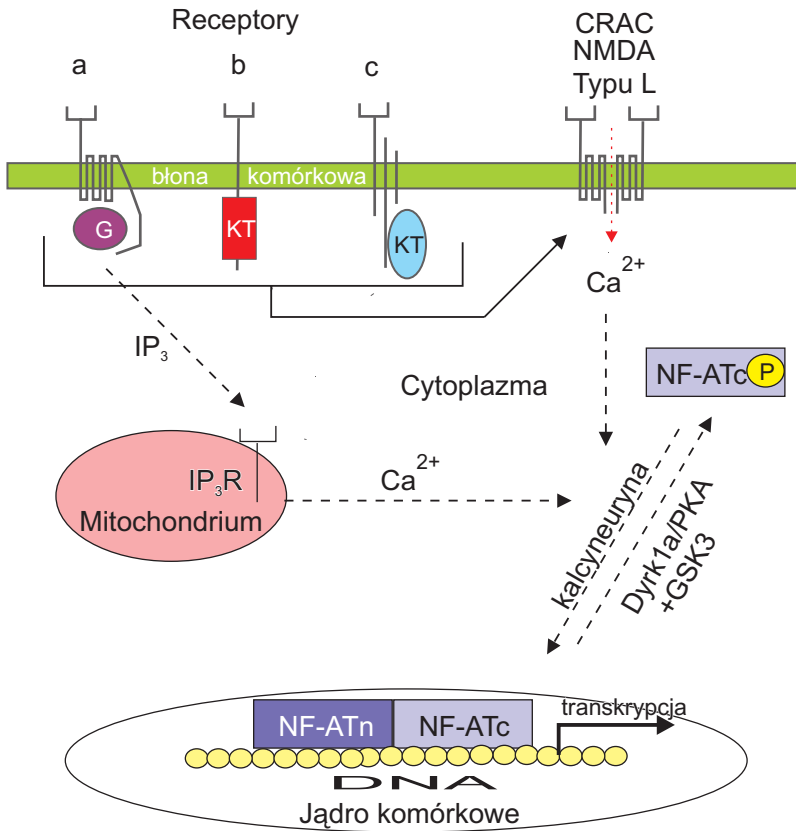


Rys. 8.3. Domenowa budowa białek R-Smad i Co-Smad (a) i zmiana konformacyjna białek R-Smad po ich fosforylacji (b)

innych). Inhibitorowe białka Smad (I-Smad; Smad 6 i 7) tworzą stabilne asocjaty z receptorem TGF β I (a Smad 6 także ze Smad4), przeciwdziałając przeniesieniu sygnału na tej drodze. R-Smad i Co-Smad mają dwie domeny o podobnej sekwencji na swoich końcach N i C. Domeny te, nazywane MH1 i MH2 (ang. *Mad-homology*), są rozdzielone regionem bogatym w prolinę o różnej długości i różnej funkcji (Rys. 8.3a). Domena MH1 białek Smad3 i Smad4 ma zdolność wiązania do DNA, a także asocjacji z koaktywatorami i czynnikami transkrypcyjnymi. Domena MH2 jest istotna dla tworzenia homo- i heterokompleksów białek Smad oraz regulacji aktywacji i represji transkrypcji. Obszar łączący obie domeny posiada sekwencje -Pro-X-Ser-Pro- lub -Pro-X-Thr-Pro-, których hydroksyaminokwasy mogą ulegać fosforylacji pod działaniem kinaz MAP. Prawdopodobnie taka fosforylacja moduluje odpowiedź komórki na stymulację TGF β . Domena MH2 zawiera motyw -SS(V/M)S- zlokalizowany przy C-końcu cząsteczki Smad. Fosforylacja dwóch reszt seryny w tym motywie jest odpowiedzialna za indukowaną receptorem TGF β RI aktywację białek R-Smad i translokację tworzonych następnie kompleksów R-Smad-Co-Smad do jądra komórkowego. W nieaktywnych białkach R-Smad domeny MH1 i MH2 oddziałują z sobą i hamują aktywność jedna drugiej (Rys. 8.3b). Białka I-Smads nie mają domeny MH1, natomiast mają domenę MH2, która umożliwia im wiązanie się z receptorem TGF β RI i hamuje dalszy przekaz sygnału.

8.4. NF-AT

NF-AT (ang. *nuclear factor of activated T cells*) został opisany po raz pierwszy w aktywowanych komórkach T (stąd nazwa). Znanych jest pięć izoform NF-AT, cztery zlokalizowane są w cytoplazmie NF-ATc (1–4), a jedna NF-ATn jest zlokalizowana w jądrze komórkowym. NF-ATc są czynnikami występującymi w cytoplazmie komórki w formie nieaktywnych fosfoprotein. Po stymulacji receptorowej następuje aktywacja kalcyneuryny (fosfatazy serynowo-treoninowej, PP2B), aktywowanej przez wzrost cytoplazmatycznego poziomu jonów wapnia. Przypuszcza się, że zależna od kalcyneuryny rodzina NF-AT powstała na drodze rekombinacji genów ze wspólnego przodka około 500 milionów lat temu i występuje wyłącznie u kręgowców. Aktywatorami NF-AT są receptory o aktywności kinazy tyrozynowej, receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi i receptory asocjujące z białkami G (Rys. 8.4). W każdym przypadku aktywatorem kalcyneuryny jest wzrost cytoplazmatycznego poziomu jonów wapnia o około 400 nM. Wzrost poziomu jonów wapnia jest spowodowany napływem wapnia zewnątrzkomórkowego przez kanały CRAC (ang. *calcium release-activated calcium*), kanały wapniowe typu L lub kanały NMDA (ang. *N-methyl D-aspartate*) bądź uwolnieniem z zapasów wewnątrzkomórkowych (np. z mitochondriów przez kanały regulowane 1,4,5-trifosfoinozytolem). Raz zaktywowana kalcyneuryna usuwa szereg reszt fosforanowych, w regionach bogatych w reszty serynowe lub serynowe i prolinowe, zlokalizowanych głównie przy N-końcu białek NF-AT. Defosforylacja NF-ATc powoduje translokację tych czynników do jądra komórkowego, gdzie asocjują z jądrowym NF-ATn. Równoległe aktywowane są drogi sygnałowe PKC/Ras prowadzące do syntezy i aktywacji AP-1,



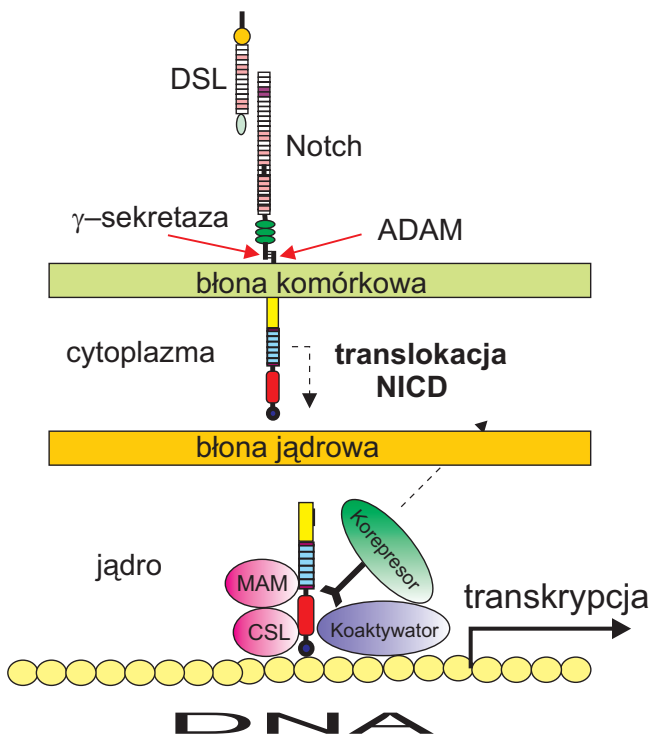
Rys. 8.4. Mechanizm aktywacji i dezaktywacji białek NF-AT. Receptory sprzężone z białkami G (a), o aktywności kinazy tyrozynowej [KT] (b), asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi (c). CRAC, NMDA, Typu L – kanały jonowe w błonie plazmatycznej, IP₃R – kanał jonowy regulowany inozytolo-1,4,5-trifosforanem

które z kolei kooperują w regulacji ekspresji genów wielu kluczowych cytokin. Raz defosforylowane NF-ATc mogą być ponownie refosforylowane przez różne kinazy białkowe serynowo-treoninowe, co inicjuje eksport NF-ATc z jądra do cytoplazmy. Proces ten wymaga kolejnego działania kinaz jądrowych: kinazy tyrozynowej o podwójnej swoistości 1a (Dyrk1a, ang. *dual-specificity tyrosine kinase 1a*) lub kinazy białkowej A, a następnie kinazy syntazy glikogenu 3 (Rys. 8.4). W komórkach spoczynkowych cząsteczki NF-ATc są konstytutywnie fosforylowane przez kinazy białkowe (kinaza kazeiny 1 i inne), utrzymując NF-ATc w stanie nieaktywnym. NF-AT uczestniczą w aktywacji wielu genów, m.in.: cytokin, podjednostek kanałów jonowych, enzymów uczestniczących w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (np. cyklazy adenylanowej) i białek regulujących apoptozę. Czynniki NF-AT uczestniczą w wielu procesach komórkowych, takich jak morfogeneza, rozwój i funkcjonowanie wielu typów komórek.

8.5. NICD (wewnątrzkomórkowa część receptorów Notch)

Receptory typu Notch (opisane w rozdziale 2) reprezentują unikatowy sposób przekazu sygnału od błony komórkowej do jądra komórki, w którym wewnątrzkomórkowa część receptora jest jednocześnie czynnikiem transkrypcyjnym.

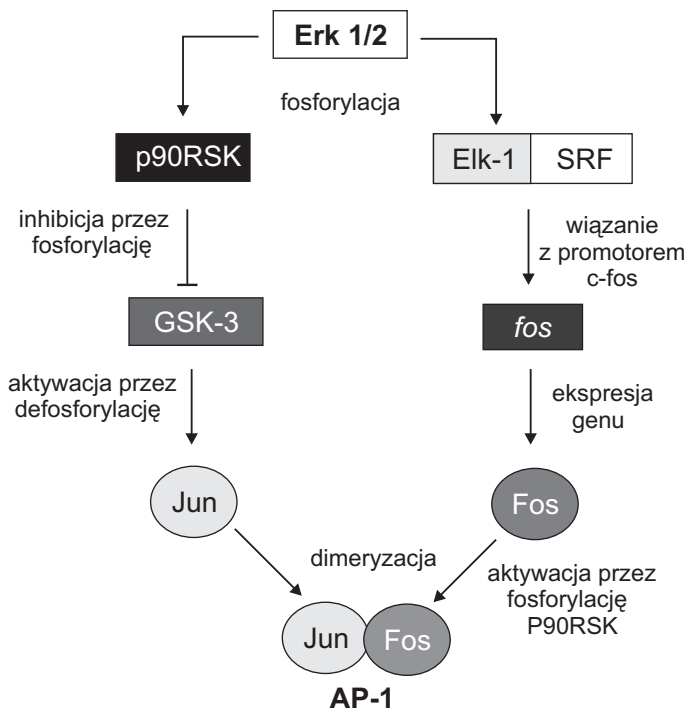
Aktywacja receptorów Notch na drodze jukstakrynej, przez swoje ligandy (Delta lub Jagged/Serrate), powoduje serię cięć proteolitycznych wewnątrzkomórkowej części receptora (Rys. 8.5). Pierwsze cięcie proteolityczne w miejscu S2 jest realizowane przez metaloproteiny z rodziny ADAM. Zewnątrzkomórkowa część Notch ulega transendocytozie do komórek wysyłających sygnał, a fragment zakotwiczony w błonie komórek odbiorczych jest rozpoznawany przez składnik kompleksu γ -sekreazy (aminopeptydazę nikastryny NCT) i przenoszony do całego kompleksu (PS, NCT, PEN2, APH1). γ -sekreaza rozcina ten fragment w miejscu S3, uwalniając peptyd NICD (ang. *Notch intracellular domain*), który ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie reguluje transkrypcję określonych genów. Mechanizm tej regulacji polega w uproszczeniu na związaniu NICD z jednym ze składników kompleksu korepresorowego, białkiem CSL, i związaniu go w kompleks z koaktywatorami transkrypcji, co powoduje m.in. ekspresję genów rodzin Hes i HRT/HERP/Hey.



Rys. 8.5. Aktywacja i przekaz sygnału przez wewnątrzkomórkową część receptora Notch, określaną skrótem NICD

8.6. AP-1

Nazwą AP-1 (ang. *activating protein 1*) określa się rodzinę homo- i heterodimerycznych czynników transkrypcyjnych zbudowanych z białek jądrowych Jun i Fos. AP-1 został odkryty ponad 20 lat temu, jako regulator genu metaloproteinazy MMP1. Obecnie wiemy, że w skład rodziny czynnika AP-1 wchodzi 18 różnych białek homo- i heterodimerycznych, zbudowanych z monomerów białek Jun (c-Jun, JunB i JunD) oraz białek Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 i Fra-2). Białka Jun i Fos zawierają zasadowy rejon zamka leucynowego (bZIP, ang. *basic region leucine zipper*), który pośredniczy w interakcji z innymi białkami zawierającymi domenę bZIP, takimi jak: ATF (ang. *activating transcription factor*), MAF (ang. *musculo-aponeurotic fibrosarcoma*), C/EBP (ang. *CCAAT enhancer binding protein*) itp. W aktywacji transkrypcji genu *fos* uczestniczą białka określane skrótem TCFs (ang. *ternary complex transcription factors*), będące podgrupą rodziny Ets (Elk-1, Sap 1/2) oraz czynniki odpowiedzi na surowicę (SRFs, ang. *serum response factors*). Kompleks tych białek umożliwia stymulację transkrypcji *fos*. Aktywna forma Fos jest tworzona i stabilizowana na drodze fosforylacji dwóch reszt seryny m.in. przez kinazę rybosomowego białka S6 – p90RSK. W odróżnieniu od genu *fos* jego partner *jun* jest konstytutywnie aktywny,



Rys. 8.6. Tworzenie aktywnego czynnika transkrypcyjnego AP-1 stymulowane kinazą Erk. p90RSK – kinaza rybosomowego białka S6, Elk-1 – czynnik transkrypcyjny z rodziny Ets, SRF – czynnik odpowiedzi na surowicę, GSK-3 – kinaza syntazy glikogenu 3

choć jego produkt (białko Jun) wymaga wstępnej aktywacji. Mechanizm tworzenia aktywnego czynnika AP-1 przedstawia rysunek 8.6. Znanych jest wiele różnych miejsc wiązania AP-1 do DNA, zależnych od składu dimeru, rodzaju komórek i interakcji z innymi czynnikami transkrypcyjnym i kofaktorami (NF- κ B, CBP (ang. *CRE-binding-protein*), Rb, SMAD3 i SMAD4). Dimery AP-1: Jun-Jun i Jun-Fos wiążą się z wysokim powinowactwem z miejscem wiązania estrów forboli (TPA, ang. *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) określanym skrótem TRE (ang. *TPA response element*) o sekwencji nukleotydów 5'-TGAC/GTCA-3'. Białka Jun i Fos tworzące dimery z innymi białkami, mającymi domeny bZIP, mogą wiązać się do innych sekwencji promotorowych, np. CRE (ang. *cAMP response element*) czy ARE (ang. *activin response element*). Aktywność AP-1 jest regulowana głównie na drodze fosforylacji/defosforylacji w domenie transaktywacji. Członkowie rodziny AP-1 różnią się w swoich domenach regulatorowych, co tłumaczy ich swoistość funkcjonalną. Czynniki transkrypcyjne AP-1 uczestniczą w regulacji: cyklu komórkowego, proliferacji, różnicowania, apoptozy i wielu innych procesów komórkowych. Białka te mogą być aktywowane przez wiele różnych ligandów, m.in. przez: czynniki wzrostowe, hormony, cytokiny, stres (ROS, UV).

8.7. Myc

Czynnik transkrypcyjny c-Myc jest białkiem jądrowym kontrolującym ekspresję tysięcy genów, których produkty uczestniczą w regulacji takich procesów, jak: proliferacja, różnicowanie, apoptoza i wielu innych. Białko to jest członkiem rodziny czynników transkrypcyjnych, określanych skrótem bHLH-LZip (ang. *basic helix-loop-helix leucine zipper*). Białko to zawiera N-końcową domenę aktywującą transkrypcję, która oddziałuje ze składnikami kompleksu polimerazy RNA II, oraz dwie domeny położone przy C-końcu łańcucha. Są to domeny: zamka leucynowego, sekwencja odpowiedzialna za heterodimeryzację c-Myc z innym czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny bHLH-LZip, określanym skrótem Max, i domena zdolna do wiązania heksamerycznej sekwencji DNA (5'-CACGTG-3'), tzw. E-box. Heterodimeryzacja Myc/Max jest procesem, który pośredniczy we wszystkich znanych efektach biologicznych inicjowanych przez białko c-Myc. Heterodimery Myc/Max wiążą się do DNA i aktywują transkrypcję określonych genów. Ponieważ zarówno c-Myc, jak i jego mRNA mają krótki okres półtrwania (w przeciwieństwie do Max), poziom dimeru Myc/Max zależy od stężenia c-Myc i jest regulowany głównie ekspresją jego genu. Synteza c-Myc jest stymulowana przez białka STAT, a te przez kinazę Src. Aktywność c-Myc może być również regulowana potranskrypcyjnie przez konkurencję z dimerami innych białek z rodziny bHLH-LZip (Max/Mad i Max/Mxi-1) o wiązanie do sekwencji E-box, hamującymi transkrypcję. Mechanizm antagonistycznego efektu działania dimerów Max/Mad i Max/Mxi-1 nie jest w pełni wyjaśniony. Wykazano, że białka Max, Mad i Mxi-1 wiążą się z kompleksem represora transkrypcji (Sin3-CoR) o aktywności deacetylazy histonów, w przeciwieństwie do c-Myc, które wiąże się z białkiem TRRAP (ang. *transactivation/transformation domain – associated protein*), wchodzącym w skład kompleksu acetylotransferazy

histonów. Białko TRRAP oddziałuje także z czynnikiem transkrypcyjnym E2F1, co łączy zależną od c-Myc aktywność transkrypcyjną z progresją przez cykl komórkowy. Wymienione interakcje białek bHLH-LZip są tylko częścią znanej dziś roli innych białek wiążących c-Myc (YY-1, AP-2, BRCA-1, TFII-I itd.) w regulacji jego aktywności transkrypcyjnej.

c-Myc może być zarówno aktywatorem, jak i inhibitorem transkrypcji w zależności od natury czynników z nim asocjujących. W kompleksie z innym członkiem rodziny bHLH-LZip, białkiem Max, aktywuje transkrypcję poprzez interakcję z sekwencją określaną jako E-box w części enhancera (wzmacniacza). W promotorach pozbawionych sekwencji TATA, c-Myc hamuje transkrypcję przez wiązanie się z regionem inicjacji transkrypcji (Inr). Przyjmuje się, że c-Myc jest białkiem uczestniczącym w regulacji sygnału mitogennego, głównie przez regulację aktywności kinaz cyklozależnych. Kontroluje zarówno transkrypcję genów białek stymulujących przejście przez cykl komórkowy (np. cykliny D2 i fosfatazy cdc25), jak i represję genów białek hamujących ten proces, m.in. inhibitorów kinaz cyklozależnych (np. p15^{INK4}). Zarówno gen cykliny D2, jak i geny fosfataz cdc25 mają w swoich promotorach miejsca wiążące c-Myc.

8.8. Czynniki transkrypcyjne E2F

Czynnik transkrypcyjny E2F (ang. *E2a transcription factor*) został odkryty jako białko gospodarza wiążące promotor wirusowy E2a w komórkach zakażonych adenowirusem. Rodzina E2F liczy obecnie siedem białek, które tworzą heterodimery z białkami DP (DP1 i DP2). Zarówno białka E2F, jak i DP zawierają centralną, konserwatywną ewolucyjnie domenę wiążącą DNA (DB, ang. *DNA-binding*) i domenę dimeryzacji. Czynniki E2F(1–3) mają domenę wiążącą kinazy cyklozależne (cyklinę A), czynniki E2F(1–5) mają także domenę wiążącą tzw. białka kieszeniowe (białka: Rb, p107 i p130), czynniki E2F(6–7) nie mają domeny wiążącej białka kieszeniowe, a E2F7 nie posiada domeny dimeryzacji z białkami DP. Białka DP są nieswoistą częścią heterodimerów, stabilizują tylko aktywne kompleksy. Białko DP1 występuje powszechnie, a białko DP tylko w sercu. Czynniki E2F(1–3) są silnymi aktywatorami transkrypcji. Ich poziom w komórkach spoczynkowych jest niski i wzrasta w późnej fazie G1. Czynniki E2F(4–5) w fazie G0 i wczesnej G1 tworzą kompleksy z białkami p107 i p130, ulegają translokacji do jądra, gdzie pełnią funkcję represorów transkrypcji. Białka E2F(1–3) występują w formie nieaktywnych kompleksów z białkiem Rb. Fosforylacja białek Rb powoduje uwolnienie skompleksowanych z nimi wyżej wymienionych czynników i stymulację transkrypcji. Zdarzenia te powodują wejście komórek w fazę S i umożliwiają realizację dalszych etapów reakcji wewnątrzkomórkowych prowadzących do mitozy. Precyzyjny mechanizm aktywacji transkrypcji przez E2F jest niejasny. Najbardziej prawdopodobne wydaje się, że E2F (E2F1) oddziałuje z białkiem CBP (ang. *cAMP binding protein*), które jest koaktywatorem transkrypcji i ma aktywność acetylotransferazy histonów (HAT). Jak wiadomo, acetylacja histonów powoduje rozluźnienie struktury chromatyну i ułatwia proces transkrypcji.

8.9. Rodzina białka p53

Komórki prawidłowe są narażone stale na egzogenne i endogenne czynniki stresowe, mogące powodować zmiany ich struktury i funkcji. Szczególnie niebezpieczne są defekty genetyczne, które mogą być przenoszone do komórek potomnych. Ponad ćwierć wieku temu odkryto białko o m.c. około 53 kDa zapobiegające stresowi komórkowemu, szczególnie takiemu, który powoduje uszkodzenia DNA. W komórkach prawidłowych poziom tego białka jest bardzo niski. W odpowiedzi na stres białko p53 ulega modyfikacji chemicznej, co z kolei prowadzi do jego stabilizacji i wzrostu jego poziomu komórkowego. Akumulacja p53 powoduje aktywację transkrypcji licznych genów, których produkty są zaangażowane w różne procesy biologiczne, m.in.: w regulację cyklu komórkowego, naprawę DNA i apoptozę. Okazało się, że jest to czynnik transkrypcyjny, który wywiera działanie ochronne przez zatrzymanie cyklu komórkowego (umożliwiające naprawę DNA) lub przez indukcję apoptozy. Odkryte w 1979 roku białko p53 zbudowane jest w przypadku człowieka z 393 reszt aminokwasowych. Mimo upływu prawie 30 lat od jego odkrycia struktura przestrzenna tego białka nie jest do końca poznana, głównie ze względu na trudności w krystalizacji. Natomiast znana jest domenowa budowa p53 (Rys. 8.7) i funkcja biologiczna poszczególnych jego domen. Poczynając od N-końca, białko p53 zawiera domeny: transaktywacji (DT), SH3 (wiązanie sekwencji bogatych w prolinę), wiążącą DNA (W-DNA), lokalizacji jądrowej (NLS), eksportu jądrowego (NES) oraz domenę C-końcową (odpowiedzialną za tetrameryzację białka).

Białko p53 wywiera swoje działanie biologiczne przez stymulację lub inhibicję transkrypcji licznych genów. Oddziaływanie z tymi genami polega głównie na wiązaniu tetrameru p53 ze swoistymi sekwencjami DNA. Sekwencje te to dwa fragmenty dziesięcionukleotydowe rozdzielone lub nie insercją 13 nukleotydów. Ogólny wzór tych sekwencji to 5'-Pur-Pur-Pur-C-(A/T)-(T/A)-G-Pir-Pir-Pir-3', gdzie Pur oznacza nukleotyd purynowy, a Pir – nukleotyd pirymidynowy, aczkolwiek istnieją liczne odstępstwa od tej reguły.

Mimo że poznano już wiele genów, których ekspresję reguluje p53, to przypuszczalnie ich liczba jest znacznie większa. Poznane dotychczas geny kodują białka zaangażowane m.in. w regulację: przeżycia i programowanej śmierci komórki (np. IGFBP3, Bax, TGF α), cykl komórkowy i naprawę DNA (np. HGF, EGFR, gadd45, Rb, p21) i autoregulację poziomu p53 (MDM2). To ostatnie białko odgrywa szczególnie rolę w regulacji funkcji p53, albowiem p53 jest aktywatorem genu *mdm2*, lecz z kolei MDM2 kontroluje degradację p53 (Rys. 8.8). W normalnych warunkach

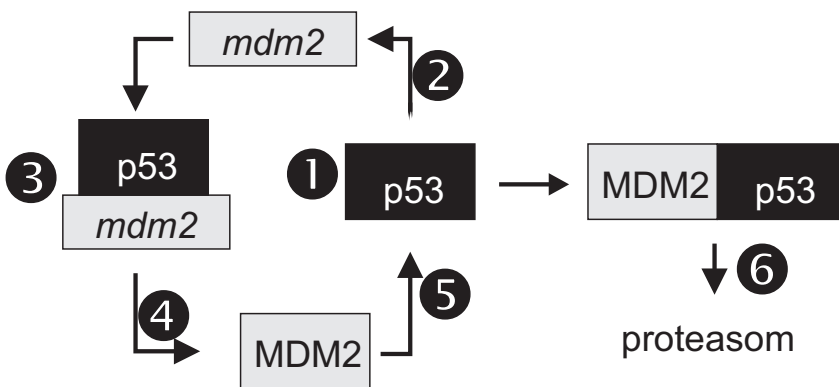


Rys. 8.7. Domenowa budowa ludzkiego białka p53. Domeny: DT – transaktywacji, SH3 – wiążąca sekwencje bogate w prolinę (PXXP), W-DNA – wiążąca DNA, NLS – lokalizacji jądrowej, NES – eksportu z jądra, CK – C-końcowa

MDM2 wiąże się z p53 i katalizuje jego ubikwitynację, co skutkuje degradacją enzymatyczną p53. Fosforylacja p53 przez wybrane kinazy białkowe (np. DNA-PK, ATM) blokuje wiązanie MDM2 do p53 i jego degradację.

Później scharakteryzowano dwa inne białka strukturalnie podobne do p53, chociaż o większej masie cząsteczkowej. Rodzina białka p53 jest kodowana przez trzy różne geny, kodujące białka p53, p63 i p73. Każdy z nich może ulegać ekspresji w dwóch formach (p53 i Δ Np53, TAp63 i Δ Np63 oraz TAp73 i Δ Np73), gdzie TA jest domeną czynnika transkrypcyjnego, a Δ N – ulegającą delecji przy N-końcu domeną nieaktywnego normalnie czynnika transkrypcyjnego. Transkrypcja tych dwóch izoform jest regulowana przez dwa różne promotory, a ponadto znanych jest wiele izoform każdego białka powstających w wyniku różnego składania ich mRNA. W budowie cząsteczki białek z rodziny p53 wyróżnia się trzy główne domeny: TA (czynnika transkrypcyjnego), DBD (wiążącą DNA) i OD (oligomeryzacji). Podobieństwo sekwencji aminokwasowej w stosunku do p53 w obrębie poszczególnych domen wynosi do p63 i p73 odpowiednio: dla TA 26 i 30%, dla DBD 80 i 79% oraz dla OD 31 i 33%. Izoformy DN mogą działać jako inhibitory izoform TA i dlatego izoformy TA i Δ N wykazują odpowiednio pro- i antyapoptotyczne właściwości. Co więcej ekspresja Δ Np73 jest stymulowana przez p53 i DNp73. Tak więc, transkrypcyjnie aktywne białka supresorowe p53 i TAp73 indukują ekspresję DNp73, które hamuje ich działanie, na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. W przeciwieństwie do DNp73 ekspresja DNp63 jest hamowana. Potwierdzeniem hipotezy o współzależności działania tych białek były doświadczenia na myszach pozbawionych genów p63 i p73, w których p53 było całkowicie nieaktywne.

Aktywność biologiczna ww. białek obejmuje szerokie spektrum działań od rozwoju, przez apoptozę i odwracalne zahamowanie cyklu komórkowego, do procesu starzenia komórkowego. Funkcja tych białek może być regulowana m.in. przez ich



Rys. 8.8. Kontrola poziomu białka p53 przez białko MDM2 na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego. 1 – wzrost jądrowego poziomu p53, 2 – wiązanie p53 do promotora genu *mdm2*, 3 – ekspresja genu *mdm2*, 4 – synteza MDM2, 5 – wiązanie MDM2 do p53 i hamowanie jego aktywności transkrypcyjnej, 6 – degradacja enzymatyczna

lokalizację subkomórkową, modyfikacje potranslacyjne lub swoiste białka regulatorowe. Wszystkie zawierają sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS) oraz sekwencję eksportu jądrowego (NES) i zlokalizowane są głównie w jądrze komórkowym. Wszystkie są ubikwitylowane w jądrze i degradowane w proteasomach cytoplazmatycznych. Zatrzymanie tych białek w cytoplazmie, powodowane zarówno ich mutacjami, jak i oddziaływaniem z białkami cytoplazmatycznymi, powoduje utratę ich funkcji. Aktywność białek z rodziny p53 jest regulowana na drodze fosforylacji przez kinazy, takie jak c-abl czy kinazy cyklinozależne lub przez acetylację. Wiele białek może wpływać na aktywność p53, p63 i p73. Białka stymulujące apoptozę ASPP1 i ASPP2 (ang. *apoptosis-stimulating proteins of p53*) podnoszą aktywność wszystkich białek z rodziny p53, lecz tylko w transkrypcji genów proapoptotycznych, a nie genów białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. Większość białek regulatorowych ma jednak różny wpływ na aktywność białek zaliczanych do rodziny p53. Przykładowo, MDM2 stymuluje aktywność białka p63, a hamuje aktywność białek p53 i p73. Podobnie czynnik transkrypcyjny CTF2 (ang. *CCAAT-binding transcription factor 2*) wzmacnia aktywność p53, a hamuje aktywność p73.

Zainteresowanie białkiem p53 wzrosło po stwierdzeniu, że w około 50% wszystkich nowotworów ludzkich znaleziono mutacje genów tego białka, a w dalszych 20% białko to było funkcjonalnie nieaktywne. Natomiast mutacje w genach białek p63 i p73 były wyjątkowo rzadkie.

Literatura uzupełniająca

- Aylon Y., Oren M. Living with p53, dying with p53. *Cell* 2007, 130, 597–600.
- Czyż M. Specyficzność i selektywność działania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. *Post. Biochem.* 2005, 51, 60–68.
- Fuster J.J., Sanz-Gonzalez S.M., Moll U.M., Andres V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol. Med.* 2007, 13, 192–199.
- Gruber B.M. Czynniki transkrypcyjne NF- κ B – nowa perspektywa w leczeniu nowotworów. *Post. Biochem.* 2004, 50, 118–130.
- Harris S.L., Levine A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005, 24, 2899–2908.
- Kawai T., Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 2007, 13, 460–469.
- Liu P., Kimmoun E., Legrand A. et al. Activation of NF- κ B, AP-1 and STAT transcription factor is a frequent and early event in human hepatocellular carcinogenesis. *J. Hepatol.* 2002, 37, 63–71.
- Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Re. Immunol.* 2005, 5, 472–484.
- Melino G., Lu X., Gasco M., Cook T., Knight R.A. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem. Sci.* 2003, 28, 663–671.
- Mozer-Lisewska I., Kaczmarek M., Żeromski J. Rola czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w przewlekłych wirusowych zapaleniach wątroby typu B i C. *Post. Biochem.* 2006, 52, 56–61.
- Shu K.-X., Li B., Wu L.-X. The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2007, 55, 10–18.

- Tak P.P., Firestein G.S. NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation diseases. *J. Clin. Invest.* 2000, 107, 7–11.
- Young M.R., Yang H.-S., Colburn N.H. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF- κ B and Pcd4. *Trends Mol. Med.* 2003, 9, 36–41.
- Vassilev L.T. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 2007, 13, 23–31.
- Wietek C., O’Neill L.A.J. Diversity and regulation in the NF- κ B system. *Trends Biochem. Sci.* 2007, 32, 301–309.
- Wilks A.F. The JAK kinases: not just another kinase drug discovery target. *Sem. Cell Dev. Biol.* 2008, 19, 319–328.
- Wu H., Peisley A., Graef I.A., Crabtree G.R. NFAT signaling and the invention of vertebrates. *Trends Cell Biol.* 2007, 251–260.

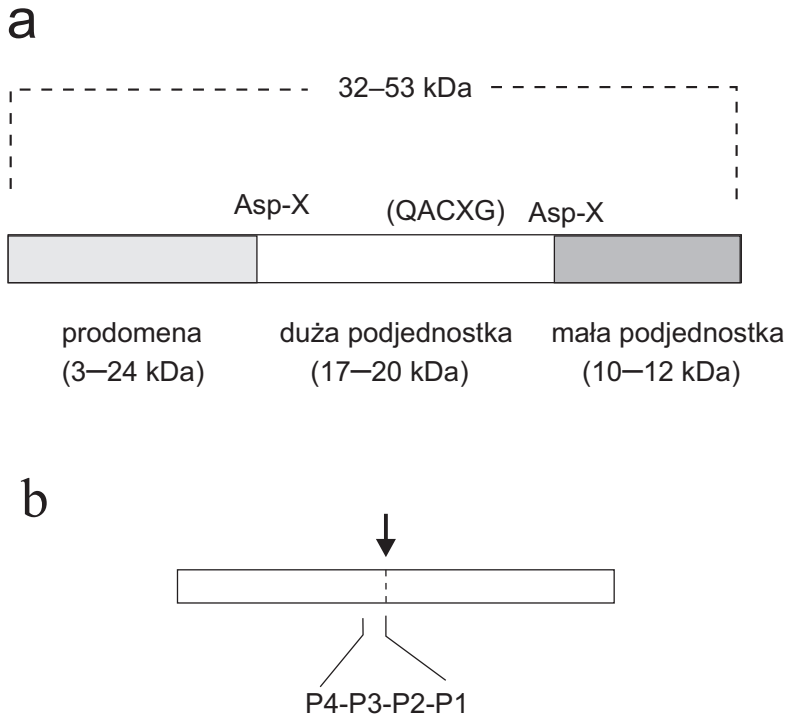
9. Kaspazy, białka Bcl-2 i inhibitory apoptozy

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki stanowi naturalny element życia i rozwoju. O tym, że ma ona miejsce w trakcie rozwoju płodowego, kiedy to z zawiązka dłoni tworzą się palce poprzez eliminację nadmiaru komórek, wiadano już dawno. Jednakże o tym, że każda komórka organizmu jest w stanie popełnić samobójstwo, jeśli tylko otrzyma stosowne ku temu sygnały przekonano się dopiero na początku lat 70. XX wieku. Podczas tego procesu komórki kurczą się, ich jądra ulegają zagęszczeniu, a następnie fragmentacji. Krótko mówiąc, materiał genetyczny zostaje pocięty przez enzymy, a na powierzchni pojawiają się tzw. ciała apoptotyczne (zawierające fragmenty jądra i cytoplazmy), które są usuwane przez makrofagi, bądź komórki sąsiadujące, na drodze fagocytozy. Dzięki temu, że fragmenty komórek pochłaniane są w całości, nie dochodzi do odczynów zapalnych, tak jak to się dzieje w przypadku nekrozy. W regulacji procesu apoptozy uczestniczy wiele białek o aktywności plejotropowej. Wykonawczą fazę tego procesu kontrolują enzymy, określane mianem kaspaz, białka Bcl-2 oraz cząsteczki regulujące ich aktywność.

9.1. Kaspazy

Apoptoza jest procesem enzymatycznym, w którym główną rolę odgrywają proteazy serynowe, tzw. kaspazy. Jedną z prototypowych kaspaz ssaczych jest ICE (ang. *interleukin-1 β converting enzyme*), należąca do enzymów przekształcających interleukinę 1 β . Jest ona odpowiedzialna za proteolityczne dojrzewanie proIL-1 β do jej prozapalnej, aktywnej biologicznie formy. Badania nad programowaną śmiercią komórki w dużej mierze oparte są na niemal kompletnej wiedzy o budowie i rozwoju niewielkiego robaka – *Caenorhabditis elegans*. Jego analiza genetyczna jest stosunkowo łatwa ze względu na to, że szybko się namnaża i ma niewielki genom. Ponadto poznano pochodzenie niemal każdej komórki jego organizmu i jej ostateczne umiejscowienie. Stwierdzono, że produkuje on w przebiegu swego hermafrodytycznego życia 1090 komórek, z czego 131 obumiera na drodze apoptozy. Badania genetyczne wykazały, że apoptoza u *C. elegans* zależy m.in. od białka kodowanego przez gen *ced-3*. Po sklonowaniu i zsekwencjonowaniu tego genu okazało się, że jest on homologiczny z ssaczym genem ICE. Fakt ten stanowił jeden z dowodów na to, iż ICE musi być odpowiedzialny za „ssaczą” ścieżkę programowanej śmierci komórki.

Kaspazy są rodziną proteaz cysteinozależnych swoistych dla asparagianianu (*caspase*, ang. *cysteine-dependent aspartate-specific protease*). W przeciwieństwie do wielu innych proteaz, funkcjonujących głównie jako enzymy degradacyjne, kaspazy są proteazami sygnałowymi, których aktywność jest bardzo dokładnie regulowana. Jak już wspomniano, pierwszą poznaną kaspazą był enzym wyizolowany



Rys. 9.1. Domenowa budowa prokaspaz (a) i swoistość substratowa kaspaz (b)

z *Caenorhabditis elegans* – Ced-3, a pierwszą opisaną kaspazą ssaczą był enzym konwertujący interleukinę 1 β (ICE). Rodzina ssaczych kaspaz liczy przynajmniej 14 członków, z czego 11 (1–10, 14) znaleziono u ludzi, jedną (13) w organizmie wołu, a dwie kaspazy (11 i 12) u myszy. Tylko niektóre z nich uczestniczą w procesie apoptozy. U człowieka są to kaspazy: 2, 3, 6, 7, 8, 9 i 10. Inne, jak kaspazy 1, 4 i 5, aktywują cytokiny prozapalne, a kaspaza 14 uczestniczy w różnicowaniu keratynocytów.

Kaspazy syntetyzowane są jako nieaktywne trzyczęściowe proenzymy, składające się z dwóch podjednostek – dużej i małej oraz z tzw. prodomeny (Rys. 9.1). W formę aktywną proenzym przechodzi poprzez hydrolizę wiązania peptydowego między Asp a następnym, dowolnym aminokwasem (Asp (P_1) – X (P_1')). Obecność Asp w miejscu rozszczepienia, związana z powstawaniem dojrzałej formy enzymu, pozostaje w zgodzie ze zdolnością kaspaz do autoaktywacji i/lub aktywacji przez inne kaspazy, leżących u podstaw wzmocnienia sygnału przekazywanego przez kaskadę kaspaz.

Centrum aktywne kaspaz zawierające Cys i His zlokalizowane jest w dużej podjednostce. Determinanty odpowiedzialne za specyficzność substratową znajdują się wewnątrz małej podjednostki, jednakże do powstania szczeliny wiążącej substrat przyczynia się zarówno mała, jak i duża podjednostka. Większość kaspaz ma długie prodomeny (17–20 kD), lecz niektóre (wykonawcze) kaspazy -3, -6 i -7 mają krótkie prodomeny (około 30 aa).

Tabela 10. Wybrane właściwości rodziny kaspaz ludzkich

Kaspaza	Prodomena	Preferowany substrat (P ₄ – P ₁)	Rola biologiczna	Aktywatory
Kaspaza 1	CARD	(W/Y/F)EHD	prozapalna	Apaf
Kaspaza 2	CARD	(DXXD)EHD	efektorowa	RAIDD
Kaspaza 3	Krótka	(DEXD)EVD	efektorowa	kaspazy 8 i 9
Kaspaza 4	CARD	(W/L/F)EHD	prozapalna	TRAF-2
Kaspaza 5	Długa	(W/L/F)EHD	prozapalna	inflamasom
Kaspaza 6	Krótka	(V/T/I)EHD	efektorowa	kaspazy 3 i 7
Kaspaza 7	Krótka	(DEXD)EVD	efektorowa	kaspazy 8 i 9
Kaspaza 8	DED	(LEXD)ETD	inicjatorowa	FADD
Kaspaza 9	CARD	(L/I/V)EHD	inicjatorowa	Apaf-1/cyt c
Kaspaza 10	DED	LEXD	inicjatorowa	FADD
Kaspaza 14	brak	WEHD	stymulacja różnicowania	?

Natywne kaspazy są heterotetramerami, zbudowanymi z dwóch małych i dwóch dużych podjednostek, np. kaspaza 1 składa się z kompleksu [p20: p10]₂, a kaspaza 3 z podjednostek [p17: p12]₂. Pomimo obecności w natywnej cząsteczce dwóch miejsc wiążących substrat ich kooperacji w aktywacji enzymatycznej nie udowodniono. Kaspazy rozpoznają krótkie tetrapeptydowe (P₄–P₁) sekwencje wewnątrz docelowych polipeptydów, licząc od N-końca hydrolizowanego peptydu. Wszystkie substraty w miejscu P₁ zawierają kwas asparaginowy (D), w P₂ najczęściej występuje histydyna (H), a w P₃ kwas glutaminowy (E). Aminokwasy znajdujące się w pozycji P₄ stanowią jeden z wyróżników będących podstawą klasyfikacji tych proteaz. Inną cechą kryterium klasyfikacyjnego jest charakter prodomeny oraz aktywność biologiczna kaspaz (Tabela 10). Pierwsza klasa to kaspazy (1, 4, 5) o aktywności prozapalnej, w których w pozycji P₃ występują aminokwasy hydrofobowe, takie jak tyrozyna lub tryptofan. Druga klasa kaspaz (2, 3, 6, 7) ma w miejscu P₄ kwas asparaginowy i wykazuje aktywność efektorową. Wiele białek hydrolizowanych w procesie apoptozy posiada sekwencję DEXD lub DXXD. W trzeciej klasie tych proteaz (kaspazy inicjatorowe 8, 9, 10) najczęściej w pozycji P₄ występują aminokwasy alifatyczne o rozgałęzionych łańcuchach. Reszty takie znaleziono w miejscach odpowiedzialnych za aktywację proenzymów zaliczanych do drugiej klasy kaspaz, co tłumaczy ich usytuowanie w kaskadzie enzymatycznej. Znane są różne drogi sygnalizacyjne prowadzące do aktywacji kaspaz. Pierwsza z możliwości to aktywacja zależna od receptorów cytotoxyczności komórkowej. Pośredniczą w niej białka adaptorowe, takie jak FADD czy TRADD. Aktywacja kaspaz może zachodzić także na drodze zależnej od cytochromu c,

po jego uwolnieniu z mitochondrium w odpowiedzi na stres. Kolejną możliwością jest transaktywacja II klasy kaspaz przez kaspazy klasy III lub przez granzym B. Ostatnią możliwością jest aktywacja autokatalityczna. Ta ostatnia możliwość wynika z faktu, że nie wszystkie kaspazy są syntetyzowane w formie całkowicie nieaktywnych zymogenów, przynajmniej niektóre z nich (np. prokaspaza 9) wykazują pewną aktywność proteolityczną. Wprowadzono nawet specjalne określenie „zymogeniczność”, zdefiniowane jako stosunek aktywności dojrzałego enzymu do jego zymogenu.

Znamy obecnie kilkadziesiąt różnych substratów kaspaz. Przykładami są m.in.: białka strukturalne (lamininy, fodryny, aktyna), białka niezbędne do utrzymania homeostatycznej integralności genomu; PARP (polimeraza poli-ADPryboza), DNA-PK (zależna od DNA kinaza białkowa), białka antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-X_L) i proapoptotyczne (Bax, Bad, Bid) czy białka pośredniczące w przekazie sygnałów mitogennych i przeżyciowych; białko retinoblastomy (Rb), inhibitor kinaz cyklicznych p21^{Cip1/Waf1}, fosfolipaza A2 (PLA₂), kinaza białkowa C (PKC), kinazy MAP (Raf-1, MEKK-1), kinazy tyrozynowe (FAK), czynniki transkrypcyjne (STAT1, NF-κB), białka aktywujące GTP-azy (RasGAP) i inne. Prace opublikowane w roku 2008 sugerują, że w rzeczywistości istnieją setki substratów kaspaz, a z wielu z nich powstają peptydy o potencjalnej funkcji regulacyjnej. Jest oczywiste, że wynikiem działania kaspaz są zróżnicowane skutki biologiczne, takie jak: degradacja cytoszkieletu, zaburzenia procesów naprawy DNA, zmiana czy wręcz odwrócenie funkcji białek regulatorowych, których kulminacją jest śmierć komórki. Należy także wspomnieć, że badania na *C. elegans*, *Drosophila* i myszach sugerują udział kaspaz w regulacji odpowiedzi immunologicznej.

Na zakończenie należy zaznaczyć, że oprócz kaspaz inna, dość liczna rodzina proteaz serynowych może inicjować wykonawczą fazę apoptozy. Enzymy te nazywane granzymami występują w granulocytach, stąd ich nazwa (ang. *granule associated enzymes*). U gryzoni i ludzi zidentyfikowano co najmniej 10 różnych granzymów kodowanych przez różne geny. Wszystkie te proteazy serynowe mają identyczną sekwencję aminokwasów w pozycji 9–16 oraz centrum aktywne warunkowane obecnością histydyny, kwasu asparaginowego i seryny, a także obecnością N-końcowej izoleucyny.

Aktywność biologiczna i poziom fizjologiczny kaspaz mogą być regulowane w różny sposób: na poziomie transkrypcji poprzez modyfikacje potranslacyjne, przez degradację ubikwitynozależną, a także przez inhibicję lub aktywację ich aktywności enzymatycznej.

9.2. Inhibitory apoptozy

IAPs (ang. *inhibitor of apoptosis proteins*) są konserwatywną ewolucyjnie grupą białek, które uczestniczą w regulacji procesu apoptozy zarówno u kręgowców, jak i u bezkręgowców. Pierwsze takie białko zostało odkryte w 1993 roku w organizmie *baculowirusa*. Wspólną cechą struktury wszystkich białek zaliczanych do IAPs jest obecność od jednej do trzech charakterystycznych domen BIR (ang. *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat*), wiążących jony cynku, występujących w prototypowym

IAP *bakulowirusa*. Domeny te umożliwiają inhibitorom wiązanie do kaspaz i hamowanie ich aktywności. Oddziaływanie pomiędzy zbudowanymi z około 70–80 reszt aminokwasowych domenami BIR a kaspazami jest regulowane „in minus” przez inne białka, które zawierają motyw wiążący IAPs (IBM, ang. *IAP-binding motif*), takie jak ssacze białko Smac/DIABLO (ang. *secondo mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI*) i jego charakterystyczny motyw -A-V-P-I-A-Q-K-S-E-P-. Motyw IBM tego białka konkuruje z kaspazami o wiązanie z domeną BIR inhibitorów, powodując w konsekwencji wzrost aktywności kaspaz. Białka IAPs (oprócz surwiwiny) zawierają także domenę RING (ang. *really interesting new gene*), mającą aktywność ligazy ubikwityny E3, odpowiedzialną za wiązanie białek (kaspaz, białek zawierających IBM i samych IAPs) do IAPs i/lub domenę CARD. Ostatnio wykazano, że IAPs są nie tylko inhibitorami apoptozy, lecz także niektóre z nich pełnią istotną rolę w inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Do ssaczych białek IAPs zalicza się osiem białek, a wśród nich: IAP1, IAP2, XIAP i surwiwinę.

IAP1, IAP2 i XIAP zawierają trzy domeny BIR, z których każda posiada odmienną specyficzność substratową. BIR2 wiąże się swoiście i hamuje aktywność kaspazy 3 i kaspazy 7. BIR3 hamuje aktywności kaspazy 9. Swoistość BIR1 jest do dziś dyskusyjna. Wymienione inhibitory nie hamują innych kaspaz, takich jak kaspazy 6 i 8.

Surwiwina została opisana po raz pierwszy w 1997 roku przez G. Ambrosiniego i wsp. Surwiwina stała się obiektem intensywnych badań nie tylko ze względu na jej właściwości antyapoptotyczne, lecz także, a może przede wszystkim, ze względu na jej udział w regulacji cyklu komórkowego. Stwierdzenie hiperekspresji tego białka w różnych typach nowotworów dodatkowo wpłynęło na zainteresowanie surwiwiną.

W strukturze surwiwiny wyróżnia się zazwyczaj dwie domeny odpowiedzialne za dimeryzację tego białka, domenę BIR oraz domenę wiążącą mikrotubule, a także miejsca wiązania białek uczestniczących w procesach wzrostu i programowanej śmierci komórki (kinaza cdk1, białko Aurora B, białko Smac/DIABLO). W odróżnieniu od większości białek IAP surwiwina zawiera jedną, a nie dwie lub trzy domeny BIR, a także nie zawiera domeny CARD, odpowiedzialnej za wiązanie z kaspazami. Oba rodzaje domen są związane z antyapoptotycznymi właściwościami białek IAP. Nie ma jednak zgody co do antyapoptotycznego mechanizmu działania tego białka, podobnie jak nie ustalono roli biologicznej procesu dimeryzacji cząsteczek tego białka. Również poziom fizjologiczny surwiwiny różni się od białek IAP. W komórkach niedzielałych się nie stwierdzono ekspresji genu surwiwiny, natomiast wykazano znaczne podwyższenie jej poziomu w komórkach o zwiększonej aktywności proliferacyjnej, m.in. w komórkach nowotworowych. Te obserwacje oraz ekspresja jej genu w fazie G2/M (40-krotnie wyższa niż w fazie G1) doprowadziły do wykazania istotnej roli surwiwiny w przebiegu cyklu komórkowego, co jest jeszcze jedną cechą wyróżniającą ją wśród przedstawicieli rodziny IAP. Żadne inne białko z rodziny IAP nie uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego. Rolę surwiwiny w regulacji cyklu komórkowego wiąże się przede wszystkim z jej udziałem w tworzeniu kompleksu wędrującego po chromosomach CPC (ang. *chromosomal passenger complex*). Kompleks ten odgrywa zasadniczą rolę w segregacji chromatyd siostrzanych i w cytokinizie (rozdział 5.1.3).

Surwiwina uznawana jest przez niektórych autorów za marker komórek embryonalnych i nowotworowych, w komórkach terminalnie zróżnicowanych bowiem nie stwierdza się jej obecności, a w dzielących się komórkach somatycznych organizmów dorosłych jej poziom jest bardzo niski. Podwyższony poziom surwiwiny stwierdzono m.in. w komórkach nowotworów komórek krwi oraz w nowotworach płuc, wątroby, trzustki, żołądka, prostaty, piersi, jajników i innych. Dlatego niezwykle ważne jest wyjaśnienie mechanizmów kontrolujących komórkowy poziom tego białka. Poziom surwiwiny, jak wielu innych białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego, zależy zarówno od kontroli ekspresji jej genu (czynniki transkrypcyjne Sp1, E2F, białko p53), jak i od stabilności (białka Hsp90) oraz ubiquitynozależnej jej degradacji.

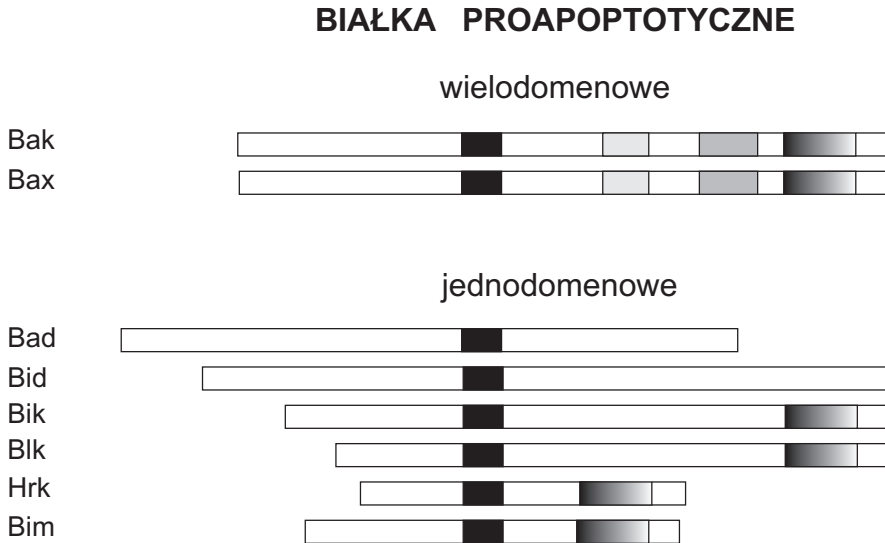
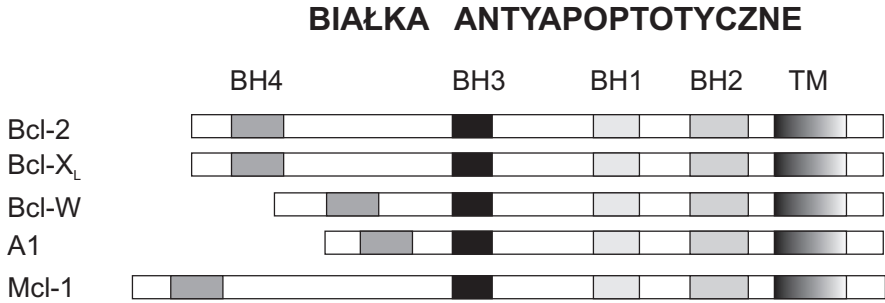
9.3. Białka Bcl-2

Białko Bcl-2 (ang. *B cell CLL/Lymphoma-2*) zostało opisane po raz pierwszy w 1984 roku, a nazwa odzwierciedla fakt, że jego nadekspresja może prowadzić do rozwoju białaczki komórek B. W kolejnych latach odkrywano coraz więcej białek strukturalnie podobnych do Bcl-2. Wszystkie te białka zaangażowane są w regulację procesu apoptozy, chociaż w różny sposób. Dlatego zazwyczaj dzieli się tę rodzinę na białka antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, A1), białka proapoptotyczne: wielodomenowe (Bak, Bax) i jednodomenowe (Bim, Bad, Bid, Blk, Bik, Hrk). Domenową budowę niektórych białek Bcl-2 przedstawia rysunek 9.2.

Białka antyapoptotyczne zawierają cztery domeny BH (ang. *Bcl-2 homology*) i związane są zazwyczaj z zewnętrzną błoną mitochondrialną. Ich działanie polega na wiązaniu i blokowaniu aktywności proapoptotycznych białek Bcl-2. Te ostatnie są dzielone na białka efektorowe: Bak i Bax, które zawierają domeny BH 1–3 i premeabilizują zewnętrzną błonę mitochondrialną przez tworzenie białkowo-lipidowych porów, umożliwiających wypływ białek z przestrzeni międzybłonowej, i białka zawierające tylko jedną domenę (BH3): Bad, Bid, Bik, Bim, HRK, Blk. Tylko Bid i Bim są bezpośrednimi aktywatorami białek efektorowych (Rys. 9.3). Pozostałe białka jednodomenowe nazywane są derepresorami (lub uczulaczami), ze względu na ich zdolność do podnoszenia wrażliwości białek efektorowych na działanie Bid i Bim. Złożona sygnalizacja z udziałem białek Bcl-2 jest odpowiedzialna za zmiany przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej.

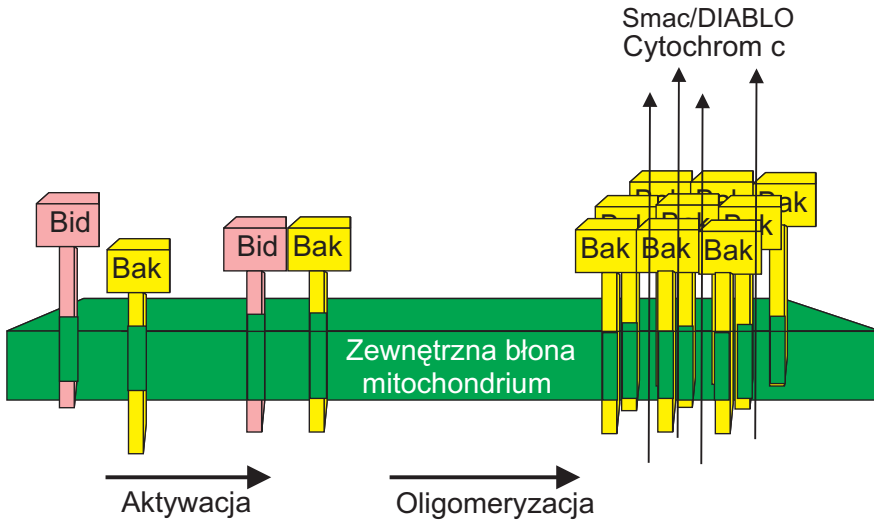
Wszystkie te białka odgrywają istotną rolę w regulacji procesu apoptozy. Białka proapoptotyczne uczestniczą w stymulacji procesu apoptozy indukowanej stresem, poprzez aktywację szlaku mitochondrialnego. Funkcjonowanie tego szlaku zależy od rodziny białek Bcl-2, a interakcja poszczególnych jej członków umożliwia uwalnianie czynników proapoptotycznych, m.in. cytochromu c i białka Smac/DIABLO z przestrzeni międzybłonowej. Czynniki te oddziałują z cytozolowym białkiem APAF-1 (ang. *apoptotic protease activating factor-1*), tworząc kompleks zwany apoptosomem. W wyniku powstania tego kompleksu następuje aktywacja inicjatorowej kaspazy 9 i dalszych etapów apoptozy.

Białka antyapoptotyczne są inhibitorami wielodomenowych białek proapoptotycznych, a jednodomenowe białka proapoptotyczne mogą aktywować białka



Rys. 9.2. Domenowa budowa wybranych białek z rodziny Bcl-2. BH – domena homologiczna (występująca w wielu białkach Bcl-2), TM – domena transbłonowa

wielodomenowe lub obniżać aktywność białek antyapoptotycznych. Obserwacje apoptotycznych mitochondriów i różnice w interpretacji zmian morfologicznych powodują, że nie ma dotychczas jednoznacznego wytłumaczenia mechanizmu tych zmian. Istnieje kilka hipotez tworzenia kanałów w błonie mitochondrium. Najstarsza zakłada istnienie tzw. megakanału, zbudowanego z wielu białek tworzących kanał anionowy regulowany potencjałem (w błonie zewnętrznej) oraz translokazy nukleotydów adeninowych (w błonie wewnętrznej). W skład podjednostki regulatorowej megakanału wchodzi także białko Bax. Otwarcie kanału powoduje napływ wody i soli do mitochondriów, ich pęcznienie i rozerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz wypływ białek do cytoplazmy komórki. Najnowsza hipoteza zakłada, że kanał jest tworzony przez homo- lub heterooligomery białek Bax i/lub Bak oraz lipidy błonowe. Wymaga to aktywacji efektorowych białek Bcl-2 przez białka jednodomenowe (Rys. 9.3).



Rys. 9.3. Tworzenie kanałów w zewnętrznej błonie mitochondriów przez oligomery białek Bak

Błona mitochondrialna nie jest jedyną lokalizacją komórkową białek Bcl-2. Co-raz więcej danych wskazuje, że wszystkie trzy klasy tych białek występują także w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER). Przypuszcza się, że w kompleksach multiproteinowych biorą udział w różnych procesach komórkowych, głównie w homeostazie jonów wapnia, fałdowaniu białek i morfogenezie ER.

Literatura uzupełniająca

- Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007, 26, 1324–1337.
- Adams J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003, 17, 2481–2495.
- Chipuk J.E., Green D.R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization. *Trends Cell Biol.* 2008, 18, 157–164.
- Danial N.N., Korsmeyer S.J. Cell heath: critical control points. *Cell* 2004, 116, 205–219.
- Graf D., Bode J.G., Haussinger D. Caspases and receptor cleavage. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 462, 162–170.
- Hetz C., Glimcher L. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol.* 2008, 18, 38–44.
- Giann-Hong Leu J.H., Yu-Chen Kuo Y.C., Guang-Hsiung Kou G.H., Chu-Fang Lo C.F. Molecular cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Devel. Comp. Immunol.* 2008, 32, 121–133.
- Johnson C.E., Kornbluth S. Caspase cleavage is not for everyone. *Cell* 2008, 134, 720–721.
- Kuranaga E., Miura M. Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol.* 2007, 17, 135–144.
- Kuwana T., Newmeyer D.D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003, 15, 691–699.

- Li F. Survivin study; what is the next wale? *J. Cell Physiol.* 2003, 197, 8–29.
- Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 2002, 9, 459–470.
- Shiozaki E.N., Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem. Sci.* 2004, 29, 486–494.
- Turk B., Stoka V. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett.* 2007, 581, 2761–2767.
- Wang Z.-B., Liu Y.-Q., Cui Y.-F. Pathways to caspase activation, *Cell Biol. Internat.* 2005, 29, 489–496.
- Wheatley S.P., McNeish A. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 2005, 247, 35–88.
- Wolanin K., Piwocka K. Rola i znaczenie surwiwiny w przebiegu mitozy. *Post. Biochem.* 2007, 53, 10–18.

Część II

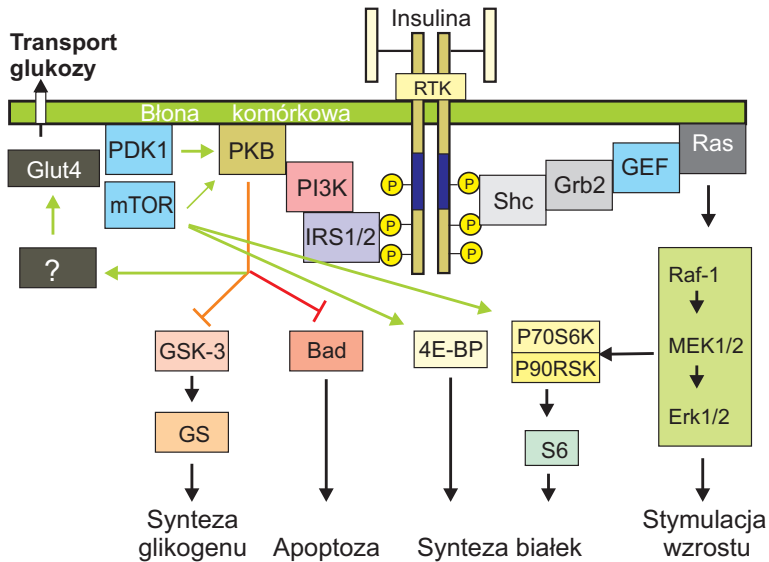
Sygnały życia i sygnały śmierci

Chociaż nie można dzisiaj wyjaśnić precyzyjnie molekularnych podstaw regulacji inicjowanej hormonalnie, wiele jeszcze niedawno nieznanych etapów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej zostało opisanych. Każdy rok przynosi nowe informacje na ten temat, a liczba ich mówi o tym, że dla zainteresowanych niespecjalistów ogrom informacji staje się nieczytelny. Dlatego w niniejszym opracowaniu wybrano tylko niektóre przykłady, istotne z punktu widzenia zrozumienia zasad przekazu informacji, przenoszonej przez ligandy zewnątrzkomórkowe. Zastrzeżeniem, które musi być uwzględnione przy interpretacji przedstawionych poniżej informacji, jest fakt, że obejmują one jedynie wybrany fragment sygnalizacji komórkowej i nie uwzględniają złożoności i synchronizacji odpowiedzi komórkowej na działanie wielu ligandów zewnątrzkomórkowych.

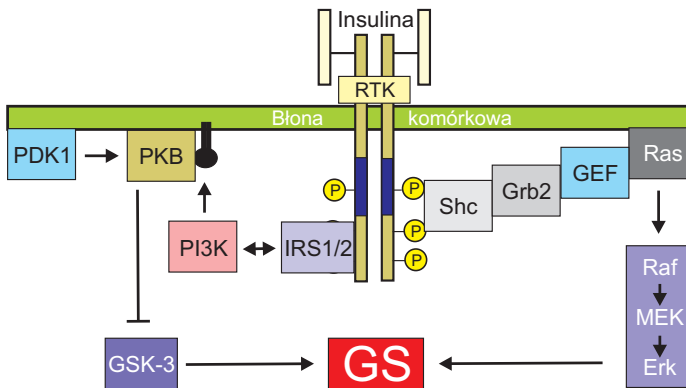
1. Hormonalna regulacja syntezy i rozkładu glikogenu

Jedną z możliwości regulacji poziomu glukozy we krwi zwierząt i ludzi jest regulowana hormonalnie synteza i fosforoliza glikogenu. Synteza glikogenu jest stymulowana insuliną, natomiast fosforoliza w zależności od rodzaju tkanki może być stymulowana glukagonem (komórki wątroby) lub adrenaliną (komórki mięśni). Niezależnie od rodzaju hormonu stymulującego rozkład glikogenu przyjmuje się, że mechanizm przekazania sygnału przez te dwa hormony jest podobny. W stymulowanej insuliną aktywacji syntezy glikogenu uczestniczą przynajmniej dwie drogi sygnałowe, jedna związana z dezaktywacją kinazy syntazy glikogenu (GSK-3) i druga angażująca kaskadę kinaz MAP (rozdział 5.1.2 w cz. I).

Chociaż praktycznie wszystkie tkanki ssaków zawierają receptory insuliny, skutki jej działania są bardzo zróżnicowane, a poszczególne tkanki mogą odpowiadać na działanie insuliny w różny sposób. Przykładowo, odpowiedzią wątroby na działanie insuliny jest synteza glikogenu, natomiast w tkance tłuszczowej stymulowana jest głównie synteza tłuszczu. Może to wynikać m.in. z faktu, że różne komórki zawierają różne ilości dwóch izoform receptora insuliny (InsR), różniących się obecnością lub nieobecnością 12 reszt aminokwasowych w części C-końcowej podjednostki α . InsR-A (bez przepisania eksonu 11) posiada względnie niskie powinowactwo do insuliny, w przeciwieństwie do InsR-B (plus ekson 11) o dwukrotnie wyższym powinowactwie do tego hormonu. InsR-A jest jedyną izoformą receptora insuliny występującą w leukocytach. InsR-B znajduje się w dużych ilościach (ponad 100 000 receptorów na komórkę) w komórkach silnie odpowiadających na działanie insuliny (wątroba, mięśnie szkieletowe, adipocyty) i w śladowych ilościach (poniżej 50 receptorów na komórkę) w erytrocytach.



Rys. 1.1. Wielokierunkowy sygnał wewnątrzkomórkowy inicjowany stymulacją receptora insuliny. RTK – receptor insuliny o aktywności kinazy tyrozynowej, Glut4 – transporter glukozy (4), PDK1 – kinaza zależna od fosfatydyloinozytoli (1), PKB – kinaza białkowa B (Akt), GSK-3 – kinaza syntazy glikogenu 3, PI3K – kinaza 3-fosfoinozytydów, IRS – substrat receptora insuliny, Shc, Grb2 – białka adaptorowe, GEF – czynnik stymulujący wymianę nukleotydów guaninowych, Ras – małe białko G, Raf-1, MEK, Erk – kaskada kinaz MAP, GS – syntaza glikogenu, P70S6K – kinaza białka S6, P90RSK – kinaza białka p90, mTOR – ssące białko TOR, Bad – białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2, 4E-BP – białko wiążące czynnik elongacyjny 4E, S6 – białko rybosomowe S6



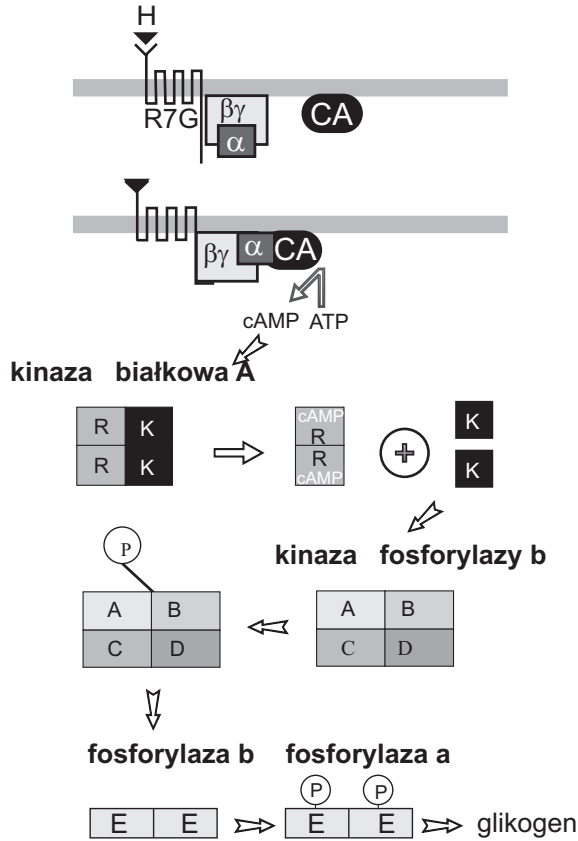
Rys. 1.2. Drogi sygnałowe zaangażowane w regulację metabolizmu glikogenu. RTK – receptor insuliny o aktywności kinazy tyrozynowej, PDK1 – kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytoli, PKB – kinaza białkowa B (Akt), GSK-3 – kinaza syntazy glikogenu 3, PI3K – kinaza 3-fosfoinozytydów, IRS – substrat receptora insuliny, Shc, Grb2 – białka adaptorowe, GEF – czynnik stymulujący wymianę nukleotydów guaninowych, Ras – małe białko G, Raf, MEK, Erk – kaskada kinaz MAP (Erk), GS – syntaza glikogenu

Molekularne mechanizmy sygnalizacji wewnątrzkomórkowej indukowanej insuliną nie są do końca poznane. W przypadku niektórych rodzajów odpowiedzi komórkowej niezbędna jest internalizacja kompleksów hormon–receptor, w innych nie. Także wewnątrzkomórkowe drogi przekazania sygnału mogą się zdecydowanie różnić. Plejotropowy sygnał indukowany przyłączeniem insuliny do jej receptora o aktywności kinazy tyrozynowej dotyczy wielu efektów biologicznych, m.in. regulacji metabolizmu glukozy, syntezy białek, stymulacji wzrostu i różnicowania oraz apoptozy (Rys. 1.1). Efekt końcowy zależy przede wszystkim od rodzaju komórek, izoform receptora i ich wzajemnych proporcji oraz współdziałania z innymi szlakami przekazywania sygnału.

W komórkach mięśni szkieletowych dominującym skutkiem działania insuliny jest regulacja wychwytu glukozy i stymulacja syntezy glikogenu. Enzymem limitującym syntezę glikogenu jest syntaza glikogenu (GS), której aktywność jest stymulowana wewnątrzkomórkowo poziomem glukozy-6-fosforanu (aktywator allosteryczny) oraz przez hormonalnie regulowaną defosforylację tego białka.

Molekularny przekaz sygnału prowadzący do aktywacji GS przez insulinę rozpoczyna związanie hormonu z podjednostkami α receptora insuliny, czego wynikiem jest autofosforylacja reszt tyrozynowych w części wewnątrzkomórkowej podjednostek β . Ponieważ receptor ma strukturę tetrameryczną ($2\alpha + 2\beta$), nie jest konieczna jego dimeryzacja dla krzyżowej fosforylacji części wewnątrzkomórkowej, a jedynie zmiana jego konformacji. Do receptora przyłączają się białka adaptorowe IRS1/2 i Shc (rozdział 3.2 w cz. I), które ulegają fosforylacji na określonych resztach tyrozyny, tworząc w ten sposób nowe miejsca zakotwiczenia innych białek sygnałowych. Białka IRS aktywują kinazę 3-fosfoinozytydów (PI3K), a białka Shc uruchamiają następne białko adaptorowe Grb2. To białko z kolei aktywuje białka Ras poprzez stymulację czynnika wymiany nukleotydów (GEF). PI3K i Ras inicjują dwie drogi sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (dwie kaskady enzymatyczne), jedną prowadzącą do stymulacji syntazy glikogenu i transportu glukozy oraz drugą odpowiedzialną za stymulację syntezy DNA/RNA/białka i za aktywację fosfatazy białkowej PP1 (przynajmniej *in vitro*). Aczkolwiek nie potwierdzono, aby ten ostatni skutek rzeczywiście był obserwowany *in vivo*.

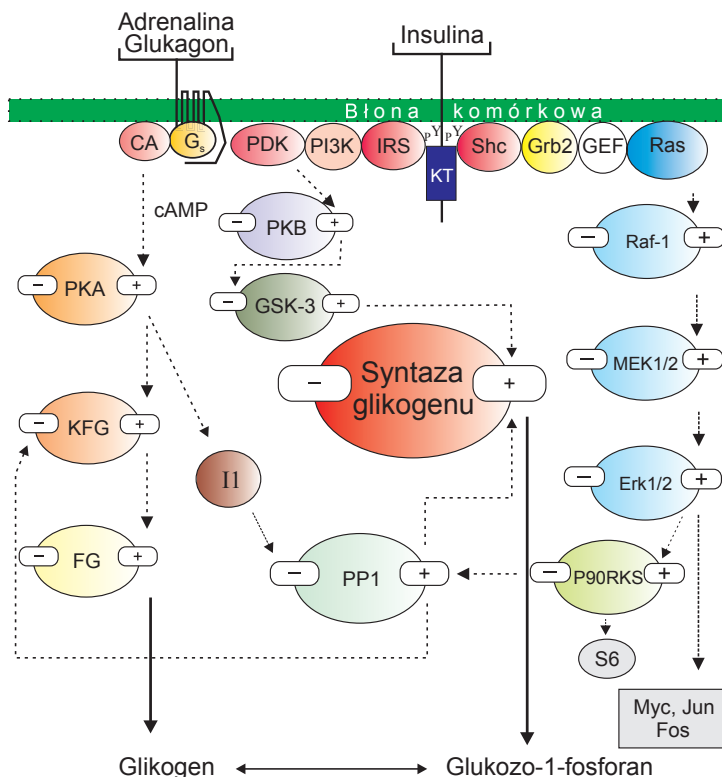
Produkty działania PI3K (rozdział 6.3.1) umożliwiają translokację kinazy białkowej B (PKB/Akt) do błony komórkowej, gdzie enzym ten jest aktywowany (fosforylowany) przez kinazę zależną od fosfoinozytydów (PDK1) i kompleks TORC2 (opisane w rozdziale 5). Substratem PKB jest m.in. kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK-3), enzym odpowiedzialny za fosforylację (dezaktywację) syntazy glikogenu. Kinaza GSK-3 jest konstytutywnie aktywną kinazą serynowo-treoninową, ciągle fosforylującą syntazę glikogenową (GS). Stymulowana PKB fosforylacja GSK-3 hamuje aktywność tej kinazy, co w rezultacie prowadzi do spadku fosforylacji i aktywacji GS oraz stymulacji syntezy glikogenu. Mechanizmy regulujące aktywność kinazy serynowo-treoninowej PP1 są mniej klarowne. PP-1 jest występującą powszechnie fosfatazą serynowo-treoninową, mogącą zawierać różne podjednostki regulatorowe (rozdział 6.1). Izoforny PP1 występujące w wątrobie i w mięśniach szkieletowych zawierają tkankowo swoiste podjednostki regulatorowe (odpowiednio G_L i G_M), odpowiedzialne za regulację metabolizmu glikogenu. Przyjmuje się, że kluczową rolę w tym procesie



Rys. 1.3. Stymulowana glukagonem lub adrenaliną fosforoliza glikogenu. R7G – receptor zasocjowany z białkami G, α , β , γ – podjednostki trimerycznych białek G, CA – cyklaza adenylnowa, R – podjednostka regulatorowa PKA, K – podjednostka katalityczna PKA, A, B – podjednostki inhibitorowe kinazy fosforylasy glikogenu (KFG), C – podjednostka katalityczna KFG, D – kalmoldulina, E – monomeryczne podjednostki fosforylasy glikogenu (FG), (P) – reszta fosforanowa

odgrywa stymulowana kinazą P90RSK (znany substrat kinaz MAP) aktywacja PP1 oraz stymulowana adrenaliną (lub glukagonem) inhibicja PP1. Skutek biologiczny jest zależny od rodzaju komórek. W doświadczeniach *in vivo* wykazano, że dożylnie podanie insuliny aktywuje kinazy p38 oraz JNK/SAPK w komórkach mięśni szkieletowych i stymulacja ta jest skorelowana z aktywacją syntazy glikogenu.

Należy wyraźnie zaznaczyć, że aktywacja drogi PI3K \rightarrow PDK1/TORC2 \rightarrow PKB może być odpowiedzialna także za wiele innych skutków anabolicznych insuliny, m.in. za stymulację procesu translacji (Rys. 1.1). Wiadomo bowiem, że kinaza białkowa B aktywuje kinazy mTOR, których substratami są: białko wiążące eukariotyczny czynnik inicjujący 4 (4E-BP) i kinazy rybosomowe S6 (P70S6K). Natomiast aktywacja kinaz Erk może być odpowiedzialna przede wszystkim za efekty mitogenne insuliny.



Rys. 1.4. Hormonalna regulacja metabolizmu glikogenu. CA – cyklaza adenylnowa, Gs – białko Gs, PDK – kinaza zależna od fosfatydyloinozytoli, PI3K – kinaza 3-fosfoinozytydów, IRS, Shc i Grb2 – białka adaptorowe, GEF – czynnik stymulujący wymianę nukleotydów guaninowych, PKB – kinaza białkowa B, PKA – kinaza białkowa A, GSK-3 – kinaza syntazy glikogenu 3, KFG – kinaza fosforylazy glikogenu, FG – fosforylaza glikogenu, Raf-1, MEK, Erk – kaskada kinaz MAP, PP1 – fosfataza białkowa 1, P90RKS – kinaza białka rybosomowego S6, I1 – inhibitor PP1, S6 – białko S6, Jun, Fos, Myc – czynniki transkrypcyjne

Przekaz sygnału insulinowego regulującego metabolizm wewnątrzkomórkowy może być modulowany na wielu etapach. Istotną rolę w tym procesie odgrywa inhibicja aktywności białek adaptorowych, odbierających sygnał od receptora. W przypadku białek IRS taka dezaktywacja może być wynikiem działania swoistych fosfatyz tyrozynowych, kinaz serynowo-treoninowych lub z ich degradacji ubikwitynozależnej.

Hormonalna stymulacja fosforylazy glikogenu jest podobnie jak jego synteza regulowana kilkustopniowo (Rys. 1.3). Związanie adrenaliny (glukagonu) z receptorem typu R7G powoduje aktywację białek Gs (rozdział 4.1 w cz. I) i stymulację cyklazy adenylnowej (rozdział 4.3 w cz. I). Wynikiem tego jest aktywacja kinazy białkowej A (PKA), której mechanizm został opisany w rozdziale 5.1.1 w cz. I. Substratem PKA są m.in. kinaza fosforylazy glikogenu (KFG) i inhibitor PP1 (I1). KFG jest heterooligomerem złożonym z czterech różnych podjednostek: inhibitorowych

(A i B), katalitycznej (C) i regulacyjnej (D), którą jest kalmodulina. Natywna KFG jest zbudowana z 16 podjednostek białkowych (4A, 4B, 4C i 4D). PKA fosforyluje podjednostki inhibitorowe KFG, co prowadzi do aktywacji podjednostki katalitycznej i fosforylacji fosforylasy glikogenowej (FG). FG jest enzymem zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek białkowych (92 kDa każda). Forma nieaktywna (FGb) przekształca się w aktywną (FGa) po fosforylacji jednej reszty seryny w obu podjednostkach. Wynikiem działania FGa jest fosforoliza glikogenu do glukozy-1-fosforanu, który ulega izomeryzacji do glukozy-6-fosforanu, allosterycznego aktywatora syntazy glikogenu. Aktywowany działaniem PKA inhibitor PP1 zapobiega z kolei stymulacji syntazy glikogenu, kierując metabolizm na drogę syntezy glukozy-1-fosforanu (Rys. 1.4).

Obie drogi sygnałowe kontrolujące metabolizm glikogenu regulują wzajemnie przekaz sygnału na różnych poziomach. Między innymi aktywacja fosfatazy PP1 z jednej strony stymuluje aktywność syntazy glikogenu, a z drugiej hamuje aktywność kinazy fosforylasy glikogenu, przechylając równowagę w stronę syntezy glikogenu.

Literatura uzupełniająca

- Baserga R. The insulin receptor substrate-1: A biomarker for cancer? *Exp. Cell Res.* 2009, 315, 727–732.
- Combettes-Souverain M., Issad T. Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metabol.* 1998, 24, 477–489.
- DeBosch B.J., Muslin A.J. Insulin signaling pathways and cardiac growth. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2008, 44, 855–864.
- DuPont J., Tesseraud S., Simon J. Insulin signaling in chicken liver and muscle. *General Comp. Endocrinol.* 2009, 163, 52–57.
- Gual P., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J.-F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 2005, 87, 99–109.
- Luchart S., Riehle M.A. The insulin signaling cascade from nematodes to mammals: insights into innate immunity of *Anopheles* mosquitoes to malaria parasite infection. *Dev. Comp. Immunol.* 2007, 31, 647–656.
- Sampson S.R., Cooper D.R. Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulator of insulin signaling. *Mol. Gen. Metab.* 2006, 89, 32–47.
- Thirone A.C.P., Huang C., Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol. Metab.* 2006, 17, 72–78.
- Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol.* 2001, 11, 437–441.

2. Sygnalizacja mitogenna

Wzrost jest procesem charakterystycznym dla wszystkich organizmów żywych. Jakkolwiek cechuje przede wszystkim wczesne etapy rozwoju, pozostaje niekiedy także właściwością niektórych tkanek organizmów dorosłych (zdolność do regeneracji, stałe zastępowanie komórek obumarłych). Proliferacja komórek konieczna do uzyskania liczby wystarczającej do ukształtowania dorosłych tkanek jest także często drogą prowadzącą do ich ostatecznego zróżnicowania. Regulacja procesów wzrostu i różnicowania *in vivo* jest zagadnieniem bardzo skomplikowanym i słabo dotychczas poznanym. Kontrola tych procesów jest sumą różnych oddziaływań, z których najistotniejsze są: bezpośrednie oddziaływania między komórkami homo- i heterologicznymi oraz regulacja poprzez związki pośredniczące w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych (peptydy, sterydy, prostaglandyny). W celu ułatwienia badań złożonych mechanizmów regulacyjnych konieczne było uproszczenie modelu doświadczalnego. Modelem takim stały się hodowle komórkowe (tkankowe) prowadzone w ściśle określonych (zdefiniowanych) warunkach, zazwyczaj na ustalonych liniach komórkowych. Większość obecnie znanych dróg sygnalizacji mitogennej pochodzi właśnie z badań *in vitro*.

Ilościowe określenie tempa wzrostu jest ważnym i rutynowo sprawdzanym parametrem hodowli komórkowych, niezwykle istotnym w badaniach aktywności wielu związków, m.in. czynników: wzrostowych, cytostatycznych, cytotoksycznych, odżywczych i cytokin. Tkanki mogą rosnąć poprzez wzrost liczby komórek, co określa się jako wzrost hipertroficzny lub proliferację albo przez powiększanie wymiarów komórek, określane mianem wzrostu hiperplastycznego.

Pośród związków zaangażowanych w regulację wzrostu i różnicowania komórek szczególną rolę przypisuje się związkom o budowie peptydowej nazywanym czynnikami wzrostowymi (rozdział 1.4 w cz. I). Odkrycie czynników wzrostowych związane jest ściśle z doświadczeniami prowadzonymi przez Ritę Levi-Montalcini i Cohena w połowie lat 50. XX wieku na Uniwersytecie Washingtona. Naukowcy ci próbowali określić chemiczny charakter czynnika obecnego w ekstraktach mysiego mięsaka 180, wykazującego aktywność stymulacji wzrostu neuronów i nazwanego później czynnikiem wzrostu nerwu (NGF ang. *nerve growth factor*). Od momentu odkrycia pierwszego peptydowego czynnika wzrostowego do chwili obecnej wyizolowano i przynajmniej częściowo scharakteryzowano kilkadziesiąt innych. Obecnie znamy już sekwencję około 100 różnych peptydów plejotropowych (peptydów o aktywności wielokierunkowej), a wśród nich rodziny czynników o podobnej budowie chemicznej (EGF-, PDGF-, HGF-, FGF-, VEGF-, neurotrofin i insulino-podobnych), tzw. klasycznych czynników wzrostowych, lub peptydów o określonej aktywności biologicznej, np. hematopoetycznych (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, SCF, EPO, TPO), limfocytotroficznych (interleukiny), chemotaktycznych (chemokiny),

przeciwvirusowych (interferony) itd. Peptydy należące do superrodziny transformującego czynnika wzrostowego typu β łączą właściwości typowe dla regulatorów wzrostu i różnicowania oraz cytokin.

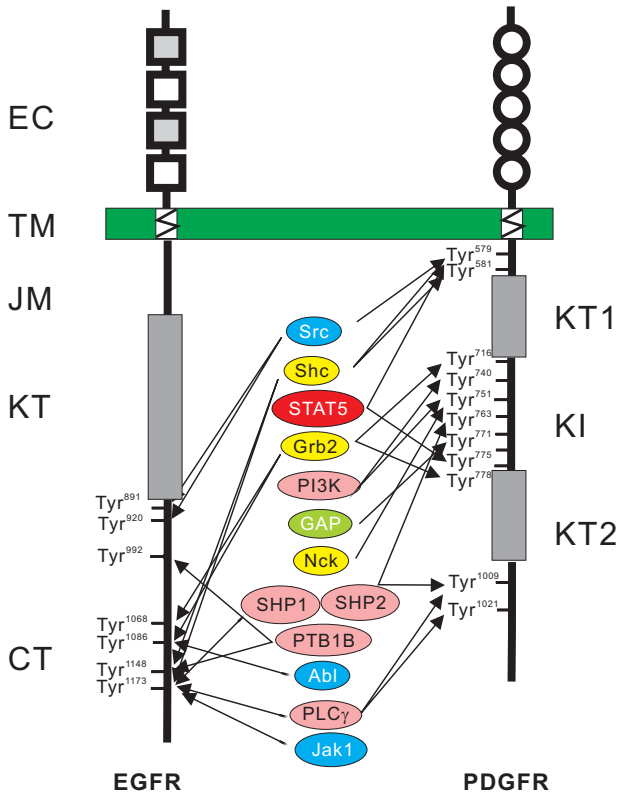
Wszystkie klasyczne czynniki wzrostowe mają receptory o aktywności kinazy tyrozynowej. Najliczniejszą grupę kinaz tyrozynowych receptorowych (Tabela 4) stanowią receptory czynników wzrostowych (rodzin: PDGF, FGF, IGF, EGF, NGF, GDNF, VEGF, angiopoetyn oraz HGF, M-CSF, SCF) i insuliny.

2.1. Aktywacja receptorów czynników wzrostowych

Kontrola proliferacji komórek somatycznych ssaków jest procesem bardzo złożonym. W świetle dotychczasowych wyników kluczowe zdarzenia regulujące ten proces zachodzą w fazie G1 cyklu komórkowego. Głównymi uczestnikami tego procesu są receptory czynników wzrostowych (rozdział 2.2.3 w cz. I), niektóre białka adaptorowe i kotwiczące (rozdział 3 w cz. I), małe białka wiążące nukleotydy guaninowe (rozdział 4.4.2 w cz. I), wybrane kinazy (rozdział 5) i fosfatazy (rozdział 6) białkowe oraz czynniki transkrypcyjne (rozdział 8). Ogólny schemat zdarzeń przebiegających w komórce po związaniu czynnika wzrostowego jest podobny, mimo że cząsteczki pośredniczące w przekazie sygnału mogą być różne. O przebiegu zdarzeń wewnątrzkomórkowych decyduje bowiem typ receptora, a wszystkie klasyczne peptydowe czynniki wzrostowe działają przez receptory o aktywności kinazy tyrozynowej.

Cykl życiowy komórki eukariotycznej od chwili jej powstania do podziału na dwie komórki potomne złożony jest z serii kolejno po sobie następujących zdarzeń. U ssaków wyróżnia się cztery różne fazy cyklu: G1 i G2 (podczas których następuje synteza RNA i białek), S (w której replikacji ulega DNA) i M (w której komórki przeprowadzają proces mitozy i cytokinezy) oraz fazę spoczynkową (G0). Niektóre typy komórek pozostają w spoczynku przez cały okres życia, aczkolwiek ich stymulacja mitogenami powoduje, że mogą podjąć cykl komórkowy i ulegać podziałom. Wyróżnia się szereg punktów kontrolnych, których przekroczenie umożliwia prawidłowe przejście przez pełny cykl komórkowy. Pierwszy z nich występuje w późnej fazie G1 i jest znany jako punkt restrykcyjny (R), po którego przekroczeniu komórki podejmują rundę podziałową. Inny występuje w fazie S i uaktywnia proces naprawy DNA (jeśli jest potrzebna) oraz umożliwia przejście G2/M po sprawdzeniu, że zakończył się prawidłowo proces replikacji DNA. Ostatni punkt kontrolny to swoiste mechanizmy, które są odpowiedzialne za zakończenie procesu podziału komórki (cytokinezę). Przejście przez każdą fazę cyklu komórkowego jest ściśle kontrolowane przez wiele różnych cząsteczek, głównie o aktywności enzymatycznej. Między innymi podział komórek ssaków jest regulowany przez kilka rodzin kinaz serynowo-treoninowych. Należą do nich: kinazy cyklinozależne, polokinazy, kinazy Aurora i kinazy Nrk (podobne do NIMA), opisane w rozdziale 5.1.3 w cz. I. Eland Hartwell, Paul Nurse i Timothy Hunt za prace prowadzące do odkrycia kluczowych regulatorów cyklu komórkowego otrzymali w 2001 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

Aktywacja cdk's obejmuje: syntezę cyklin, tworzenie kompleksów cyklina–cdk, defosforylację kinaz cdk przez fosfatazy cdc25 i przemieszczenie kompleksów cyklina–cdk do jądra komórkowego. Przyjmuje się obecnie, że procesem koniecznym do wyjścia komórek z fazy G0 jest indukowana kinazami cyklinozależnymi fosforylacja rodziny tzw. białek kieszeniowych (pRb, p130, p107), przebiegająca na wielu resztach seryny i treoniny. Białko pRB (*retinoblastoma*) pełni rolę przekaźnika sygnałów między zegarem cyklu komórkowego a transkrypcją białek, odpowiedzialnych za przejście z fazy G1 do S. Białko to występuje w dwóch podstawowych formach: wysoko- i niskoufosforylowanej. Ta ostatnia ma zdolność wiązania różnych białek, m.in. czynników transkrypcyjnych E2F (rozdział 8.8). Defosforylowane białka Rb wiążą kompleksy E2F/DP, czyniąc je nieaktywnymi. Fosforylacja białek Rb powoduje uwolnienie skompleksowanych z nimi ww. białek jądrowych i ich udział w stymulacji procesów transkrypcji. Zdarzenia te powodują wejście komórek w fazę S i umożliwiają realizację dalszych etapów reakcji wewnątrzkomórkowych prowadzących do mitozy.



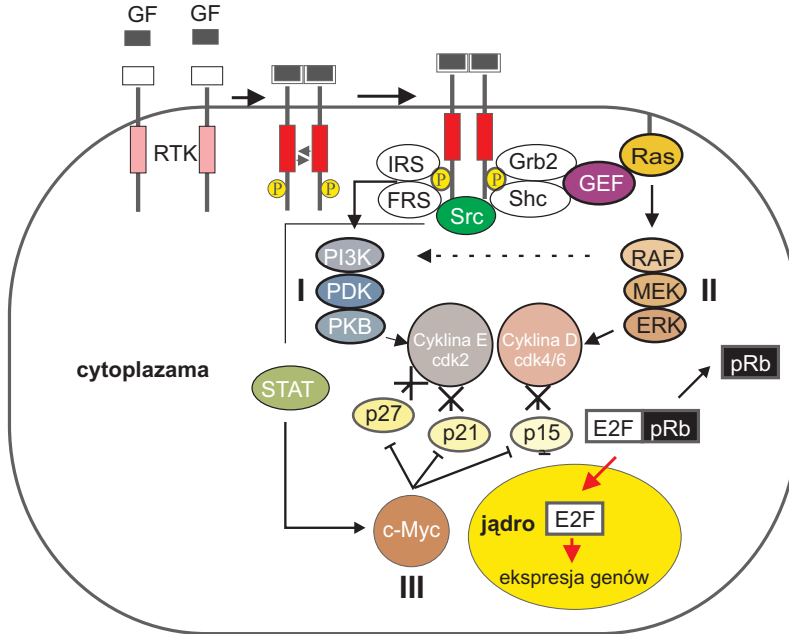
Rys. 2.1. Różnice w zdolności wiązania wybranych białek sygnałowych przez receptory EGF i PDGF. Kolorem niebieskim zaznaczono kinazy tyrozynowe niereceptorowe, żółtym – typowe białka adaptorowe, różowym – białka kotwiczące o aktywności enzymatycznej, czerwonym – cytozolowe czynniki transkrypcyjne, zielonym – białka regulujące aktywność białek G

Przyłączenie klasycznego czynnika wzrostowego do swoistego receptora w błonie komórkowej powoduje jego homo- lub heterodimeryzację i autofosforylację (rozdział 2.2.3 w cz. I). Proces autofosforylacji receptorów modyfikuje kowalencyjnie receptor przez przyłączenie reszty kwasu fosforowego do grupy -OH cząsteczek tyrozyny. Fosfotyrozyny stają się miejscami dokowania (wiązań) dla różnych białek sygnałowych, które z grubsza można podzielić na białka adaptorowe i kotwiczące. Wszystkie te białka muszą posiadać domeny (SH2 i/lub PTB), które umożliwiają im przyłączenie do fosfotyrozyn receptora. Wyjątkiem jest białko IRS (ang. *insulin receptor substrate*), które rozpoznaje charakterystyczną sekwencję (NPXY) aminokwasową receptora, zarówno insuliny, jak i insulinopodobnego czynnika wzrostowego I (IGF-IR). Białka adaptorowe (łącznikowe) to polipeptydy zawierające co najmniej dwie różne domeny białkowe odpowiedzialne za interakcję międzycząsteczkową i szereg potencjalnych miejsc fosforylacji (Tyr, Ser, Thr). Taka budowa tych białek sprawia, że są związkami niezbędnymi w łańcuchu cząsteczek przekazujących sygnał, łącząc dwa sąsiednie ogniwa tego łańcucha. Typowymi białkami adaptorowymi są m.in. Grb2 (domeny SH2 i SH3), Shc (domeny SH2 i PTB), Nck (domeny SH2 i SH3) (rozdział 3.3.2 w cz. I). W zależności od tego, które białko adaptorowe pośredniczy w przekazie sygnału od receptora, sekwencja zdarzeń może być różna, ale zazwyczaj uruchamiane są podobne drogi sygnalizacji mitogennej. Białka kotwiczące to białka także mające domeny umożliwiające im zakotwiczenie na fosfotyrozynach receptora, ale mające ponadto określoną aktywność biologiczną: enzymatyczną (PI3K, SHP-1/2, PTB-1B, PLC γ) lub regulacyjną (STAT5, GAP) (rozdział 3.3.3 w cz. I). Różnice i podobieństwa w budowie receptorów czynników wzrostowych oraz wybiórczą zdolność do wiązania określonych białek sygnałowych na przykładzie receptorów EGF i PDGF przedstawia rysunek 2.1. Wiązanie białek do określonych reszt fosfotyrozyn zaznaczono strzałkami.

Jak wynika z tego prostego porównania, istnieje wiele możliwości przeniesienia sygnału od receptora na wewnątrzkomórkowe układy metaboliczne. W przypadku sygnalizacji mitogennej istnieją co najmniej trzy różne drogi aktywacji. Pierwsza to aktywacja kinazy białkowej B (rozdział 5.1.1 w cz. I), druga to stymulacja kaskady enzymatycznej kinaz MAP (rozdział 5.1.2 w cz. I), a trzecia to stymulacja ekspresji protoonkogenu *c-myc* (rozdział 8.7).

2.2. Przekaz sygnału mitogennego

Ważnym regulatorem aktywności kinaz cyklinozależnych jest kinaza białkowa B (Akt), aktywowana pośrednio przez kinazę 3-fosfoinozytydów (PI3K), kinazę zależną od fosfatydyloinozytoli (PDK1), i kompleks białek mTOR-Rictor (opisane w rozdziale 5 w cz. I). Sygnał od receptora czynnika wzrostowego może być przekazywany na swoiste dla danego czynnika białko adaptorowe (IRS, FRS) lub bezpośrednio na kinazę PI3K. Aktywacja PKB/Akt (rozdział 5.1.1 w cz. I) powoduje z jednej strony degradację inhibitora kinaz cyklinozależnych p27^{Kip1}, a z drugiej stymulację syntezy cyklin D.

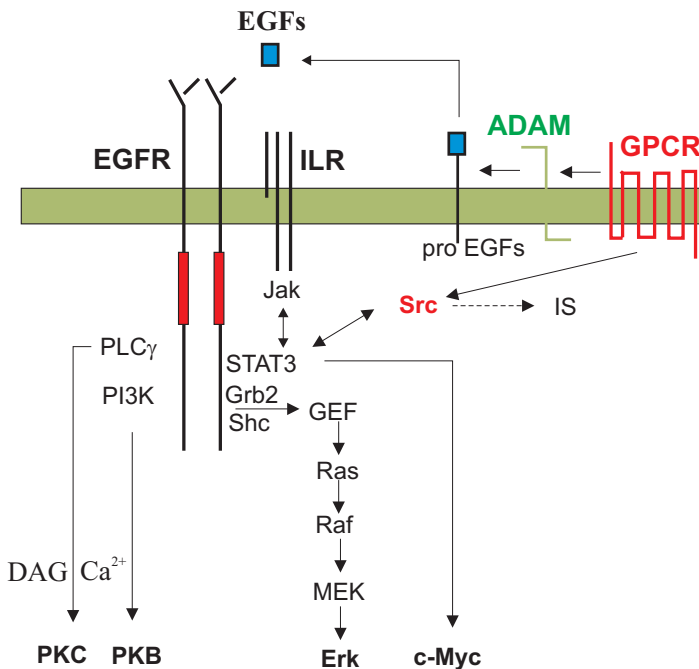


Rys. 2.2. Trzy główne drogi przeniesienia sygnału mitogennego. I – stymulacja kinazy białkowej B, II – aktywacja kaskady kinaz MAP, III – aktywacja białka Myc. Objaśnienia w tekście

Inną ścieżką mitogenną jest aktywacja kaskady kinaz MAP (rozdział 5.1.2 w cz. I). Stymulacja tej kaskady jest niezbędna (ale niewystarczająca) do wejścia komórek w fazę S. Sygnał Ras-MAPK kontroluje przejście z fazy G1 do S na różnych drogach: przez stymulację ekspresji genów cyklin D, przez stymulację tworzenia kompleksów cykliny E/cdk2 i cykliny A/cdk2 oraz przez obniżenie poziomu inhibitora p27. Należy zaznaczyć, że nie jest to jedyna możliwość ingerencji kinaz MAPK w cykl komórkowy. Udowodniono m.in., że sygnał Ras-MAPK reguluje także przejście G2/M, poprzez stymulację aktywności kompleksu cykliny B/cdk1. Podniesiony poziom Ras lub nadzwyczajnie wysoka aktywność kinaz MAP mogą prowadzić do transformacji nowotworowej komórki, dlatego komórki takie bronią się zazwyczaj zależnym od białka p53 wzrostem stężenia inhibitora p21.

Jednym z powszechnie występujących promotorów wzrostu komórkowego i proliferacji jest białko c-Myc (rozdział 8.7). Jest ono członkiem rodziny czynników transkrypcyjnych, określanych skrótem bHLH-LZip. c-Myc może być zarówno aktywatorem, jak i inhibitorem transkrypcji w zależności od natury czynników z nim asocjujących. W kompleksie z innym członkiem rodziny bHLH-LZip, białkiem Max aktywuje transkrypcję poprzez interakcję z sekwencją -CACGTG- w domenie określonej jako E-box w części enhancera (wzmacniacza). Białko Max może tworzyć także heterodimery z innymi przedstawicielami rodziny bHLH-LZip, takimi jak: Mad 1, Mad 3, Mad 4, Mxi 1, Mnt. Kompleksy te mogą konkurować z Myc/Max o wiązanie do DNA i hamować aktywność transkrypcyjną c-Myc. c-Myc jest wielofunkcyjnym

białkiem, które kontroluje takie procesy, jak: wzrost, stabilność genetyczna, angiogeneza, apoptoza i transformacja komórek. Białko to wykonuje swoją różnorodną aktywność biologiczną przez regulację transkrypcji wielu genów. W przypadku regulacji cyklu komórkowego za najistotniejsze uważa się supresję genów odpowiedzialnych za zahamowanie wzrostu komórkowego, w tym inhibitorów kinaz cdk: p15, p21, p27. Zahamowanie ekspresji genów inhibitorów kinaz cyklozależnych i obniżenie aktywności tych białek prowadzą do stymulacji wzrostu komórkowego (wejścia komórek w fazę S). Hipotetyczny mechanizm regulacji aktywności mitogennej stymulowanej czynnikami wzrostowymi przedstawia rysunek 2.2. Takie przedstawienie mechanizmów regulacji wzrostu nie oznacza, że nie są zaangażowane inne drogi sygnalizacyjne niezbędne do przygotowania komórki do podjęcia cyklu replikacyjnego. Aczkolwiek udowodniono bez żadnej wątpliwości, że w warunkach *in vitro* zablokowanie jednej z trzech przedstawionych powyżej dróg sygnałowych uniemożliwia przejście komórek przez pełny cykl komórkowy.



Rys. 2.3. Drogi sygnalizacji wewnątrzkomórkowej uruchamiane aktywacją receptora EGF (EGFR) i możliwa jego transmodulacja działaniem receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR) i receptorów interleukin (ILR). ADAM – metaloproteinyzyna o aktywności dezintegracji, Jak – kinazy Janusa, Src – kinaza tyrozynowa niereceptorowa z rodziny Src, IS – inne substraty, PLC γ – fosfolipaza γ , PI3K – kinaza 3-fosfoinozydowa, STAT3 – cytosolowy czynnik transkrypcyjny z rodziny STAT, Grb2, Shc – białka adaptorowe, GEF – czynnik stymulujący wymianę nukleotydów guaninowych, Ras – małe białko G, Raf, MEK, Erk – kaskada kinaz MAP, PKB i PKC – kinazy białkowe B i C, c-Myc – czynnik transkrypcyjny c-Myc, DAG – diacyloglicerol

Wyniki doświadczeń prowadzonych na wielu rodzajach komórek potwierdzają hipotezę, że aktywacja kinaz Erk i indukcja białka c-Myc są wymagane na wczesnych (do 1 godziny od przyłączenia czynnika wzrostowego) etapach fazy G1, natomiast aktywacja kinazy PI3K (zachodząca mniej więcej w połowie fazy G1) jest niezbędna do wejścia komórek w fazę S.

Przedstawione powyżej hipotezy są znacznym uproszczeniem sygnalizacji uruchamianej aktywacją receptorów czynników wzrostowych, a ponadto każdy z ich ligandów może aktywować swoiste dla siebie drogi sygnałowe. Dodatkowym utrudnieniem w wyjaśnieniu molekularnych podstaw tego typu sygnałów jest wymiana informacji na poziomie receptorów różnych klas hormonów. Jednym z najlepiej poznanych przykładów jest sygnalizacja z udziałem receptora EGF. Wielość ligandów EGFR i plejotropia sygnału wewnątrzkomórkowego powodują, że odpowiedź biologiczna komórki może być bardzo zróżnicowana. Główne drogi uruchamiane przyłączeniem liganda do receptora EGF przedstawia rysunek 2.3. Obejmują one sygnały typowe dla wszystkich czynników wzrostowych: Grb2(Shc)/GEF/Ras/MEK/Erk, PI3K/PKB i STAT/c-Myc oraz charakterystyczne dla niektórych GF sygnały z uczestnictwem fosfolipazy C i kinazy białkowej C (PLC γ /PKC). Zarówno pełne, jak i obcięte formy receptorów z rodziny ErbB znaleziono w jądrze komórkowym, co wskazywałoby na to, iż białka te mogą przekazywać sygnał bezpośrednio od błony komórkowej do jądra. Wykazano ponadto, że jądrowa lokalizacja receptorów ErbB jest związana z aktywacją wielu genów, m.in. cyklin D (rozdział 5.1.3 w cz. I), cyklooksygenazy i syntazy tlenu azotu (rozdział 4.4 w cz. I).

Niezwykle zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej z udziałem receptora EGF jest także spowodowane integracją dróg sygnalizacyjnych inicjowanych przez inne ligandy, i to na różnych poziomach komórkowych. Przykładem takich oddziaływań jest:

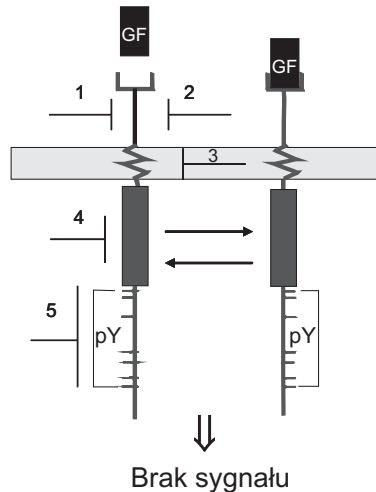
- a) uwalnianie rozpuszczalnych form czynników należących do rodziny EGF poprzez aktywację enzymów z rodziny ADAM pod działaniem ligandów receptorów typu GPCR (bombezyna, endotelina-1, angiotensyna II);
- b) pośrednia aktywacja (fosforylacja) EGFR przez stymulowaną ligandami GPCR aktywację kinaz tyrozynowych niereceptorowych z rodziny Src;
- c) pośrednia aktywacja EGFR pod działaniem kinaz Janusa, stymulowanych cytokinami i/lub hormonami (GH, PRL).

Nie należy zapominać, że dwie ostatnie drogi sygnałowe (b i c) mogą także przekazywać sygnał w kierunku odwrotnym, tj. od EGFR przez niereceptorowe kinazy tyrozynowe (rozdział 5.2 w cz. I) na inne układy komórkowe.

2.3. Inhibicja sygnału mitogennego na poziomie receptorów GF

Jak już wcześniej wspomniano, przekaz sygnału przez receptorowe kinazy tyrozynowe przebiega w kilku etapach obejmujących: wiązanie liganda, dimeryzację receptorów, autofosforylację, wiązanie białek adaptorowych oraz inicjację kaskad sygnałowych (wieloenzymatycznych). Precyzyjna regulacja aktywności RTKs jest

warunkiem prawidłowego funkcjonowania wszystkich komórek organizmu. Niestety, w wielu chorobach stwierdzono zaburzenia w przekazie sygnału realizowanego za pośrednictwem RTKs. Jednym z najbardziej niebezpiecznych jest onkogenna aktywacja tych kinaz, która może być wynikiem zarówno zmian w ich strukturze, jak i w ich ilości. Zmiany spowodowane mutacją, delecją lub translokacją genów kinaz tyrozynowych mogą skutkować konstytutywną aktywacją tych enzymów. Natomiast zwiększenie poziomu RTKs i ich ligandów prowadzi do powstania tzw. autokrynnej pętli wzrostowej. W obu przypadkach skutkiem jest niekontrolowany wzrost komórkowy. Nic więc dziwnego, że zahamowanie sygnału przekazywanego przez kinazy tyrozynowe jest celem wielu prac badawczych. W przypadku RTKs na każdym z ww. etapów sygnalizacji transbłonowej można zahamować przekaz sygnału i dla wszystkich poszukiwano bardziej lub mniej swoistych inhibitorów (Rys. 2.4 w cz. I). Na pierwszym etapie wykorzystywano m.in. monoklonalne przeciwciała, z których najbardziej znane są: Herceptyna – przeciwciało anti-HER2, Erbitux – przeciwciało dla EGFR, Bevacizumab – przeciwciało dla VEGFR2 czy CDP 860 – przeciwciało dla PDGFR. Także etap dimeryzacji receptorów był przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych. Chociaż indukowana ligandem dimeryzacja RTKs wymaga prawdopodobnie udziału różnych domen receptora, to istotne znaczenie w tym procesie ma domena transbłonowa i jej okolice. Zsyntetyzowano wiele krótkich peptydów (12–30 reszt aminokwasowych) wiążących się z tymi fragmentami receptora, efektywnie blokujących dimeryzację receptorów. Podobnie efektywne okazały się małe peptydy blokujące domeny białek adaptorowych, wiążących się z fosfotyrozynami receptora lub blokujących wiązanie białek adaptorowych do kolejnych uczestników szlaku mitogennego. W przypadku Grb2 użyto bogatych w prolinę „peptidimerów”



Rys. 2.4. Możliwości zahamowania sygnału mitogennego na poziomie receptora czynnika wzrostowego. 1 – antagoniści liganda, 2 – przeciwciała monoklonalne dla receptora, 3 – inhibitory dimeryzacji, 4 – inhibitory kinazy tyrozynowej (tyrfostryny), 5 – związki blokujące oddziaływanie receptor–wewnątrzkomórkowe białka sygnałowe

(peptydów mających dwie identyczne sekwencje prolinowe) do zablokowania jego dwóch domen SH3, przerwania sygnału Grb2 → GEF i uniemożliwienia aktywacji kaskady MAP. Ale najbardziej zaawansowane są obecnie prace nad drobnocząsteczkowymi inhibitorami kinaz tyrozynowych, nazwanych tyrfostinami (*tyrphostin*, ang. **tyrosine phosphorylation inhibitor**).

Tyrfostiny były od lat 80. XX wieku obiektem badań naukowych, także pod kątem ich przydatności w terapii przeciwnowotworowej. Niektóre z nich po roku 2001 zostały dopuszczone, głównie w USA, jako leki przeciwnowotworowe. Nadzieje, jakie budzą każde nowe możliwości przeciwdziałania rozwojowi chorób hiperproliferacyjnych, uzasadniają wprowadzenie także i tych związków do terapii przeciwnowotworowej. Trudno dziś jednak jednoznacznie odpowiedzieć, czy ta nadzieja jest w pełni uzasadniona.

Literatura uzupełniająca

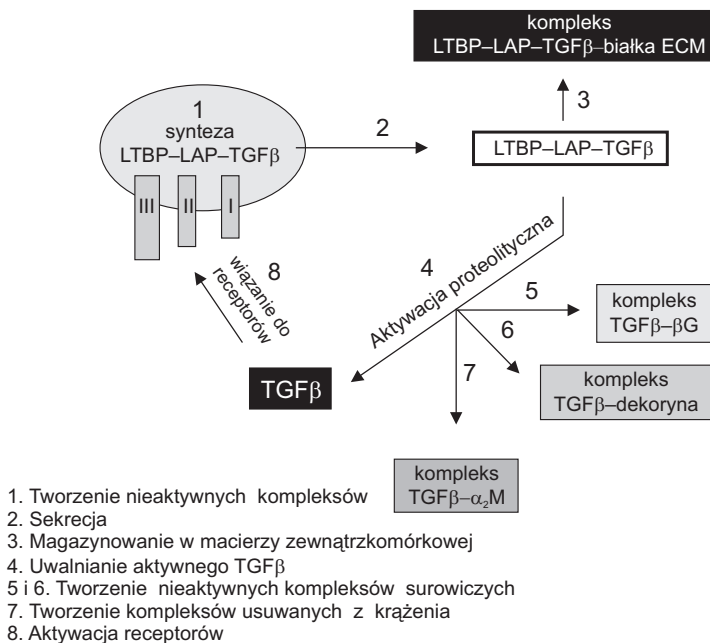
- Eswarakumar V.P., Lax I., Schlessinger L. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005, 16, 139–149.
- Gotoh N. Feedback inhibitors of the epidermal growth factor receptor signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009, 41, 511–515.
- Grose R., Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005, 16, 179–186.
- Harper J.V., Brookes G. The mammalian cell cycle. [w:] *Cell Cycle Control*, red. T. Humphrey i G. Brooks. Humana Press Inc., New Jersey 2005, 113–156.
- Kim J.J., Accili D. Signaling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Hormon IGF Res.* 2002, 12, 84–90.
- Klein A. Molekularne podstawy regulacji hormonalnej. Sygnalizacja międzykomórkowa i wewnątrzkomórkowa. Red. Adam Dubin, Seria wydawnicza Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, ISBN 83-88119-40-9, Kraków 2002, s. 1–149.
- Klein A. Peptydy regulujące wzrost i różnicowanie komórek. Czynniki wzrostowe i cytokiny. Red. Adam Dubin, Seria wydawnicza Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, ISBN 83-88519-96-4, Kraków 2006, s. 1–130.
- Klein A., Kisiełewska J. Tyrfostiny – drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz białkowych. *Post. Biol. Kom.* 2007, 34, 477–494.
- Loureiro R.M.B., D'Amore P.A.D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005, 16, 77–89.
- Massie C., Mills I.G. The developing role of receptors and adaptors. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 403–409.
- Scaltriti M., Baselga J. The epidermal growth factor pathway: A model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 5268–5272.
- Schlessinger J., Lemmon M.A. Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring. *Cell* 2006, 127, 45–48.
- Wieduwilt M.J., Moasser M.M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol. Life Sci.* 2008, 65, 1566–1584.

3. Molekularne mechanizmy działania transformującego czynnika wzrostowego typu β (TGF β)

Transformujące czynniki wzrostowe (TGFs, ang. *transforming growth factors*) to białka odkryte w 1978 roku przez J.E. DeLarco i G.J. Todaro w płynie hodowlanym fibroblastów mysich, transformowanych wirusem Moloneya (Mo-RSV). Nazwa została zaproponowana ze względu na zdolność tych czynników do odwracalnej, fenotypowej transformacji niektórych rodzajów komórek prawidłowych, głównie pochodzenia mezenchymalnego. Komórki te poddane działaniu transformujących czynników wzrostowych wykazywały *in vitro*: utratę zahamowania kontaktowego, zmianę morfologii oraz zdolność do wzrostu niezależnego od przyczepienia do podłoża, charakterystyczne dla większości komórek nowotworowych. Białka te są syntetyzowane przez wiele różnych typów komórek zwierzęcych i ludzkich, zarówno transformowanych, jak i prawidłowych. Wyróżnia się obecnie dwa podstawowe typy tych czynników: TGF α i TGF β . Typ α jest homologiem EGF i działa przez receptory EGF. Typ β jest różny strukturalnie od EGF i nie działa przez receptor tego czynnika, ale wymaga obecności EGF do pełnej stymulacji wzrostu niezależnego od przyczepienia do podłoża.

Superrodzina TGF β to duża, licząca dziś ponad 40 różnych polipeptydów grupa białek o aktywności plejotropowej. Do superrodziny tej zalicza się oprócz TGF β s także aktywiny/inhibiny (Act/Inh, ang. *Activin/Inhibin*), białka morfogenetyczne kości (BMPs, ang. *bone morphogenic proteins*), czynniki wzrostu i różnicowania (GDFs, ang. *growth and differentiation factors*), inhibitor Mulleriana (AMH, ang. *anti-mullerian hormone*), myostatynę i inne. Transformujący czynnik wzrostowy typu β (TGF β) to polipeptyd o niespotykanej, wielokierunkowej aktywności biologicznej, zaliczany do grupy hormonów plejotropowych. Dotychczas ustalono strukturę pięciu czynników zaliczanych do rodziny TGF β . Ssacze TGF β (TGF β 1–3) są białkami o m.c. 25 kDa, zbudowanymi z dwóch identycznych podjednostek, połączonych mostkami disiarczkowymi. Wszystkie TGF β wykazują około 70% podobieństwa w sekwencji aminokwasowej i zbliżoną aktywność biologiczną. TGF β są syntetyzowane w formie nieaktywnej cząsteczki prekursorowej zbudowanej z 391 reszt aminokwasowych. Najbardziej kompletne informacje o syntezie, właściwościach i aktywności biologicznej mamy o TGF β 1. Podobnie jak w innych białkach syntetyzowanych na rybosomach związanych z retikulum endoplazmatycznym peptyd sygnałowy pre-pro-TGF β 1 (29 reszt aminokwasowych) jest odcinany podczas przejścia prekursora przez błony szorstkiej siateczki endoplazmatycznej. Inne posttranslacyjne modyfikacje, jak dimeryzacja, glikozylacja i tworzenie skomplikowanej formy nieaktywnej (LAP-TGF β), mają miejsce przed sekrecją peptydu w aparacie Golgiego. Magazynem TGF β 1 u ssaków, podobnie jak dla płytkowego czynnika wzrostowego (PDGF), czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) i epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF) są płytki krwi.

Większość danych dotyczących syntezy, aktywacji i sygnalizacji TGF β 1 jest oparta na wynikach badań *in vitro*. Dojrzały, aktywny dimer TGF β 1 (m.cz. 25 kDa) jest w znakomitej większości przypadków niekowalencyjnie związany z pozostałą częścią prekursora (LAP, ang. *latency associated peptide*), określanego zazwyczaj jako mały kompleks latentny (SLC, ang. *small latent complex*), a całość kowalencyjnie związana ze swoistym białkiem nośnikowym (LTBP, ang. *latency associated peptide binding protein*) i nazywana dużym kompleksem latentnym (LLC, ang. *large latent complex*). LTBP stabilizuje czynnik wzrostowy, ułatwia jego sekrecję i pomaga w oddziaływaniu z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Przyjmuje się, że ECM jest magazynem zewnątrzkomórkowym TGF β 1, skąd może być szybko lokalnie uwalniany. Losy wydzielanego kompleksu są różne w zależności od zapotrzebowania organizmu na ten czynnik wzrostowy. Po uwolnieniu z nieaktywnego kompleksu może on wywierać swój skutek biologiczny poprzez wiązanie do swoistych receptorów w błonach komórek docelowych (RI–RIII). Lokalny nadmiar aktywnego TGF β może być neutralizowany przez szereg białek wiążących, jak: β -glikan, będący fragmentem zewnątrzkomórkowym receptora III lub kompleksowany przez inny proteoglikan – dekorynę. Białkiem, które usuwa TGF β z krążenia, jest α_2 -makroglobulina. Kompleks TGF β – α_2 M kierowany jest do komórek mających receptory dla α_2 -makroglobuliny (makrofagi, hepatocyty) i tam degradowany enzymatycznie. System syntezy, sekrecji i neutralizacji TGF β przedstawia rysunek 3.1.

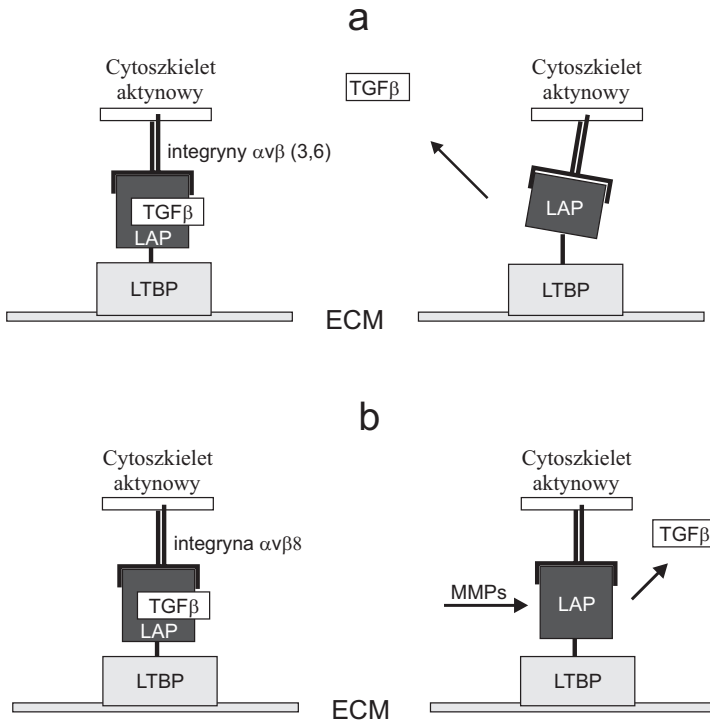


Rys. 3.1. Synteza, sekrecja i aktywacja transformującego czynnika wzrostowego typu β (TGF β). LAP – peptyd zapewniający latencję TGF β , LTBP – peptyd wiążący kompleks latentny, β G – β -glikan, α_2 M – α_2 -makroglobulina, I, II, III – receptory błonowe TGF β

W odróżnieniu od TGF β (i GDF8) pozostałe białka należące do superrodziny TGF β są wydzielane w postaci aktywnych dimerów, wiązanych (blokowanych) lokalnie przez różnych antagonistów (m.in. przez folistatynę i białka do niej podobne oraz sklerozynę). Niezwykle skomplikowany i niejednoznaczny jest także proces aktywacji (uwalniania z nieaktywnego kompleksu LAP–TGF β) tego czynnika, opisany w pkt. 3.1.

3.1. Uwalnianie aktywnego TGF β z kompleksu latentnego

Z uwagi na wszechstronność działania i powszechność występowania TGF β s jest zrozumiałe, że ich aktywność musi być regulowana bardzo precyzyjnie. To prawdopodobnie jest przyczyną rzadko spotykanej, wielostopniowej regulacji aktywności biologicznej na poziomie syntezy, sekrecji, uwalniania z nieaktywnego kompleksu oraz wiązania TGF β s ze swoistymi białkami nośnikowymi (Rys. 3.1). Uwalnianie biologicznie aktywnego TGF β wymaga dysocjacji tego czynnika wzrostowego z nieaktywnego kompleksu. Proces ten określany jest mianem aktywacji TGF β . Proponowane są różne mechanizmy aktywacji TGF β z małego (SLC), jak i z dużego (LLC) kompleksu latentnego, zarówno na drodze proteolizy, jak i zmian konformacyjnych.



Rys. 3.2. Bezpośredni (a) i pośredni (b) mechanizm uwalniania aktywnego TGF β z latentnego kompleksu LTBP–LAP–TGF β . Objasnienia w tekście

Proteolityczne uwalnianie TGF β z nieaktywnych kompleksów może być realizowane przez: niektóre metaloproteinazy (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13), plazminę, elastynę i aktywatory plazminogenu (typu urokinazy i tkankowego), a także przez glikozydazy usuwające reszty cukrowe z LAP.

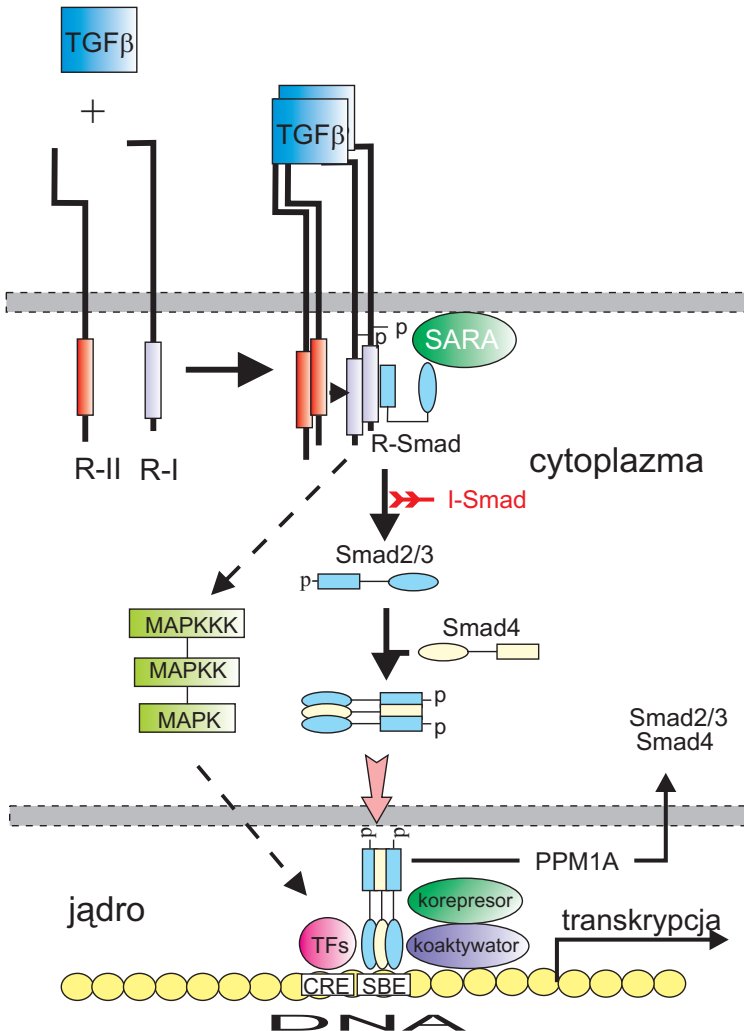
Uważa się, że aktywacja (uwalnianie) TGF β 1 zachodzi także na drodze angażującej integryny, ponieważ latentny kompleks TGF β jest wiązany przez wszystkie integryny α v (α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6 i α v β 8) oraz α 5 β 1, α 8 β 1 i integrynę płytkową α IIb β 3. Integryny (rozdział 2.2.4 w cz. I) są heterodimerami podjednostek α i β , a liczba tworzonych przez nie izoform receptorów wynosi 24. Receptory te mają zdolność wiązania różnych ligandów, w tym czynników wzrostowych (VEGF, PDGF, IGFs), ale najbardziej skomplikowane jest ich oddziaływanie z TGF β . Przy najmniej dwa różne mechanizmy mogą być zaangażowane w ten proces: bezpośredni i pośredni (Rys. 3.2).

Mechanizm bezpośredni to proces niezależny od działania proteaz, polegający na tym, że wiązanie integryn do kompleksu TGF β powoduje zmiany konformacyjne w latentnym kompleksie, prowadzące do uwolnienia aktywnego TGF β . Pośredni to mechanizm, w którym integryny działają jako białka dokujące (rozdział 3.4 w cz. I) dla kompleksu TGF β i niektórych proteaz (trombina, MMP-4) powodujących hydrolityczne rozbicie kompleksu LAP. Nie można także wykluczyć aktywacji TGF β 1 przez reaktywne formy tlenu (ROS), ponieważ TGF β 1 stymuluje aktywność oksydazy NADPH i produkcję ROS, które z kolei aktywowałyby TGF β . Proces ten mógłby reprezentować dodatnie sprzężenie zwrotne w aktywacji TGF β 1 przez komórki apoptotyczne.

3.2. Mechanizm aktywacji receptorów TGF β i sygnalizacja z udziałem białek Smad

Dotychczas opisano dwa typy receptorów o aktywności kinazy serynowo-treoninowej, charakterystyczne dla większości (ale nie dla wszystkich) białek zaliczanych do superrodziny TGF β s. Obecnie znanych jest siedem receptorów typu I (ALK 1–7, ang. *activin-like kinase*) i pięć receptorów typu II (TGF β R-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II, MISR-II). Receptory swoiste dla TGF β : TGF β 1R-I (ALK-5) i TGF β R-II są relatywnie małymi glikoproteinami o m.cz. odpowiednio 75 i 53 kDa (rozdział 2.2.3 w cz. I). Receptory te zbudowane są z krótkiej części akceptorowej, zawierającej domeny bogate w cysteinę, pojedynczej części transbłonowej i części wewnątrzkomórkowej, zawierającej dużą domenę kinazową. W części efektorowej receptorów TGF β R-I (w odróżnieniu od receptorów TGF β R-II) zlokalizowana jest pomiędzy błoną komórkową a domeną kinazową 30-aminokwasowa domena GS (zawiera sekwencję GSGS), kluczowa dla regulacji aktywności TGF β R-I. W formie nieaktywnej domena ta jest związana z immunofilinami (FKBP12, FKBP12.6). Części C-końcowe obu typów receptorów, zlokalizowane poza domeną katalityczną, zbudowane są z 24 (TGF β R-II) i 5 (TGF β R-I) reszt aminokwasowych. Opisano także receptor TGF β R-III o charakterze wysokocząsteczkowego proteoglikanu i endoglinę (glikoproteinę, jak początkowo niesłusznie sądzono, specyficzną dla

komórek endotelialnych) niemające aktywności enzymatycznej oraz receptor pułapkę, określane skrótem BAMBI (ang. *BMP and activin membrane-bound receptor inhibitor*). Biologiczna rola TGF β R-III w transmisji sygnału jest nie całkiem jasna, chociaż uważa się, że pełni on rolę cząsteczki prezentującej ligand receptorowi typu II, zwłaszcza dla ligandów o niskim powinowactwie do receptorów serynowo-treoninowych (np. do TGF β 2). Rola endogliny jest odmienna, ponieważ hamuje ona odpowiedź komórek na działanie TGF β .



Rys. 3.3. Schemat stymulowanej TGF β regulacji aktywności transkrypcyjnej. R-I i R-II – receptory TGF β , MAPKKK, MAPKK, MAPK – kaskada kinaz MAP, TFs – czynniki transkrypcyjne, SBE – sekwencja wiążąca białka Smad, CRE – sekwencja odpowiadająca na cAMP, PPM1A – fosfataza serynowo-treoninowa PPM1A, SARA – białko kotwiczące prezentujące R-Smad receptorowi TGF β R-I

Receptory typu I i II są bezpośrednio zaangażowane w przekaz sygnału inicjowany przyłączeniem ligandów z rodziny TGF β s i mają wzajemne powinowactwo do siebie. Kinaza receptora typu II jest aktywowana konstytutywnie, bez stymulacji hormonalnej. Po przyłączeniu TGF β do receptora typu II następuje tworzenie heterotetramerycznego kompleksu, złożonego z dwóch cząsteczek TGF β R-II i dwóch cząsteczek TGF β R-I. Powstanie kompleksu umożliwia fosforylację reszt seryny i treoniny, zarówno w domenie GS (oddysocjowanie immunofilin), jak i w innych częściach receptora typu I przez kinazę receptora typu II. Fosforylacja ta powoduje zmiany konformacyjne w cząsteczce TGF β R-I i aktywację jego kinazy serynowo-treoninowej, której substratami mogą być różne białka cytozolowe, m.in. białka Smad (rozdział 8.3).

Aktywacja i regulacja aktywności kinazowej receptorów superrodziny TGF β są wielostopniowe. Dobrze udokumentowany jest fakt fosforylacji receptorów typu I przez receptory typu II. Tak więc inicjacja przekazania sygnału przez ligand rozpoczyna się od receptorów typu II. Natomiast swoistość przekazania sygnału od różnych członków rodziny TGF β zależy od receptora typu I. Różnice w kinetyce biosyntezy, internalizacji i degradacji receptorów obu typów mają zasadnicze znaczenie w modulacji sygnału indukowanego białkami rodziny TGF β . Obecność receptorów dla TGF β stwierdzono w błonach cytoplazmatycznych bardzo wielu różnych typów komórek. Sugerowano istnienie licznych różnych układów efektorowych stymulowanych działaniem TGF β , jak: cyklaza adenylanowa, fosfolipaza C, kinaza białkowa B (PKB/Akt), kinazy MAP czy białka regulujące funkcjonowanie kanałów jonowych.

Istotną rolę w przeniesieniu sygnału od receptorów TGF β pełnią cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne z rodziny Smad (Rys. 3.3). Po ufosforylowaniu Smad2 i/lub Smad3 przez kinazę receptora TGF β I, białka te oddysocjują od receptora. Fosforylacja R-Smad znosi autoinhibicyjną interakcję pomiędzy domenami MH1 i MH2 i umożliwia wiązanie R-Smad do Smad4 (Co-Smad) przez ich domeny MH2. W stanie nieaktywnym białka R-Smad występują w postaci monomerów, a po fosforylacji tworzą homo- i heterooligomery oraz heterooligomery z Smad4. Z dotychczasowych doświadczeń wynika, że preferowane jest tworzenie trimerów R-Smad–Co-Smad (2 : 1). Heterotrimeryczne kompleksy R-Smad–Co-Smad akumulują się efektywnie w jądrze komórki. Mechanizm translokacji nie jest dokładnie poznany, ale wiadomo, że do prawidłowego przebiegu tego procesu niezbędna jest fosforylacja reszt serynowych w motywie -S-S-(V/M)-S-. Delecja C-końcowego odcinka domeny MH2, zawierającego ten motyw, uniemożliwia translokację kompleksów białek Smad do jądra komórkowego.

W jądrze kompleksy R-Smad–Co-Smad są zaangażowane w regulację aktywności transkrypcyjnej określonych genów. Wykazano, że domeny MH1 białek Smad3 i Smad4 (w odróżnieniu od Smad2) mają zdolność wiązania się do specyficznych domen DNA, zawierających sekwencje GTCT lub AGAC, określane skrótem SBE (ang. *Smad binding element*). Za wiązanie z DNA odpowiedzialna jest pętla „ β -harpinowa”, występująca w białkach R-Smad i Co-Smad. Smad2 jest niezdolne do bezpośredniego wiązania się z DNA, ponieważ gen jego pętli harpinowej zawiera dwa dodatkowe eksony blisko N-końca, które zmieniają konformację białka w domenie MH1. SBE-podobne sekwencje zostały opisane dla promotorów wielu genów

odpowiadających na TGF β , m.in. dla inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1), junB, kolagenu typu VII.

Efektywne wiązanie do DNA i aktywacja transkrypcji wymaga zazwyczaj tworzenia kompleksów pomiędzy białkami Smad a białkami jądrowymi mającymi także specyficzne sekwencje wiążące DNA. Jeśli interakcja pomiędzy Smad a takimi białkami jądrowymi jest silna, wówczas te ostatnie występują jako dominujące w wiązaniu kompleksu do DNA. Jeśli oddziaływania w obrębie kompleksów są słabe (lub żadne), białka jądrowe i białka Smad wiążą się niezależnie do oddzielnych regionów promotorowych i synergistycznie regulują transkrypcję określonych genów. Coraz więcej danych wskazuje, że efektywne wiązanie białek Smad do promotorów określonych genów wymaga równoczesnej obecności specyficznych sekwencji wiążących inne białka, takich jak ARE (ang. *activin responsive element*), TRE (ang. *TPA-responsive element*) czy CRE (ang. *cAMP-responsive element*) rozpoznających odpowiednio czynniki transkrypcyjne FAST1/2 (ang. *Forkhead activin signal transducer 1* lub *2*), AP-1 (ang. *activator protein 1*) i ATF-2 (ang. *activating transcription factor 2*).

Regulacja aktywności genów przez białka Smad zależy także od współdziałania z koaktywatorami transkrypcji, takimi jak podobne strukturalnie białka p300 i CBP (ang. *CREB-binding protein*) o aktywności acetylotransferazy histonów (HAT), obniżające kondensację chromosomów. Przeciwny skutek wywierają białka o aktywności deacetylaz histonów (HDACs, ang. *histone deacetylases*), które stymulują kondensację nukleosomów i hamują aktywność transkrypcyjną. Typowym korepresorem transkrypcji jest czynnik TGIF (ang. *5'TG'-interacting factor*), indukujący rekrutację deacetylaz histonów do promotorów genów stymulowanych kompleksem Smad2/Smad4/FAST2. Ostatnie doniesienia sugerują, że w indukowanym TGF β zahamowaniu wzrostu komórkowego kluczową rolę odgrywa białko p53, tworzące wraz z wieloma innymi białkami kompleks transkrypcyjny.

Proponuje się wiele alternatywnych dróg sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, indukowanych działaniem TGF β . Wśród nich należy wymienić przede wszystkim: stymulację kaskad kinaz MAP (Erk, JNK, p38), aktywację kinazy 3-fosfoinozytydów (PI3K), aktywację kinazy białkowej C (PKC) i inhibicję kinazy P70S6K. Te drogi przeniesienia sygnału mogą być niezależne od sygnalizacji z udziałem białek Smad lub mogą pośredniczyć w sygnalizacji z udziałem tych białek. Wynikiem tego jest plejotropowy, ogromnie zróżnicowany efekt działania TGF β . Rezultat końcowy zależy od rodzaju komórek docelowych i obecności innych czynników regulacyjnych. Podstawowe kierunki działania TGF β 1, najlepiej poznanego dotychczas przedstawiciela transformujących czynników wzrostowych typu β , można w uproszczeniu sprowadzić do następujących efektów:

- a) stymulacji niezależnego od przyłączenia do podłoża wzrostu prawidłowych fibroblastów;
- b) stymulacji wzrostu komórek mezenchymalnych;
- c) inhibicji wzrostu większości komórek epitelialnych i prekursorowych komórek krwi;
- d) regulacji różnicowania wielu różnych rodzajów komórek;
- e) modulacji odpowiedzi immunologicznej.

Hamowanie drogi sygnałowej TGFR-I → białka Smad jest możliwe na wielu poziomach, poczynając od inhibicji aktywności receptorowej, na dezaktywacji jądrowej białek Smad kończąc. Hamowanie aktywności receptora TGFβ może być realizowane na kilka sposobów:

- a) przez białka I-Smad;
- b) przez tworzenie nieaktywnego kompleksu BAMBI/TGFβR-I;
- c) przez tworzenie nieaktywnego kompleksu TGFβR-II z białkiem fuzyjnym ETVG-NTRK3;
- d) przez rekrutację fosfataz białkowych (np. PP1c) do białka SARA i defosforylację receptorów TGFβ.

Natomiast inhibicja sygnału przekazywanego przez białka Smad jest regulowana przez ich defosforylację przez jądrowe fosfatazy (PPM1A), co ogranicza liczbę aktywnych białek Smad w jądrze i ich eksport do cytoplazmy lub przez ubikwitynację tych białek i degradację w proteasomach przez różne klasy ligaz ubikwityny.

Określenie „TGFβs” obejmuje stale rosnącą liczbę peptydów, które łącznie tworzą superrodzinę czynników wzrostowych o niezwykłych właściwościach. Zakres aktywności różnych członków tej rodziny jest bardzo szeroki, a wszechstronność ich działania przewyższa jakąkolwiek inną, znaną grupę hormonów. Peptydy te mogą regulować tak różne procesy, jak: wzrost tkanek, fibroza, gojenie ran, angiogeneza, odpowiedź immunologiczna, formowanie kości, hematopoeza, rozwój embrionalny, morfogeneza.

Literatura uzupełniająca

- Azhar M., Schultz J.E.J., Grupp I., Dorn II G.W., Meneton P., Molin D.G.M., Gittnberger-de Groot A.C., Doetschman T. Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003, 14, 391–407.
- Bierie B., Moses H.L. TGF-β and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, 17, 29–40.
- Clark D.C., Liu X. Decoding the quantitative nature of TGF-β/Smad signaling. *Trends Cell Biol.* 2008, 18, 430–442.
- De Caestecker M. The transforming growth factor-β superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004, 15, 1–11.
- Heldin C.-H., Landstrom M., Moustakas A. Mechanism of TGF-β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009, 21, 166–176.
- Itoh S., Ten Dijke P. Negative regulation of TGF-β receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007, 19, 176–184.
- Jenkins G. The role of proteases in transforming growth factor-β activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008, 40, 1068–1078.
- Levy L., Hill C.S. Alternations in components of the TGF-β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, 17, 41–58.
- Li A.G., Koster M.I., Wang X.-J. Roles of TGFβ signaling in epidermal/appendage development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003, 14, 99–111.
- Mishara L., Marshall B. Adaptor proteins and ubiquinators in TGF-β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, 17, 75–87.

- Sanchez-Capelo A. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005, 16, 15–34.
- Shi Y., Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003, 113, 685–700.
- Shigeno K., Yoshida H., Pan L., Luo J.M., Fujisawa S., Naito K., Nakamura S., Shinjo K., Takeshita A., Ohno R., Ohnishi K. Disease-related potential of mutations in transcriptional cofactors CREB-binding protein and p300 in leukemias. *Cancer Lett.* 2004, 213, 11–20.
- Sporn M.B. The early history of TGF- β , and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, 17, 3–7.
- Verrecchia F., Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role of extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* 2002, 118, 211–215.
- Wipff J.-P., Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor β -1 – an intimate relationship. *Eur. J. Cell Biol.* 2008, 87, 601–615.

4. Stymulowana cytokinami transmisja sygnału wewnątrzkomórkowego

Cytokiny i czynniki wzrostowe odgrywają kluczową rolę w regulacji układów: immunologicznego, hematopoetycznego, nerwowego, naczyniowo-sercowego i endokrynnego. Uczestniczą także w embriogenezie i organogenezie, regulując procesy wzrostu, różnicowania, migracji i programowanej śmierci komórek. Charakterystyka biochemiczna fosfoprotein, takich jak kinazy tyrozynowe niereceptorowe Jak i Src (rozdział 5.2 w cz. I) lub białka STAT (rozdział 8.2), przyniosła wiele wiadomości o mechanizmie przeniesienia sygnału indukowanego cytokinami, od receptorów błonowych do jądra komórkowego. W przeciwieństwie do receptorów klasycznych czynników wzrostowych receptory większości cytokin nie mają domeny kinazy tyrozynowej w swojej części efektorowej. Receptory te wykorzystują głównie do aktywacji zdarzeń wewnątrzkomórkowych zasocjowane z nimi kinazy tyrozynowe niereceptorowe (głównie receptory interferonów i większości interleukin), przede wszystkim z rodziny kinaz Janusa (Jak 1–3, Tyk2). Tego typu receptory określane są zazwyczaj jako „receptory cytokin”, chociaż wiadomo, że różne rodziny cytokin działają przez różne typy receptorów. Związanie liganda z „receptorami cytokin” (poza receptorami interleukin rodziny IL-1) powoduje oligomeryzację receptorów i aktywację zasocjowanych z nimi kinaz białkowych. Te z kolei fosforylują wzajemnie reszty tyrozyny w obrębie domeny kinazowej (co podnosi ich aktywność enzymatyczną) oraz reszty tyrozyn w wewnątrzkomórkowej części receptorów (co stwarza miejsca dokowania dla białek mających domeny SH2 lub PTB). Ten rodzaj aktywacji powoduje, że w dalszym przekazie sygnału mogą uczestniczyć różne białka adaptorowe (np. Grb2, Ship2, Gab), cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne (np. STAT) i enzymy, mające ww. domeny. To z kolei sprawia, że mogą zostać uruchomione różne szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, angażujące kaskady kinaz MAP, kinazy tyrozynowe niereceptorowe z rodziny Src itp. Wymiana informacji między wieloma drogami sygnalizacji pozwala zróżnicować odpowiedź różnych rodzajów komórek na ten sam ligand. Co więcej, różne ligandy mogą równocześnie generować w tej samej komórce przeciwstawne sygnały, a balans pomiędzy tymi sygnałami może określać ostateczną odpowiedź komórki. Pytaniem podstawowym było, jak poszczególne cytokiny inicjują swoistą odpowiedź komórkową oraz dlaczego różne cytokiny mogą pośredniczyć w podobnych efektach biologicznych? Odpowiedź, przynajmniej częściową, przyniosły badania udziału różnych kinaz Jak i białek STAT w przekazie sygnału wewnątrzkomórkowego. Wyniki tych badań ilustruje tabela 11.

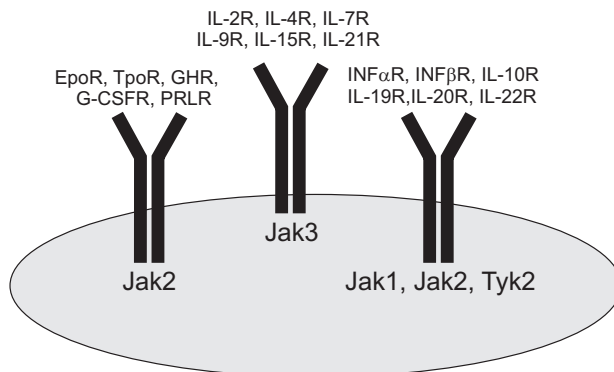
Jak łatwo zauważyć, poszczególne białka mają swoistą dla danej cytokiny (lub cytokin) podjednostkę wiążącą ligand (jedną z podjednostek wiążących ligand), co decyduje o odpowiedzi na określoną cytokinę. Z drugiej strony poszczególne rodziny cytokin mają zazwyczaj wspólną podjednostkę efektorową (rozdział 2.2.4 w cz. I),

rodzina IL-6 – podjednostkę gp130, rodzina IL-2/4 – podjednostkę (R) γ c, a rodzina IL-3/5/CM-CSF – podjednostkę β c, co umożliwia aktywację tych samych lub podobnych białek sygnałowych. Przyjmuje się powszechnie, że pierwszoplanową rolę w transmisji sygnału generowanego cytokinami grają białka STAT, opisane w rozdziale 8.2. Przyłączenie tych białek do fosfotyrozyn (pY) receptora umożliwia fosforylację tyrozyny białek STAT przez zasocjowane z receptorem kinazy Jak. Fosforylacja tyrozyny powoduje odłączenie białek STAT od receptora i asocjację dwóch cząsteczek tych białek, na zasadzie oddziaływań ich domen SH2 i fosfotyrozyn. Dimery białek STAT ulegają translokacji do jądra komórkowego i stymulują ekspresję określonych genów.

Tabela 11. Udział poszczególnych rodzajów: podjednostek receptorowych, kinaz Jak i białek STAT w sygnalizacji wybranych cytokin i hormonów

Ligand	Podjednostki receptorowe				Kinazy Jak				Białka STAT						
	unikalne	wspólne			1	2	3	T2	1	2	3	4	5a	5b	6
		β c	IL-2R β	IL-2R γ	gp130										
INF α , β , κ , ω , ϵ	α R1, α R2					+			+	+	++	+		+	+
INF γ	γ R1, γ R2					+	+			+		+		+	+
INF λ 1–3	λ R1					+			+	+	++	+		+	+
IL-2**	2R α		+	+		+		+		+		+	++	++	+
IL-3	3R α	+					+						+	+	
IL-4	4R α			+		+	+	+							++
IL-5	5R α	+					+							+	+
IL-6	6R α				+	+	+		+	+		+		+	+
IL-7	7R α			+		+		+						+	+
IL-9	9R α			+		+		+						+	+
IL-10	10R1, 10R2					+			+	+		+		+	+
IL-11	11R α				+	+	+		+	+		+		+	+
IL-15**	15R α		+	+		+		+		+		+	++	++	+
GH	α 2						+							+	+
PRL	α 2						+							+	+
Tpo	α 2						+							+	+
Epo	α 2						+							+	+

wyłączono podjednostki wiążące ligand, * lub podjednostka IL-13R, ** receptory zbudowane z trzech podjednostek, ++ dominujący udział jednego typu białka STAT w przekazie sygnału



Rys. 4.1. Wybrane przykłady receptorów cytokin przekazujących sygnał za pośrednictwem kinaz Janusa

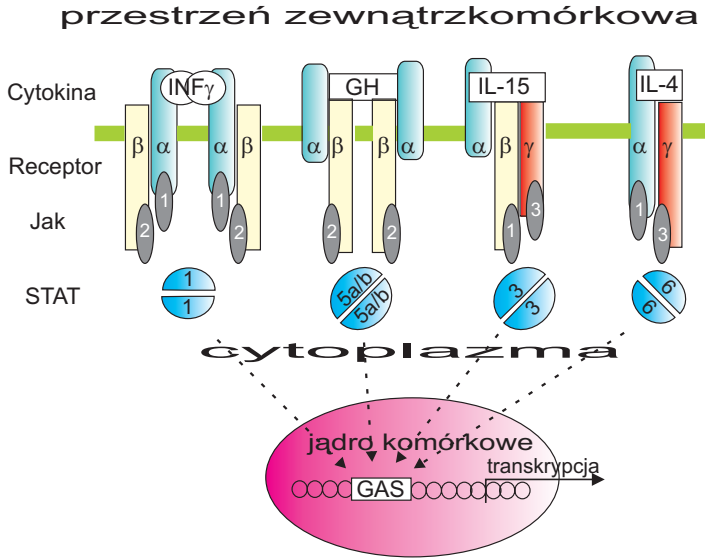
Receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi mają różne preferencje do poszczególnych kinaz Janusa. Receptory homodimeryczne aktywują wyłącznie kinazy Jak2. Receptory zawierające podjednostkę γc aktywują głównie białka Jak1 i Jak3. Natomiast receptory zawierające podjednostkę gp130 oraz receptory cytokin typu II wykorzystują kinazy Jak1, Jak2 i/lub Tyk2 w różnych kombinacjach (Rys. 4.1).

Wszystkie białka STAT, z wyjątkiem STAT2, wiążą się w jądrze komórkowym ze specyficzną domeną DNA, określaną skrótem GAS (ang. *gamma-activated site*), aczkolwiek poszczególne białka tej rodziny przyłączają się do różnych elementów tej domeny. Przykładowo, tylko białko STAT6 posiada zdolność do wiązania się z określoną sekwencją promotora ciężkiego łańcucha IgE (w obrębie GAS), co oznacza, że przede wszystkim ligandy receptora IL-4 oraz IL-13R, IL-15R i IL-2R angażujące STAT6 (zob. Tabela 11) mogą stymulować ekspresję immunoglobulin klasy E. Homodimery białka STAT2 (i częściowo heterodimery zawierające to białko) wiążą się z domeną DNA, określaną jako element odpowiedzi stymulowanej interferonem (ISRE, ang. *interferon-stimulated response element*) i pośredniczą w działaniu interferonu α . Współdziałanie kinaz Jak oraz białek STAT z wybranymi receptorami cytokin (i receptorem hormonu wzrostu) przedstawia rysunek 4.2.

Działanie poszczególnych cytokin zależy w dużym stopniu od rodzaju kofaktorów (koaktywatorów i korepresorów) transkrypcji, współdziałających z białkami STAT.

Hamowanie przekazu sygnału receptor–kinazy Janusa–białka STAT może odbywać się na różnych drogach, głównie przez:

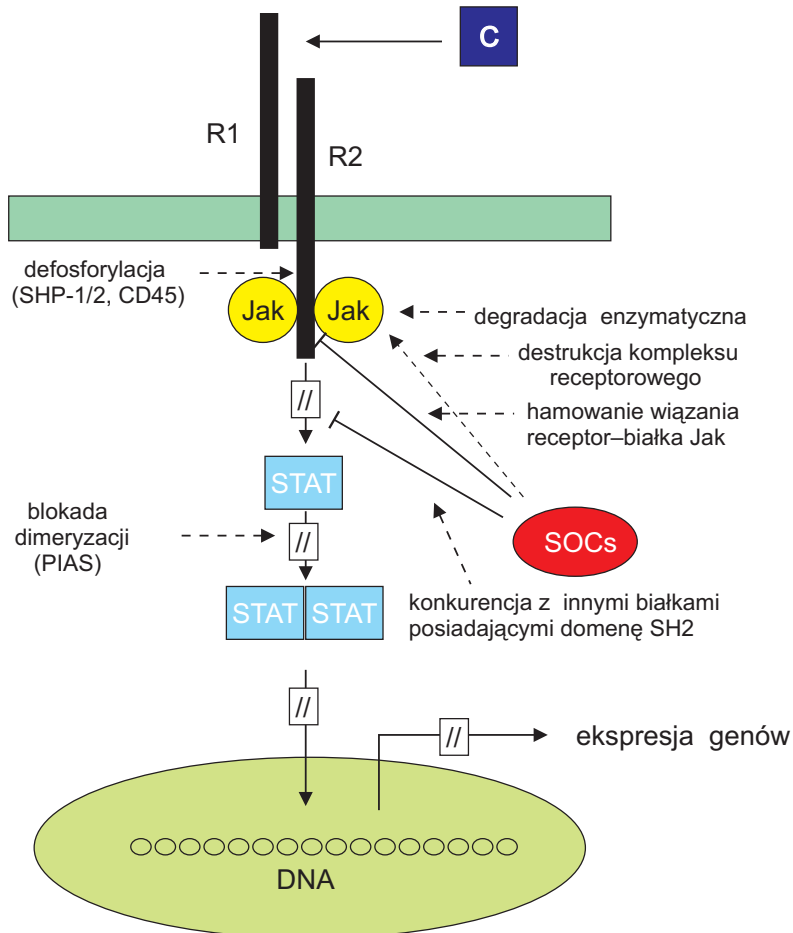
- fosfatazy tyrozynowe (SHP-1, SHP-2, CD45) powodujące zahamowanie tworzenia i stabilizację kompleksów sygnalizacyjnych;
- inhibitory SOCs, które mogą uniemożliwiać wiązanie kinaz Jak do receptora; blokadę pętli aktywacyjnej białek Jak lub kierować kompleksy receptorowe i zasocjowane z nimi białka na drogę degradacji enzymatycznej w proteasomach;
- inhibitory PIAS wiążące się z białkami STAT i uniemożliwiające ich dimeryzację.



Rys. 4.2. Udział kinaz Janusa (Jak) i białek STAT w inicjowanej wybranymi ligandami ekspresji genów. INF γ – interferon γ , IL – interleukina, GH – hormon wzrostu

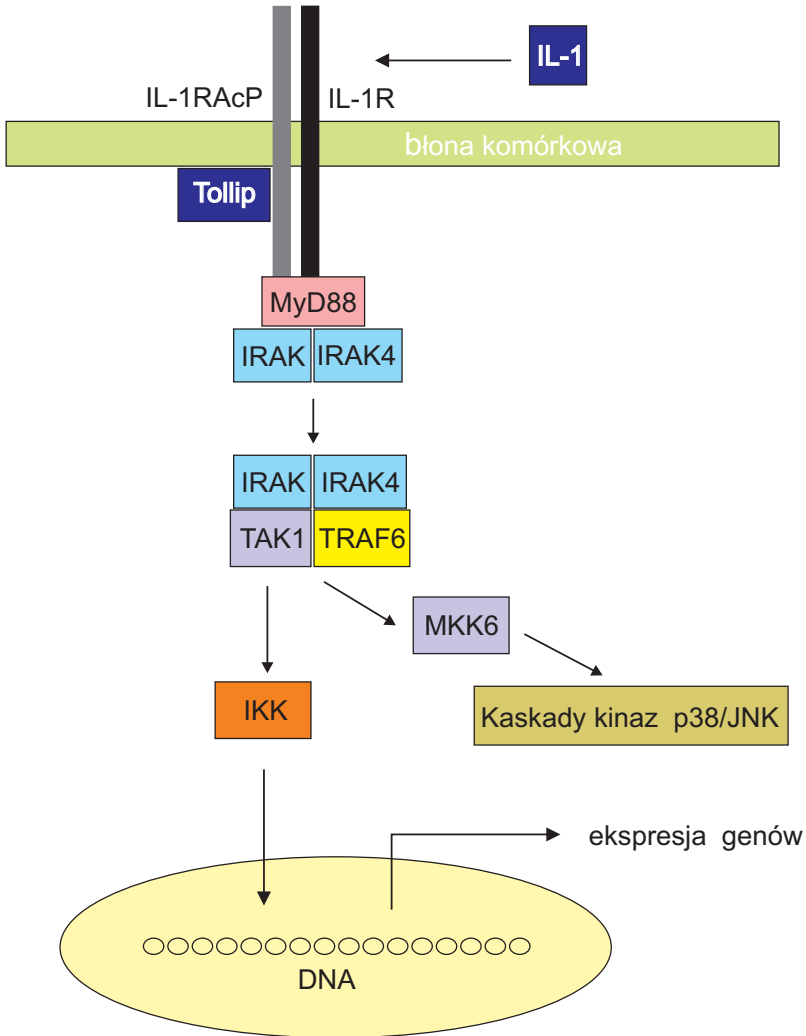
Ogólny schemat hamowania sygnalizacji inicjowanej „receptorami cytokin” z udziałem kinaz Jak i białek STAT przedstawia rysunek 4.3. Zaburzenia w sygnalizacji inicjowanej receptorami cytokin mają istotne znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu komórek obrony immunologicznej i komórek hematopoetycznych. Może to dotyczyć dojrzewania lub funkcjonowania specyficznych populacji komórek, zarówno w sensie pozytywnym, jak i negatywnym. Dlatego zmiana ekspresji odpowiednich genów oraz zmiany w poziomie białek uczestniczących w sygnalizacji receptor \rightarrow kinazy Jak \rightarrow białka STAT mają ogromne znaczenie w patologii wielu chorób immunologicznych. Upośledzenie funkcji receptorów cytokin prowadzi do wielu zaburzeń w przekazaniu sygnału, z których najbardziej istotne to: defekty hematopoetyczne, choroby mieloproliferacyjne i białaczki.

Brak ekspresji lub upośledzenie funkcji choćby jednego z białek uczestniczących w określonym szlaku przeniesienia informacji powoduje podobne zmiany w odpowiedzi komórkowej. Doświadczalnie udowodniono to dla wielu zmian patologicznych, wynikających z nieprawidłowej regulacji ligandami, działającymi przez „receptory cytokin”. Między innymi stwierdzono, że zwierzęta doświadczalnie pozbawione genów INF γ lub podjednostki α receptora tej cytokiny albo białka STAT1 wykazują brak immunoodporności na zakażenia wirusowe i zwiększoną zapadalność na niektóre choroby nowotworowe. Nokaut genów Epo lub podjednostek β jej receptora powoduje niedokrwistość (brak dojrzałych erytrocytów), a genów GH, podjednostek β jego receptora lub białek STAT (5a/5b) – upośledzenie wzrostu. Niezdolność komórek do syntezy podjednostki β receptora IL-15 lub białka STAT3 prowadzi do zaniku produkcji komórek NK, natomiast brak podjednostki γ receptora



Rys. 4.3. Inhibicja przekazu sygnału na drodze receptor cytokin → kinazy Jak → białka STAT. C – cytokina, R1/2 – podjednostki dimerycznych receptorów cytokin, SHP-1, CD45 – fosfatazy tyrozynowe, SOCs – inhibitory sygnalizacji inicjowanej cytokinami, PIAS –inhibitory dimeryzacji białek STAT, Jak – kinazy Janusa

IL-7, upośledzenie białka STAT3 lub mutacja w genie Jak3 powoduje ciężki złożony niedobór odpornościowy (SCID, ang. *severe combined immunodeficiency*). Podobnie brak podjednostki IL-4 γ , kinazy Jak3 lub białka STAT6 upośledza różnicowanie limfocytów Th2 i hamuje całkowicie syntezę IgE. Nie ulega wątpliwości, że każde upośledzenie funkcji białek przenoszących sygnał lub brak jednego ogniwa w łańcuchu transmisyjnym powoduje określone zmiany patologiczne. Należy podkreślić, że fosfotyrozyny receptorów cytokin mogą także wiązać inne białka adaptorowe lub kotwiczące, angażujące dodatkowo różne szlaki metaboliczne. Przykładem może być wiązanie (przez domeny SH2) do receptora IL-6 fosfatazy tyrozynowej SHP-2 i jej fosofrylacja przez Jak na resztach Tyr³⁰⁴ i Tyr³²⁷. Do tych reszt może z kolei



Rys. 4.4. Schemat przekazu sygnału inicjowanego przez interleukinę 1 (IL-1). IL-1R – receptor IL-1, IL-1RAcP – białko pomocnicze dla IL-1R, Tollip – białko scalające kompleks receptorowy, MyD88 – czynnik 88 różnicowania komórek mieloidalnych, IRAK – kinaza zasocjowana z IL-1, TRAF – czynnik asocjujący z receptorem TNF, TAK – kinaza aktywowana TGF β , MKK – kinaza kinazy MAP, IKK – kinaza białka I κ B

przyłączać się białko adaptorowe Grb2, które umożliwia dalszą sygnalizację z udziałem białek Ras i kaskady kinaz MAP. Cytokiny działające przez receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi inicjują szerokie spektrum odpowiedzi biologicznej, poczynając od stymulacji wzrostu do inhibicji wzrostu komórek (nie tylko układu immunologicznego), od promocji odpowiedzi ostrej fazy i ogólnej odpowiedzi immunologicznej do jej supresji. Wyjaśnienie plejotropowego działania

cytokin jest jeszcze odległe. Wymaga to nie tylko dokładnej charakterystyki dróg przenoszenia sygnału przez poszczególne cytokiny, lecz także przede wszystkim ich współdziałania między sobą i z innymi uczestnikami odpowiedzi immunologicznej.

Jak już wspomniano, przez receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi nie-receptorowymi działa większość interleukin i wszystkie interferony. Wśród interleukin, które inicjują odmienną drogę sygnalizacji, są interleukina 8, która jest w rzeczywistości chemokiną i aktywuje receptory asocjujące z białkami G, oraz rodzina interleukiny 1 (IL-1 α , IL-1 β i IL-18), której przedstawiciele działają przez receptory Toll-podobne (rozdział 2.2.5 w cz. I).

IL-1(α i β) oraz IL-18 są prozapalnymi cytokinami i ważnymi mediatorami aktywującymi odpowiedź immunologiczną. Cytokiny są syntetyzowane w formie nieaktywnych prekursorów i uaktywniane na drodze proteolitycznej (IL-1 α jest aktywna także w formie prekursorowej). Wyróżnia się dwa typy receptorów dla interleukin z rodziny IL-1: receptor typu I zawierający domenę TIR i receptor typu II niezawierający tej domeny (rozdział 2.2.5 w cz. I) oraz kilka koreceptorów. Koreceptorami IL-1RI są białka IL-1RAcP i IL-1Rp2, a IL-18RI α białko IL-18RI β (IL-18AcP). Wszystkie te białka mają trzy domeny Ig-podobne w części akceptorowej i domenę TIR w części efektorowej. Natomiast receptor typu II pełni rolę receptora pułapki.

Przyłączenie IL-1 do jej receptora błonowego powoduje heterodimeryzację z koreceptorem i utworzenie aktywnego kompleksu receptorowego zdolnego do przekazania sygnału. Heterodimeryzacja prowadzi do przyłączenia do kompleksu receptorowego białka MyD88 i następnych białek pośredniczących w przekazaniu sygnału: Tollip (ang. *Toll-interacting protein*), IRAK (ang. *IL-1 associated kinase*) i IRAK4 (Rys. 4.4). Przypuszcza się, że białko Tollip scala kompleks sygnalizacyjny i utrzymuje go przy wewnętrznej stronie błony komórkowej, poprzez swoją domenę C2. Pozostałe białka wewnątrzkomórkowe kompleksu oddziałują z sobą poprzez asocjację swoich domen DD. Krzyżowa fosforylacja kinaz IRAK i IRAK4 powoduje ich oddysocjowanie z kompleksu receptorowego i wiązanie z białkiem TRAF6. Czynniki TRAF6 aktywuje z kolei kaskady kinaz MAP (JNK/SAPK i p38) oraz kinazy IKK (rozdział 8.1), co prowadzi do uwolnienia aktywnego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i regulację ekspresji odpowiednich genów.

Mechanizm sygnalizacji z udziałem IL-18 jest bardzo podobny do opisanego dla IL-1. Różni się przede wszystkim rodzajem koreceptora, swoistego dla IL-18. Znajduje to odzwierciedlenie w podobnych skutkach biologicznych indukowanych przez obie cytokiny.

Literatura uzupełniająca

- Dalke A., Heeg K., Bartz H., Baetz A. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCs). *Immunobiology* 2008, 213, 225–235.
- Luo Ch., Lacia P. Inhibitor JAKs/STATs and the kinases: a possible new cluster of drugs. *Drug Disc. Today* 2004, 9, 268–275.
- O'Sullivan L.A., Liongue C., Lewis R.S., Stephenson S.E.M., Ward A.C. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol. Immunol.* 2007, 44, 2497–2506.

- Subramaniam S., Stansberg Ch., Cunningham Ch. The interleukin 1 receptor family. *Dev. Comp. Immun.* 2004, 28, 415–428.
- Tato C.M., Cua D.J. SnapsShot: Cytokines I. *Cell* 2008, 132, 324.e1–324.e2.
- Tato C.M., Cua D.J. SnapsShot: Cytokines II. *Cell* 2008, 132, 500.e1–500.e2.
- Tato C.M., Cua D.J. SnapsShot: Cytokines III. *Cell* 2008, 132, 900.e1–900.e2.
- Tato C.M., Cua D.J. SnapsShot: Cytokines IV. *Cell* 2008, 132, 1062.e1–1062.e2.
- Vainchenker W., Dusa A., Constantinescu S.N. JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008, 19, 385–393.
- Voßhenrich Ch.A.J., DiSanto J.P. Interleukin signaling. *Curr. Biol.* 2002, 12, R760–R763.
- Wilks A.F. The Jak kinases: Not just another kinase drug discovery target. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008, 19, 319–328.
- Zdanov A., Wlodawer A. A new look at cytokine signaling. *Cell* 2008, 132, 179–181.

5. Apoptoza zależna i niezależna od receptorów

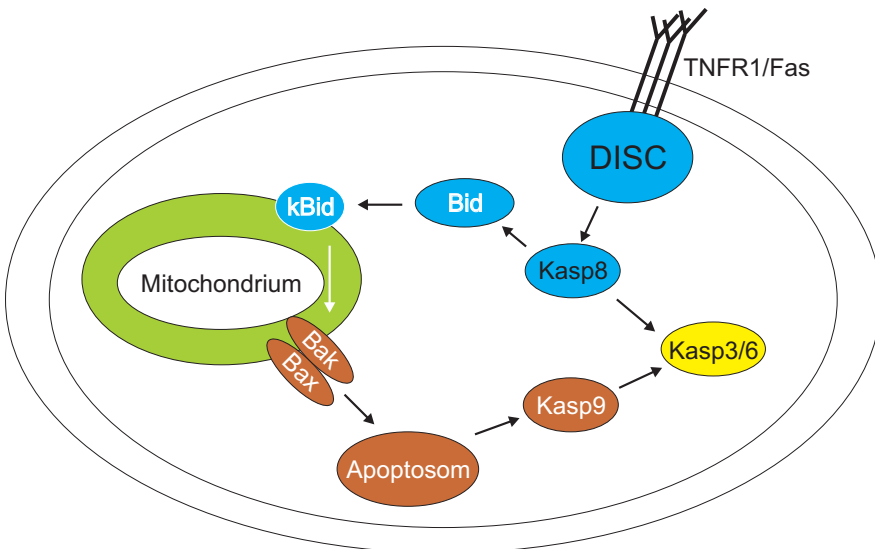
Śmierć komórki może następować w wyniku nekrozy lub apoptozy. Śmierć nekrotyczna spowodowana uszkodzeniem komórki manifestuje się stanem zapalnym, w przeciwieństwie do apoptozy. Pierwszą koncepcję „śmierci apoptotycznej” sformułowali w roku 1972 John Kerr, Andrew Wyllie i Alastair Curie. Apoptozę mogą powodować zarówno czynniki fizyczne (promieniowanie, szok temperaturowy), jak i chemiczne (cytostatyki, wolne rodniki, glukokortykoidy, białka: TNF, FasL i TRAIL, modyfikowane lipoproteiny o niskiej gęstości (mLDL), ceramidy, niedobór czynników wzrostowych).

Apoptoza w warunkach fizjologicznych pełni istotną rolę w takich procesach, jak rozwój embrionalny, regulacja układu immunologicznego, morfogeneza, homeostaza tkankowa oraz w wielu procesach patologicznych (chorobowych). Te ostatnie można podzielić na takie, w których nasila się proces apoptozy, takie jak choroby neurodegradacyjne (choroba Alzheimera, Parkinsona), choroby związane z obniżoną odpornością immunologiczną (AIDS) i prawdopodobnie arterioskleroza, oraz schorzenia, w których obserwuje się obniżony poziom apoptozy: niektóre nowotwory (prostaty, jajników, piersi), infekcje wirusowe i choroby autoimmunologiczne. Śmierć apoptotyczna związana jest z indukcją „genów śmierci”, powodującą określone zmiany metaboliczne. Komórki apoptotyczne charakteryzują się specyficzną morfologią, zmianami genetycznymi i metabolicznymi. Zmiany strukturalne to utrata połączeń międzykomórkowych i wyspecjalizowanych struktur błonowych, zanik asymetrii błony komórkowej (ekspozycja N-acetyloglukozoaminy, redystrybucja fosfatydylocholine i fosfatydyloseryny), kondensacja chromatyny i cytoplazmy, związana z utratą płynu komórkowego (wytwarzanie pęcherzyków ulegających fuzji z błoną komórkową i wydzielających swoją zawartość na zewnątrz), fragmentacja DNA na odcinki stanowiące wielokrotność nukleosomów (zapobieżenie proliferacji komórek). Rezultatem ostatecznym jest tworzenie uwypukleń odrywających się od komórki w postaci tzw. ciałek apoptotycznych, zawierających organelle komórkowe i pofragmentowaną chromatynę, które są efektywnie usuwane na drodze fagocytozy.

W procesie apoptozy można wyróżnić trzy główne fazy: inicjacji procesu apoptozy, fazę wykonawczą i fazę degradacji struktur komórkowych. Przebieg fazy pierwszej zależy m.in. od typu komórki i rodzaju stymulacji proapoptotycznej (cytokiny, stres oksydacyjny, zaburzenia równowagi jonowej, uszkodzenia DNA). W fazie drugiej następuje aktywacja enzymów (proteaz, nukleaz) i innych cząsteczek uczestniczących w fazie degradacji, opisanej powyżej.

Wyróżnia się przynajmniej dwie różne drogi sygnalizacji apoptotycznej (Rys. 5.1): jedną indukowaną za pośrednictwem tzw. receptorów śmierci (droga zewnątrzkomórkowa) i drugą będącą odpowiedzią mitochondriów na reakcje

stresowe (droga wewnątrzkomórkowa), która w efekcie promuje wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych. Choć wiele receptorów śmierci zostało już opisanych (zob. rozdział 2.2.6 w cz. I), mechanizm przenoszenia sygnału jest znany względnie dobrze dla dwóch z nich CD95/Fas i TNFR1, których naturalnymi ligandami są odpowiednio: CD95L/FasL i TNF. CD95L/FasL jest białkiem o m.c. około 40 kDa, syntetyzowanym przez aktywowane komórki limfoidalne i uprzywilejowane immunologicznie komórki miejsc odpornych na zakażenie. Skutki fizjologiczne indukowane tym ligandem obejmują selekcję komórek T i eliminację dojrzałych, aktywowanych limfocytów T (zakończenie odpowiedzi immunologicznej) oraz zabijanie komórek zainfekowanych wirusami i komórek nowotworowych przez komórki CD8⁺ i NK. TNF jest plejotropową cytokiną, syntetyzowaną przez różne rodzaje komórek, głównie przez aktywowane makrofagi i limfocyty. Zakres aktywności biologicznej TNF jest bardzo szeroki. Stymuluje proliferację komórek prawidłowych, działa cytotoxicznie, przeciwwirusowo i immunoregulacyjnie. Swoje działanie biologiczne wywołuje przez dwa receptory TNFR1 (p55) i TNFR2 (p75), różniące się głównie obecnością (TNFR1) lub nieobecnością (TNFR2) domeny śmierci (DD) w części efektorowej. Proporcje obu receptorów w błonie komórkowej mogą determinować jej zachowanie indukowane TNF, promując odpowiedź antyapoptotyczną (m.in. przez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B) lub proapoptotyczną (za pośrednictwem białek adaptorowych zawierających domeny DD).

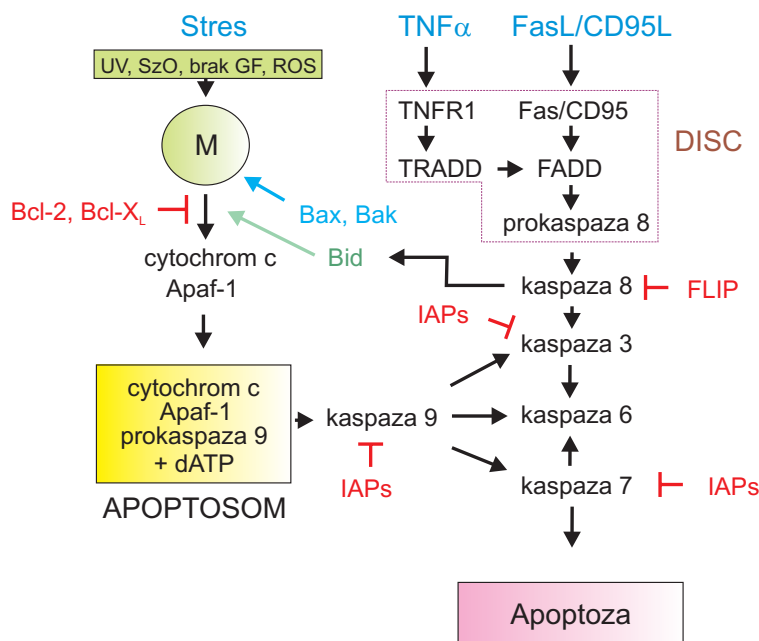


Rys. 5.1. Zewnątrzkomórkowa (inicjowana receptorami TNFR1/Fas) i wewnątrzkomórkowa (inicjowana proapoptotycznymi białkami Bak/Bax) droga sygnalizacji apoptotycznej. TNFR1 – receptor 1 TNF α , Fas – receptor FasL, DISC – kompleks proapoptotyczny DISC, Kasp – kaspaza, kBid – krótsza o fragment C-końcowy forma białka Bid

Sekwencja proapoptotycznych zdarzeń wewnątrzkomórkowych, indukowanych działaniem CD95L/Fas lub TNF (Rys. 5.2) obejmuje kolejno:

- związanie liganda z receptorem mającym tzw. domenę śmierci (DD) i wymuszoną tym faktem oligomeryzację (trimeryzację) receptorów;
- interakcję receptora z białkami adaptorowymi FADD, TRADD (także mający domeny DD);
- utworzenie kompleksu inicjującego apoptozę (DISC, ang. *death inducing signaling complex*), przekazanie sygnału od białek adaptorowych do inicjatorowej prokaspazy 8 (przez asocjację domen typu DED) i powstanie aktywnej kaspazy 8;
- aktywację kaspaz efektorowych (głównie kaspazy 3) przez kaspazę 8, które z kolei rozpoczynają realizację programu destrukcji komórki.

Niezależnie od aktywacji kaspaz efektorowych (rozdział 9.1) kaspaza 8 może oddziaływać na białka Bcl-2 mające wyłącznie domenę BH3 (rozdział 9.3), głównie na białko Bid, powodując odcięcie jego fragmentu C-końcowego. To umożliwi translokację obciętego białka Bid do zewnętrznej błony mitochondrialnej i jego oligomeryzację. Krótka forma Bid może także powodować zmiany konformacyjne białka Bax



Rys. 5.2. Uproszczony schemat mechanizmu apoptozy indukowanej ligandami (TNF α i FasL/CD95L) oraz stresem. UV – promieniowanie ultrafioletowe, SzO – szok osmotyczny, GF – czynnik wzrostowy, ROS – reaktywne formy tlenu, M – mitochondrium, Bcl-2, Bcl-X_L – antyapoptotyczne białka Bcl-2, Bax, Bak, Bid – proapoptotyczne białka Bcl-2, IAPs – inhibitory apoptozy, FLIP – inhibitory kaspazy 8

lub Bak i ich przemieszczenie do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Wymienione proapoptotyczne białka Bcl-2 mogą tworzyć homo- i heterooligomery formujące kanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, zwiększają jej przepuszczalność i umożliwiają wyciek cząsteczek tworzących tzw. apoptosom (rozdział 9.3).

Programowana śmierć komórki może także nastąpić w wyniku określonej sytuacji stresowej indukowanej czynnikami fizycznymi (promieniowanie, temperatura, szok osmotyczny, stres oksydacyjny) lub chemicznymi (reaktywne formy tlenu, leki przeciwnowotworowe, brak czynników wzrostowych). W tym przypadku informacja uruchamiająca aktywację kaspaz pochodzi z mitochondriów, głównie w wyniku zmian przepuszczalności błon mitochondrialnych. Po otrzymaniu sygnału do apoptozy powierzchnia mitochondriów wybrzusza się i dochodzi do perforacji zewnętrznej błony mitochondrialnej. Powoduje to obniżenie potencjału membranowego mitochondriów ($\Delta\Psi_m$), które koreluje ze stopniem rozprężenia transportu elektronów i fosforylacji oksydacyjnej. Skutkiem zmian przepuszczalności błony mitochondrialnej jest także wyciek białek międzybłonowych, w tym cytochromu c i białka Apaf-1 (ang. *apoptosis protease-activating factor*). Cytochrom c tworzy kompleks z białkiem Apaf-1, prokaspazą 9 i dATP, określane często mianem apoptosomu. W tej propozycji cytochrom c i dATP są potrzebne do utworzenia połączenia Apaf-1 z prokaspazą 9 i zmian konformacyjnych Apaf-1, niezbędnych do aktywacji proteazy. Utworzenie kompleksu Apaf-1–prokaspaza 9 prowadzi do aktywacji kaspazy 9 (kaspazy inicjatorowej), prawdopodobnie na drodze autokatalizy. Aktywna kaspaza 9 aktywuje z kolei kaspazy efektorowe (3, 6, 7).

Inicjowana kaspazami wykonawczymi degradacja białek komórkowych jest zaangażowana m.in. w usuwanie inhibitorów apoptozy (IAPs) oraz w proteolizę białek antyapoptotycznych, np. Bcl-2 i Bcl-X_L. Ten ostatni efekt jest związany ponadto z produkcją fragmentów białkowych stymulujących przepuszczalność błon mitochondrialnych. Dlatego decyzja o przeżyciu lub śmierci komórki jest zależna zarówno od poziomu ligandów i receptorów śmierci, jak i od stosunku antyapoptotycznych do proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2. Stwierdzenie, że białko Bid jest substratem kaspazy 8, a produkt jego trawienia ulega translokacji z cytoplazmy do błony mitochondrialnej (gdzie stymuluje mitochondrialny sygnał do apoptozy), jest bardzo istotne, bowiem proces ten łączy sygnał do apoptozy wysyłany przez receptory śmierci (drogę zewnątrzkomórkową) z sygnałem wysyłanym przez mitochondria (drogę wewnątrzkomórkową).

Mitochondria są podstawowym źródłem aktywnych form tlenu (ROS) w większości rodzajów komórek. Podwyższony poziom komórkowego ROS może odgrywać pierwszoplanową rolę w sygnalizacji proapoptotycznej.

Na podstawie doświadczeń na myszach zaproponowano także trzeci mechanizm aktywacji kaspaz indukowany reakcją stresową retikulum endoplazmatycznego (ER) i aktywacją kaspazy 12. Kaspaza ta wykazuje ponad 45% podobieństwa sekwencji aminokwasowej do ludzkich kaspaz 4 oraz 5 i jest zlokalizowana głównie w retikulum endoplazmatycznym. Jej aktywacja następuje np. w wyniku zaburzenia homeostazy wapniowej w ER, ale jest zupełnie niezależna od sygnałów przekazywanych od receptorów śmierci lub białek mitochondrialnych.

Znaczącą rolę w regulacji procesu apoptozy odgrywają swoiste białka inhibitorowe, określane skrótem IAP (rozdział 9.2). Znane są trzy ludzkie białka IAP: cIAP-1, cIAP-2 i XIAP o wysokim podobieństwie sekwencji aminokwasowej. Chociaż fizjologiczna rola tych białek nie jest całkiem jasna, wykazano, że XIAP, cIAP-1 i cIAP-2 są silnymi inhibitorami kaspaz 3, 7 i 9, natomiast nie hamują aktywności kaspaz 1, 6, 8 i 10. Inhibitorami kaspazy 8 są białka FLIP zawierające domenę DED. Białka te oddziałują najprawdopodobniej z domeną DED białek FADD i hamują sygnał proapoptotyczny inicjowany zarówno przez TNF, jak i przez FasL.

Fizjologicznym potwierdzeniem udziału ww. białek w sygnalizacji pro- i antyapoptotycznej są wyniki badań zmian w ekspresji odpowiednich genów w procesie starzenia się organizmów wielokomórkowych, głównie ludzi. Wskazują one jednoznacznie, że wraz ze starzeniem się organizmu rośnie poziom wszystkich białek proapoptotycznych (ligandów i receptorów śmierci, białek adaptorowych z domeną śmierci, kaspaz, białek Bid i Bax), a maleje poziom białek antyapoptotycznych Bcl-2, Bcl-xL i inhibitorów kaspaz (FLIP, IAPs).

Literatura uzupełniająca

- Bredesen D.E. Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J. Neurotrauma* 2000, 17, 801–810.
- Dirks-Naylor A.J., Griffiths C.L. Glucocorticoid-induced apoptosis and cellular mechanisms of myopathy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2009, 117, 1–7.
- Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* 2001, 69, 2957–2964.
- Hail N. Jr, Carter B.Z., Konopleva M., Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis* 2006, 11, 889–904.
- Hector S., Prehn J.H.M. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: A review. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1795, 117–129.
- Henson P.M., Hume D.A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* 2006, 27, 244–250.
- Huang P., Oliff A. Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol.* 2001, 11, 343–348.
- Kerr J.F.R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002, 181–182, 471–474.
- Kong A.-N.T., Yu R., Chen Ch., Mandlekar S., Primiano T. Signal transduction events elicited by natural products: Role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch. Pharm. Res.* 2000, 23, 1–16.
- Kuwano K., Hara N. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000, 22, 147–149.
- Mehmet H. Apoptosis: caspases find a new place to hide. *Nature* 2000, 403, 29–30.
- Saraste A., Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 2000, 45, 528–537.
- Walczak H., Sprick M.R. Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem. Sci.* 2001, 26, 452–453.

Zakończenie

Historia badań mechanizmów regulacji hormonalnej sięga połowy lat 50. XX wieku i jest związana z odkryciem tego, iż odwracalna fosforylacja białek może modyfikować aktywność enzymów regulujących metabolizm glikogenu. Prawie w tym samym czasie wykazano, że hormony, takie jak adrenalina i glukagon, stymulują syntezę cAMP, co legło u podstaw hipotezy tzw. wtórnych (drugich) przekaźników informacji hormonalnej. Mniej więcej 10 lat później wyizolowano kinazę białkową A (PKA), odpowiedzialną za regulację wielu szlaków metabolicznych. Odkrycia te uznaje się za początek rozwoju nowej dziedziny biochemii, określanej mianem sygnalizacji, a zajmującej się molekularnymi podstawami tłumaczenia sygnału hormonalnego na odpowiedź biologiczną komórki. Kamieniami milowymi w wyjaśnieniu mechanizmów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej była charakterystyka poszczególnych ogniw przekazywania informacji hormonalnej, poczynając od receptorów, a na czynnikach transkrypcyjnych kończąc. Wśród nich nie można pominąć wyników badań struktury i funkcji receptora epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF), pierwszego znanego receptora o aktywności enzymatycznej, i odkrycia znaczenia stymulowanej ligandem dimeryzacji, nie tylko tego typu receptorów, w inicjacji sygnału wewnątrzkomórkowego. Lata 60. XX wieku to także odkrycie znaczenia cyklu fosforanów fosfatydyloinozytoli oraz poznanie nowych wtórnych przekaźników informacji: diacyloglicerolu i inozytolotrifosforanu (a później innych fosforanów inozytolu). Wyniki te otworzyły serię badań nad udziałem fosfolipidów w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, której rezultatem było m.in. ustalenie roli kinazy 3-fosfoinozytydów (PI3K) w syntezie 3'-fosfoinozytydów uczestniczących w różnych drogach sygnalizacji z udziałem białek zakotwiczanych w błonie cytoplazmatycznej (np. kinazy białkowej B). Przełom lat 1970–1980 to charakterystyka strukturalna i funkcjonalna białek G oraz ugruntowanie ich roli jako uniwersalnych przekaźników sygnału od najliczniejszej klasy receptorów działających przez te białka (receptorów GPCR). Trudno przecenić także znaczenie poznawcze bliższej charakterystyki fizykochemicznej oddziaływań międzycząsteczkowych w tworzeniu łańcuchów sygnalizacyjnych poprzez swoiste domeny (SH2, SH3, PTB, WW, FHA, SAM, LIM, EH, EVH1, PDZ, PH, FYVE) umożliwiające białkom sygnałowym (adaptorowym, kotwiczącym, dokującym i innym) regulację większości podstawowych procesów życiowych komórki. Ponad 100 różnych domen zostało scharakteryzowanych do dziś na drodze porównawczej analizy sekwencji aminokwasowych, lecz dla wielu z nich nie znaleziono jeszcze struktur partnerskich. Poznanie wielu białek adaptorowych pozwoliło m.in. powiązać przekaz sygnału od receptorów błonowych do monomerycznych (małych) białek G (Ras, Rho, Rac itp.), zdolnych do aktywacji kaskad enzymatycznych (np. kaskady kinaz MAP). Charakterystyka funkcjonalna białek kotwiczących umożliwiła zrozumienie znaczenia kompartmentacji określonych procesów metabolicznych dla identyfikacji i zróżnicowania poszczególnych dróg sygnałowych. Natomiast odkrycie białek dokujących potwierdziło, od dawna przewidywane, istnienie struktur

wewnątrzkomórkowych, ułatwiających i usprawniających regulację określonych ciągów metabolicznych (np. odwracalnej fosforylacji białek).

W latach 1980–1990 opisano wiele innych ważnych zasad sygnalizacji transbłonowej, m.in. nową klasę białkowych kinaz tyrozynowych, której pierwszymi poznаныmi przedstawicielami były białka transformujące wirusów v-Src i v-Abl. Odkrycia te zapoczątkowały badania komórkowych kinaz tyrozynowych niereceptorowych, pośredniczących w różnych rodzajach sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Wśród tych kinaz są także kinazy Janusa uczestniczące w przenoszeniu sygnału od receptorów pozbawionych aktywności katalitycznej (np. receptorów cytokin) na cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne STAT. Fosforylacja, a następnie translokacja dimerów STAT do jądra komórkowego jest najprostszym (pomijając białka Notch) przykładem przeniesienia sygnału od receptora na poziom regulacji ekspresji genów przez cytoplazmatyczne czynniki transkrypcyjne, takie jak np. białka Smad.

Trudno jest wymienić wszystkie kierunki rozwijanych obecnie badań dotyczących przenoszenia informacji biologicznej w organizmach żywych. Można jednak przewidywać dalszy rozwój, przynajmniej tych najbardziej istotnych z punktu widzenia zarówno teorii, jak i wykorzystania jej wyników w zastosowaniach praktycznych. Od strony teoretycznej jednym z podstawowych obszarów badań będzie prawdopodobnie konstrukcja i sprawdzenie aktywności modułowych domen odpowiedzialnych za interakcje międzycząsteczkowe, głównie typu białko–białko. Zdolność białek chimerowych do przenoszenia sygnału (tworzenia swoistych połączeń międzycząsteczkowych) wydaje się atrakcyjnym, godnym rozwijania narzędziem badawczym. Podobnie analiza strukturalna białek sygnałowych i jej zamierzone modyfikacje mogą dostarczyć wielu informacji na temat ciągle jeszcze słabo poznanych zagadnień regulacji ich aktywności biologicznej. Przykładem mogą być badania zależności między zmianami struktury pętli aktywacyjnej kinaz białkowych a regulacją ich oddziaływań z ATP i/lub z substratami tych enzymów.

Nie ulega wątpliwości, że określenie jeszcze wielu struktur tego typu będzie niezbędne do zrozumienia molekularnych podstaw regulacji aktywności tych białek. Osobnym, stale poszerzanym, rozdziałem badań sygnalizacji są poszukiwania coraz to nowych wtórnych przekaźników informacji hormonalnej oraz uzupełnienie naszych wiadomości o zakresie działania już znanych związków tego typu. Doniesienia o tym, że potencjalnymi regulatorami kinaz białkowych mogą być: sfingozyna, ceramidy, cAMP-ryboza i wielofosforany inozytoli (np. IP6) wskazują nowe kierunki poszukiwań.

Jedną z zagadek do rozwiązania jest czasowo-przestrzenna organizacja łańcucha przekazywania informacji biologicznej i jej poszczególnych ogniw. Duże nadzieje wiąże się z poznaniem struktury i zasad funkcjonowania białek sygnałowych (adaptorynych, kotwiczących i dokujących). I wreszcie jedno z najtrudniejszych metodycznie, czekających na rozwiązanie zagadnień stanowi poznanie wzajemnych powiązań między różnymi drogami przekazywania sygnału (*cross-talk*). Taka wymiana informacji może występować między drogami sygnałowymi aktywowanymi pojedynczym receptorem lub częściej między szlakami sygnałowymi inicjowanymi różnymi receptorami. *Cross-talk* może zachodzić na wielu poziomach wewnątrzkomórkowych, poczynając od błony cytoplazmatycznej, na jądrze komórkowym kończąc, i angażować składniki wspólne dla więcej niż jednej drogi przekazywania sygnału. Zarówno dodatnie, jak

i ujemne sprzężenia zwrotne sygnałów mogą zachodzić na wielu etapach sygnalizacji, poczynając od receptorów, na czynnikach transkrypcyjnych kończąc. Niestety, w tym przypadku na razie więcej jest jeszcze pytań niż odpowiedzi na nie.

Spośród bardzo wielu aspektów badań realizowanych obecnie oraz projektów na przyszłość wydaje się, że głównie dwa kierunki będą decydowały o rozwoju tej problematyki naukowej. Jednym z nich są poszukiwania nowych dróg sygnalizacji i nowej roli biologicznej cząsteczek sygnałowych, drugim – wykorzystanie znajomości mechanizmów sygnalizacji do terapii wielu chorób. Przykładów poszukiwań w zakresie mechanizmów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej jest bardzo dużo. Między innymi bada się nadal udział białek wielodomenowych w czasowej i przestrzennej koordynacji wybranych szlaków sygnałowych. Typowym przykładem są doświadczenia nad rolą białek dokujących w regulacji aktywności kaskad enzymatycznych (np. kaskady kinaz MAP). Intensywnie prowadzone są też poszukiwania nowych funkcji znanych białek sygnalizacyjnych, np. kinazy AMP (AMPK) w inhibicji aktywności mTOR, oraz udział cząsteczek sygnałowych (m.in. wymienionych już AMPK i mTOR) w regulacji funkcji mitochondriów i procesach starzenia. Badana jest również rola receptorów GPCR w przekazywaniu sygnału przez neurotransmitery (np. serotoninę) i wykorzystanie znajomości mechanizmów sygnalizacji w kontroli zaburzeń centralnego układu nerwowego. Podobnie sprawdza się znaczenie cząsteczek pośredniczących w sygnalizacji inicjowanej neurotrofinami w rozwoju nowych, bardziej skutecznych leków antydepresyjnych. Nowe koncepcje terapii chorób niedokrwiennych stymulują badania nad interakcją czynników wzrostowych i ich receptorów (np. Ang2–Tie2) w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych.

Wiele laboratoriów na całym świecie zajmuje się dysfunkcją szlaków sygnalizacyjnych w chorobach hiperproliferacyjnych. Poczynając od udziału naturalnych inhibitorów w regulacji sygnału mitogennego, przez badania roli kinaz i fosfataz w regulacji wzrostu prawidłowego i neoplastycznego, do poszukiwań swoistych inhibitorów szlaków mitogennych. Uzasadnioną nadzieję w leczeniu chorób nowotworowych budzą związki, które hamują aktywność kinaz białkowych i/lub cząsteczek pośredniczących w przekazaniu sygnału z udziałem tych enzymów. Nowe związki blokujące aktywację kinaz białkowych zostały już wprowadzone do terapii przeciwnowotworowej lub są w trakcie badań klinicznych (przeciwciała monoklonalne, inhibitory kinaz). Dyskutowana jest także rola cytokin oraz sygnalizacji Jak-STAT w patogenezie nowotworów.

Ponieważ regulowane zewnątrzkomórkowo procesy metaboliczne organizmów wielokomórkowych są bezwzględnie zależne od prawidłowo funkcjonujących dróg sygnalizacji, jest rzeczą oczywistą, że dokładne ich poznanie pomoże w wyjaśnieniu wielu zjawisk patologicznych. Wiadomo dziś, że ogromna liczba chorób wynika z mutacji, zmienionej ekspresji lub upośledzonej funkcji białek przenoszących informację. Udowodniono, że zmiany w strukturze i/lub poziomie nośników informacji hormonalnej, ich receptorów komórkowych oraz pośredników przenoszących informację do efektorów wewnątrzkomórkowych są odpowiedzialne za rozregulowanie wielu procesów fizjologicznych. Dlatego praca nad wszystkimi aspektami sygnalizacji między- i wewnątrzkomórkowej wzbogaca nie tylko naszą wiedzę, lecz budzi zrozumiałe nadzieje na jej praktyczne zastosowanie, głównie w medycynie i farmacji.

Literatura uzupełniająca

- Brown M.D., Sacks D.B. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell. Signal.* 2009, 21, 462–469.
- Gotoh N. Feedback inhibitors of the epidermal growth factor receptor signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009, 41, 511–515.
- Grant S.K. Therapeutic protein kinase inhibitors. *Cell Mol. Life Sci.* 2009, 66, 1163–1177.
- Jo C., Jang B.G., Jo S.A. MEK1 plays contrary stage-specific roles in skeletal myogenic differentiation. *Cell. Signal.* 2009, 21, 1910–1917.
- Lievre A., Laurent P. Molecular predictors of response to EGFR antibodies in colorectal cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 2009, 5, 57–63.
- Memmott R.M., Dennis P.A. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell. Signal.* 2009, 21, 656–664.
- Millan M.J., Marin P., Bockaert J., Mannoury la Cour C. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008, 29, 454–464.
- O’Sullivan L.A., Liongue C., Lewis R.S., Stephenson S.E.M., Ward A.C. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol. Immunol.* 2007, 44, 2497–2506.
- Ren J.-I., Pan J.-S., Lu Y.-P., Sun P., Han J. Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cell. Signal.* 2009, 21, 378–383.
- Schmidt H.D., Banasr M., Duman R.S. Future antidepressant targets: neurotrophic factors and related signaling cascades. *Drug Disc. Today: Therapeutic Strategies* 2008, 5, 151–156.
- Shu K.-G. Enhancement of new vessel formation by Angiopoietin-2/Tie2 signaling in endothelial progenitor cells: A new hope for future therapy? *Cardiovascul. Res.* 2006, 72, 359–360.
- Vainchenker W., Dusa A., Constantinescu S.N. JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008, 19, 385–393.
- Wagner K.-U., Rui H. Jak2/Stat5 signaling in mammaryogenesis, breast cancer initiation and progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2008, 13, 93–103.
- Weroha S.J., Haluska P. IGF-1 receptor inhibitors in clinical trials – early lessons. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2008, 13, 471–483.
- Wilks A.F. The Jak kinases: Not just another kinase drug discovery target. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008, 19, 319–328.
- Yi T., Lindner D. The role and target potential of protein tyrosine phosphatases in cancer. *Curr. Oncol. Rep.* 2008, 10, 114–121.
- Zhao J., Guan J.-L. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009, 28, 35–49.

Indeks

- acetylotransferaza histonów 32, 34, 163, 203
- ADAM *zob.* enzymy o aktywności dezintegryn i metaloproteinaz
- AKAP *zob.* białka dokujące
- Akt *zob.* kinaza białkowa B (kinaza Akt)
- amfiregulina 22, 46
- AMPK *zob.* kinaza aktywowana AMP
- aneksyny 48, 149, 151
- AP *zob.* białka AP
- AP-1 *zob.* czynnik transkrypcyjny AP-1
- Apaf *zob.* czynnik aktywujący proteazy apoptotyczne
- apoptosom 217
- apoptoza 61, 111, 119, 147, 162, 169, 215, 216, 217, 218, 219
drogi sygnalizacji zewnętrznej i wewnętrznej 215, 216, 217
rola białek Bcl-2 175, 176, 216, 217, 218
tworzenie kanałów w błonie mitochondrialnej 175, 176
- AR *zob.* amfiregulina
- ARE *zob.* element odpowiadający na aktywinę
- artemina 22, 46, 68
- ARTN *zob.* artemina
- ATP-aza wapniowa retikulum sarko/endoplazmatycznego 147, 148
- autofosforylacja receptorów 47, 48, 96, 183
- Bad *zob.* białka Bcl-2
- Bak *zob.* białka Bcl-2
- BAMBI *zob.* inhibitor błonowego receptora BMP i aktywin
- Bax *zob.* białka Bcl-2
- Bcl-2 *zob.* białka Bcl-2
- Bcl-W *zob.* białka Bcl-2
- Bcl-X_L *zob.* białka Bcl-2
- BDGF *zob.* czynnik wzrostowy pochodzący z mózgu
- betacellulina 22
- bHLHLZip *zob.* palec cynkowy 171, 182, 183, 185, 188, 189, 190, 192, 207, 211
- białka 14-3-3 79, 83, 116, 117, 133
- białka adaptorowe 37, 42, 47, 48, 57, 60, 75, 77, 81, 125
- białka AP 37
- białka Bcl-2 83, 111, 169, 172, 174, 175, 176, 182, 217, 218, 219
- białka dokujące 75, 76, 85, 86, 116, 200
- białka dokujące JIP 85, 86
- białka dokujące Yatiao 85
- białka DP 163, 189
- białka G 29, 42, 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 100, 101, 115, 130, 142, 184, 213, 221
- białka kieszeniowe 163, 189
- białka morfogenetyczne kości 50
- białka mTOR 108, 123, 124, 125, 126, 127, 182, 184, 190, 223
białka TSC 126
budowa domenowa 124
integracja sygnałów wewnątrzkomórkowych 125, 126
kompleksy C1 i C2 125
układy efektorowe 125, 126
- białka pomocnicze receptorów IL-1 i IL-18 57
- białka Ras 48, 55, 82, 89, 94, 95, 96, 97, 116, 117, 133, 143, 182, 183, 191, 212
białka efektorowe 98
mechanizm aktywacji 96
prenylacja 95
RASGRP 97
rodzina 95
- białka Rho/Rac 99
- białka Smad 51, 81, 84, 153, 157, 200, 201, 202, 203, 204, 222
aktywacja 157, 158, 202
budowa 157
domeny MH 157, 158
rodzaje 157

- białka STAT 54, 84, 120, 131, 153, 155, 156, 162, 192, 193, 207, 208, 209, 210, 211, 222, 223
budowa domenowa 156
fosforylacja 131
rodzina 155
translokacja do jądra 131
udział w sygnalizacji cytokin 208, 210, 211
- białka stwardnienia guzowatego 125, 126, 127
- białka wiążące JNK 85, 86
- białka wiążące wapń 148, 149, 150, 151
- białko 2 podobne do receptora IL-1 57, 213
- białko adaptorowe związane z receptorem
czynnika wzrostu 48, 55, 76, 81, 83, 96, 125, 182, 183, 185, 193, 190, 192, 194, 207, 212
- białko aktywujące GTP-azę 47, 48, 89, 90, 93, 99, 117, 190
- białko erytroblastomy B 38, 46, 48, 49, 70, 193
- białko homologiczne z Src 48, 77, 82, 182, 183, 185, 190, 192, 193
- białko oddziałujące z receptorem Toll 212, 213
- białko p53 103, 104, 120, 121, 122, 153, 164, 165, 174, 191, 203
aktywność 165, 166
białko MDM2 165
budowa domenowa 164
rodzina 165
- białko rybosomowe S6 125, 126, 128, 161, 182, 184
- białko wiążące czynnik elongacyjny 4E 125, 126, 127, 182, 184
- białko wiążące element odpowiadający na cAMP 203
- białko wiążące LAP 198, 199
- białko z domeną śmierci asocjujące z receptorem Fas 60, 79, 84, 171, 217
- białko z domeną śmierci asocjujące z receptorem TNF 60, 79, 84, 171, 217
- białko zasocjowane z domeną transaktywacji/transformacji 162, 163
- białkowy inhibitor aktywnych STAT 157, 209, 211
- Bid *zob.* białka Bcl-2
- Bik *zob.* białka Bcl-2
- Bim *zob.* białka Bcl-2
- BMPs *zob.* białka morfogenetyczne kości
- BTC *zob.* betacellulina
- CA *zob.* cyklaza adenylanowa
- CAKs *zob.* kinazy adhezji komórkowej
- CARD *zob.* domeny wiążące kaspazy
- cdk *zob.* kinazy cyklozależne
- CKI *zob.* inhibitory kinaz cyklozależnych
- CRE *zob.* element odpowiadający na cAMP
- CREB *zob.* białko wiążące element odpowiadający na cAMP
- CSF *zob.* czynnik stymulujący wzrost kolonii
- cyklaza adenylanowa 51, 91, 92, 93, 98, 100, 150, 184, 185, 202
aktywatory 92, 150, 184, 202
izoformy 100, 101
lokalizacja komórkowa 101
- cyklaza guanylanowa 44, 52, 101, 102, 114, 150
aktywatory 44, 102, 114, 150
izoformy 101, 102
- cyklazy nukleotydowe 100
- czynnik 88 różnicowania komórek mieloidalnych 57, 58, 79, 212, 213
- czynnik aktywujący proteazy apoptotyczne 171, 174, 218
- czynnik asocjujący z receptorem TNF 57, 76, 171, 212
- czynnik martwicy nowotworu 22, 24, 58, 59, 60, 64, 103, 215, 216, 217, 219
- czynnik stymulujący wzrost kolonii 21, 22, 24, 45, 46, 187, 188, 208
- czynnik transkrypcyjny AP-1 58, 70, 103, 104, 117, 120, 153, 158, 161, 162
- czynnik transkrypcyjny Myc 120, 133, 153, 162, 163, 185, 190, 191, 192, 193
homo- i heterodimeryzacja 162
regulacja aktywności 162, 163
- czynnik transkrypcyjny NF-AT 154, 155, 158, 159, 162
- czynnik transkrypcyjny NF-κB 59, 154, 155
- czynnik wzrostowy naczyń i komórek endotelialnych 21, 22, 45, 65, 66, 187, 188, 200
- czynnik wzrostowy pochodzący z gleju 22, 46, 65, 66, 68, 188
- czynnik wzrostowy pochodzący z mózgu 22, 46
- czynnik wzrostu hepatocytów 21, 22, 24, 45, 46, 164, 187, 188, 197

- czynnik wzrostu nerwu 22, 29, 45, 46, 58, 82, 187, 188
- czynniki aktywujące transkrypcję 34, 153
- czynniki natriuretyczne 21, 52
- czynniki stymulujące wymianę nukleotydów guaninowych 48, 82, 83, 90, 92, 96, 97, 116, 117, 182, 183, 185, 192, 195
- czynniki transkrypcyjne E2F 120, 163, 174, 189
- czynniki wzrostu i różnicowania 50, 197, 199
- DAG *zob.* diacylglicerol
- DBD *zob.* domena wiążąca DNA
- DD *zob.* domeny śmierci
- DDR1/2 *zob.* receptory z domeną „discodin”
deacetylaza histonów 203
- DED *zob.* efektorowe domeny śmierci
- DGEA *zob.* sekwencja rozpoznawana przez integriny w kolagenie I
- diacylglicerol 14, 80, 92, 97, 98, 112, 113, 144, 192
- dimeryzacja receptorów 47, 69, 96, 162, 194, 213
- DISC *zob.* kompleks sygnałowy indukujący apoptozę
- domena kinazy serynowo-treoninowej 112
- domena kinazy tyrozynowej 66
- domena wiążąca DNA 33, 165
- domena wiążąca fosfotyrozynę 70, 76, 77, 78, 79, 82, 83, 86, 130, 190, 207, 221
- domena wspólna dla receptorów Toll i IL-1 56, 57, 58, 213
- domeny FYVE 76, 80, 81, 84, 221
- domeny PDZ 44, 76, 77, 78, 79, 142, 143, 221
- domeny PX 76, 80
- domeny SH2 47, 48, 53, 70, 76, 77, 78, 80, 81, 82, 83, 84, 96, 99, 129, 130, 131, 132, 133, 140, 142, 144, 145, 156, 190, 207, 208, 211, 221
- domeny SH3 53, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 86, 96, 129, 132, 133, 142, 144, 156, 161, 190, 195, 221
- domeny śmierci 58, 59, 60, 76, 79, 80, 84, 213, 216, 217
- domeny TIM 58, 59
- domeny wiążące kaspazy 79, 80, 171, 173
- domeny WW 76, 77, 78, 79, 157, 221
- DP *zob.* białka DP
- duże białka G 90, 91, 92, 93
aktywacja i dezaktywacja 93
izoformy 91, 92
podjednostki 90, 91
układy efektorowe 91
- dynaminy 37
- 4E-BP *zob.* białko wiążące czynnik elongacyjny 4E
- E2F *zob.* czynniki transkrypcyjne E2F
efektorowe domeny śmierci 76, 79, 80, 84, 171, 217, 219
- EGF *zob.* naskórkowy czynnik wzrostowy
element (sekwencja) wiążący białka Smad 201, 202
- element (wiązący) odpowiadający na aktywinę 162, 203
- element (wiązący) odpowiadający na cAMP 162, 201, 203
- element (wiązący) odpowiadający na hormon 32, 33, 34
- endocytoza zależna od receptorów 29, 36, 38, 63
- enzymy o aktywności dezintegryny i metaloproteinaz 62, 64, 160, 192, 193
- epiregulina 22, 46
- EPO *zob.* erytropoetyna
- ER *zob.* epiregulina
- ErbB *zob.* białko erytroblastomy B
- Erk *zob.* kinaza odpowiadająca na sygnał zewnątrzkomórkowy
- erytropoetyna 21, 22, 116, 187, 208
- FADD *zob.* białko z domeną śmierci asocjującą z receptorem Fas
- FG *zob.* fosforylaza glikogenu
- FGF *zob.* fibroblastyczny czynnik wzrostowy
fibroblastyczny czynnik wzrostowy 21, 22, 45, 46, 65, 67, 187, 188
- FLIP *zob.* inhibitor kaspazy 8
- fosfataza białkowa 1 85, 86, 137, 138, 139, 183, 184, 185, 186

- fosfataza homologiczna z tensyną 125, 126, 140, 141, 143
- fosfatazy białkowe 137
- fosfatazy cdc25 119, 120, 137, 139, 140, 141, 142, 163, 189
- fosfatazy o podwójnej swoistości 140, 141
- fosfatazy serynowo-treoninowe 137, 138, 139
budowa podjednostkowa 138
kompleksy enzymatyczne 138, 139
rodziny 138
- fosfatazy tyrozynowe 139, 140, 141
o podwójnej swoistości 140, 141
rodziny 140
- fosfatazy zawierające domeny SH2 132, 157, 190, 209, 211
- fosfatydyloinozytole 80, 141, 143
- fosfoinozytydy 77, 80, 82, 112, 141, 144
- fosfolipaza A₂ 91, 92, 117, 151, 172
- fosfolipaza C 80, 82, 91, 92, 93, 94, 98, 99, 143, 144, 145, 147
izoformy 143, 144
substraty i produkty 144, 145
- fosforoliza glikogenu 181, 184, 186
- fosforylaza glikogenu 185
- FYVE *zob.* domeny FYVE
- GAP *zob.* białko aktywujące GTP-azę
- GDF *zob.* czynniki wzrostu i różnicowania
- GDNF *zob.* czynnik wzrostowy pochodzący z gleju
- GEFs *zob.* czynniki stymulujące wymianę nukleotydów guaninowych
- glipikany 65, 66
- GPCR (R7G) *zob.* receptor sprzężony z białkami G
- GPRP *zob.* sekwencja rozpoznawana przez integryny w fibrynogenie
- Grb2 *zob.* białko adaptorowe związane z receptorem czynnika wzrostu
- GRF *zob.* koreceptory kinazy Ret
- GS *zob.* syntaza glikogenu
- GSK-3 *zob.* kinaza syntazy glikogenu 3
- GTFs *zob.* podstawowe czynniki transkrypcyjne z rodziny TFII
- HAT *zob.* acetylotransferaza histonów
- HDAC *zob.* deacetylaza histonów
- heregulina 46
- heterodimeryzacja receptorów 69, 162, 202
- HGF *zob.* czynnik wzrostu hepatocytów
- homodimeryzacja receptorów 69
- HR *zob.* heregulina
- HRE *zob.* element odpowiadający na hormon
- Hrk *zob.* białka Bcl-2
- IAPs *zob.* inhibitory apoptozy
- IGF *zob.* insulinopodobny czynnik wzrostowy
- IL *zob.* interleukina
- IL-1RAcP/IL-18RAcP *zob.* białka pomocnicze receptorów IL-1 i IL-18
- IL-1Rp2 *zob.* białko 2 podobne do receptora IL-1
- indeks 225
- inhibitor błonowego receptora BMP i aktywin 50, 61, 201, 204
- inhibitor kaspazy 8 217, 219
- inhibitory apoptozy 172, 173, 217
- inhibitory kinaz cyklozależnych 119, 120, 121, 122
inhibitory Cip/Kip 119, 120, 121
inhibitory INK4 120, 121, 122
- inozytolo-1,4,5-trifosforan 14, 92, 114, 144, 147, 151
- insulinopodobny czynnik wzrostowy 22, 45, 46, 188, 190
- integryny 54, 55, 56, 129, 200
- interleukina 22, 24, 53, 56, 57, 58, 61, 64, 65, 66, 77, 103, 131, 207, 209, 211, 212, 213
- IP₃ *zob.* inozytolo-1,4,5-trifosforan
- IRAK *zob.* kinaza zasocjowana z IL-1
- IRS *zob.* substrat receptora insuliny
- Jak *zob.* kinazy Janusa
- JIP *zob.* białka dokujące
- JNK/SAPK *zob.* kinaza białkowa c-jun N-końcowa/aktywowana stresem
- kalmodulina 101, 128, 149, 150, 151, 184, 186
- kanał jonowy regulowany napięciem 147, 148

- kanal wapniowy regulowany sygnałem 147, 148
- kaskady kinaz MAP *zob.* kinazy aktywowane miogenami
- kaspazy 79, 169, 170, 171, 173, 174, 217, 218, 219
przedstawiciele 171
swoistość substratowa 170, 171, 172
właściwości 171
- kaweole 37
- KFG *zob.* kinaza fosforylasy glikogenu
- kinaza 3-fosfoinozytydów (fosfatydylo-3-inozytoli) 48, 68, 80, 83, 84, 94, 98, 99, 110, 111, 125, 126, 133, 141, 142, 143, 182, 183, 184, 185, 190, 192, 193, 203, 221
izoformy 142
klasy 142
substraty 143
- kinaza aktywowana (zależna od) AMP 125, 126, 223
- kinaza aktywowana zewnątrzkomórkowo 85, 115, 116, 182, 185, 191, 192, 193
- kinaza białka S6 182, 184, 203
- kinaza białkowa A 25, 86, 87, 93, 103, 107, 108, 109, 110, 116, 117, 159, 184, 185, 186, 221
aktywacja 109
budowa 108, 109
podjednostki 109
- kinaza białkowa B (kinaza Akt) 51, 99, 103, 104, 110, 111, 126, 143, 182, 183, 202
budowa 111
izoformy 111
mechanizm aktywacji 110
substraty 111
- kinaza białkowa C 86, 93, 107, 108, 111, 112, 113, 127, 149, 151, 172, 192, 193, 203
budowa domenowa 112
izoformy 112
mechanizm aktywacji 112, 113
rodzina 112, 113
- kinaza białkowa c-jun N-końcowa/aktywowana stresem 86, 115, 116, 117, 184, 203, 213
- kinaza białkowa G 103, 107, 108, 114, 115
izoformy 114
udział w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej 114, 115
- kinaza fosforylasy glikogenu 184, 185, 186
- kinaza odpowiadająca na sygnał zewnątrzkomórkowy 85, 86, 87, 115, 116, 161, 182, 184, 185, 192, 193, 203
- kinaza Raf 85, 98, 111, 115, 116, 117, 172, 182, 185, 192
- kinaza Ret (RET) 46, 66, 68, 133
- kinaza syntazy glikogenu 3 111, 143, 161, 181, 182, 183, 185
- kinaza zależna od fosfatydyloinozytoli (1) 81, 108, 111, 126, 182, 183, 184, 190
- kinaza zasocjowana z IL-1 57, 107, 212, 213
- kinazy Abl 55, 107, 129, 133, 134, 155, 166, 222
- kinazy adhezji komórkowej 129, 172
- kinazy aktywowane mitogenami 85, 87, 98, 99, 115, 116, 117, 179, 182, 191, 201, 207, 212, 213, 221, 223
- kinazy Aurora 118, 120, 122, 123, 173, 188
- kinazy białkowe AGC 108
- kinazy białkowe zależne od Ca²⁺/kalmoduliny 127
- kinazy cyklinozależne 108, 118, 119, 120, 121, 122, 126, 137, 141, 189, 192
regulacja aktywności 119, 122
regulacja cyklu komórkowego 120, 121
rodzaje cyklin 119, 120
rodzina kinaz cdk 121
- kinazy Janusa 54, 70, 129, 130, 157, 192, 207, 208, 209, 210, 211, 223
aktywacja 129, 130, 157, 209
budowa 129, 130
fosforylacja białek STAT 131
- kinazy Nrk 118, 123
- kinazy serynowo-treoninowe 49, 52, 93, 107, 108, 115
- kinazy Src 34, 47, 48, 51, 53, 76, 82, 107, 129, 131, 132, 133, 155, 162, 192, 193, 207, 222
mechanizm aktywacji 132
rodzina kinaz Src 131
- kinazy tyrozynowe 34, 35, 45, 51, 52, 55, 84, 98, 99, 107, 128, 129, 144, 155, 172, 189, 193, 194, 207
- kompleks sygnałowy indukujący apoptozę 28, 216, 217
- koreceptory 65, 66
- koreceptory kinazy Ret 66
- LAP *zob.* peptyd zapewniający latencję TGFβ
- leukotrieny 16, 17, 18, 19, 20

- ligand indukujący apoptozę TNF-podobną 29, 58, 59, 215
- ligandy receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej 46
- lokalizacja receptorów wewnątrzkomórkowych 31
- LT *zob.* leukotrieny
- LTBP *zob.* białko wiążące LAP
- MAPK *zob.* kinazy aktywowane mitogenami
- MEK *zob.* kinaza aktywowana zewnątrzkomórkowo
- motyw dłoni EF 144, 149, 150
- motyw Geisowa 149, 151
- mTOR *zob.* białka mTOR
- Myc *zob.* czynnik transkrypcyjny Myc
- MyD88 *zob.* czynnik 88 różnicowania komórek mieloidalnych
- nAChR *zob.* nikotynowy receptor acetylocholin
- naskórkowy czynnik wzrostowy 21, 22, 29, 38, 45, 46, 47, 48, 65, 69, 70, 82, 187, 188, 189, 192, 193, 197, 221
- neurytyna 68
- NF-AT *zob.* czynnik transkrypcyjny NF-AT
- NGF *zob.* czynnik wzrostu nerwu
- NICD *zob.* wewnątrzkomórkowa domena białka Notch
- nikotynowy receptor acetylocholin 40, 41
- NLS *zob.* sekwencja lokalizacji jądrowej
- NMDA *zob.* receptor asparagianu
- NO *zob.* tlenek azotu
- NP *zob.* peptydy natriuretyczne (sodopędne)
- NRTN *zob.* neurytyna
- P70S6K *zob.* kinaza białka S6
- palec cynkowy 80, 84, 153
- PDGF *zob.* płytkopochodny czynnik wzrostowy
- PKD1 *zob.* kinaza zależna od fosfatydyloinozytoli (1)
- PDZ *zob.* domeny PDZ
- peptyd zapewniający latencję TGFβ 103, 197, 198, 199, 200
- peptydy natriuretyczne (sodopędne) 52
- PG *zob.* prostaglandyny
- PI3K *zob.* kinaza 3-fosfoinozytydów (fosfatydylo-3-inozytoli)
- PIAS *zob.* białkowy inhibitor aktywnych STAT
- PKA *zob.* kinaza białkowa A
- PKB *zob.* kinaza białkowa B (kinaza Akt)
- PKC *zob.* kinaza białkowa C
- PKG *zob.* kinaza białkowa G
- PLA₂ *zob.* fosfolipaza A₂
- PLC *zob.* fosfolipaza C
- plejotropia sygnału 21, 24, 48, 193
- płytkopochodny czynnik wzrostowy 21, 22, 24, 45, 46, 81, 82, 187, 188, 189, 197, 200
- PMCA *zob.* pompa wapniowa błony plazmatycznej
- podstawowe czynniki transkrypcyjne z rodziny TFII 34, 118, 153, 163
- polokinazy 122
- pompa wapniowa błony plazmatycznej 147
- PP1 *zob.* fosfataza białkowa 1
- prostaglandyny 17, 18, 19, 20, 30
- PTB *zob.* domena wiążąca fosfotyrozynę
- PTEN *zob.* fosfataza homologiczna z tensyną
- PX *zob.* domeny PX
- R7G (GPCR) *zob.* receptor sprzężony z białkami G
- Raf *zob.* kinaza Raf
- Ras *zob.* białka Ras
- receptor asparagianu 41, 42
- receptor podobny do białka Toll 58
- receptor sprzężony z białkami G 16, 42, 43, 44, 56, 83, 85, 89, 90, 93, 94, 98, 133, 147, 148, 192, 193, 221, 223
- receptory angiopoetyn 45, 46
- receptory cytokin 53, 54, 70, 130, 207, 208, 210, 211, 213
- sygnalizacja Jak → STAT 208
- sygnał inicjowany IL-1 213
- upośledzenia przekazu sygnału 210, 211

- receptory integrynowe 54, 55, 56, 129, 200
- receptory jądrowe (wewnątrzkomórkowe) 9, 27, 30, 31, 32, 33, 34
- receptory jonotropowe 35, 39, 40, 41, 70
- receptory Notch 29, 61, 62, 63, 160, 222
- receptory o aktywności cykazy guanylanowej 52, 102
- receptory o aktywności enzymatycznej 44
- receptory o aktywności fosfatazy tyrozynowej 44, 51, 139, 140
- receptory o aktywności kinazy tyrozynowej 23, 24, 38, 45, 47, 48, 49, 52, 53, 70, 96, 97, 143, 145, 147, 148, 158, 159, 182, 188, 194
- receptory sieroce 30, 31, 32, 44, 45
- receptory superrodziny TGF β 44, 50, 51, 65, 66, 84, 158, 198, 200, 201, 202, 204
- receptory superrodziny TNF 24, 58, 59, 60, 216, 217
- receptory typu „cargo” 27, 28, 37
- receptory z domeną „discodin” 46, 49
- recyklizacja (recyrkulacja) receptorów błonowych 28, 36, 37, 38, 39
- redundancja 24
- RET *zob.* kinaza Ret (RET)
- RGD *zob.* sekwencja rozpoznawana przez integryny w fibronektynie
- RPTP *zob.* receptory o aktywności fosfatazy tyrozynowej
- RTK *zob.* receptory o aktywności kinazy tyrozynowej
- S6 *zob.* białko rybosomowe S6
- SBE *zob.* element (sekwencja) wiążący białka Smad
- sekwencja lokalizacji jądrowej 32, 33, 151, 156, 164, 166
- sekwencja rozpoznawana przez integryny w fibronektynie 56
- sekwencja rozpoznawana przez integryny w fibrynogenie 56
- sekwencja rozpoznawana przez integryny w kolagenie I 56
- SERCA *zob.* ATP-aza wapniowa retikulum sarko/endoplazmatycznego
- SRCE *zob.* kanał wapniowy regulowany sygnałem
- SH2 *zob.* domeny SH2
- SH3 *zob.* domeny SH3
- Shc *zob.* białko homologiczne z Src
- SHP *zob.* fosfatazy zawierające domeny SH2
- Smad *zob.* białka Smad
- SOCs *zob.* supresory sygnalizacji inicjowanej cytokinami
- STAT *zob.* białka STAT
- substrat receptora insuliny 48, 77, 82, 83, 111, 182, 183, 185, 190
- supresory sygnalizacji inicjowanej cytokinami 157, 209, 211
- surwiwina 173, 174
- syndekany 65, 66
- syntaza glikogenu 113, 182, 183
- TAFs *zob.* czynniki aktywujące transkrypcję
- TFII *zob.* podstawowe czynniki transkrypcyjne z rodziny TFII
- TGF α *zob.* transformujący czynnik wzrostowy typu α
- TGF β *zob.* transformujący czynnik wzrostowy typu β
- TGF β R *zob.* receptory superrodziny TGF β
- TIE *zob.* receptory angiopoetyn
- TIM *zob.* domeny TIM
- TIR *zob.* domena wspólna dla receptorów Toll i IL-1
- tlenek azotu 101, 102, 103, 104, 114
- TLR *zob.* receptor podobny do białka Toll
- TNF *zob.* czynnik martwicy nowotworu
- Tollip *zob.* białko oddziałujące z receptorem Toll
- TPO *zob.* trombopoetyna
- TRADD *zob.* białko z domeną śmierci asocjujące z receptorem TNF
- TRAF *zob.* czynnik asocjujący z receptorem TNF
- TRAIL *zob.* ligand indukujący apoptozę TNF-podobną
- transformujący czynnik wzrostowy typu α 22, 38, 46, 69, 164, 197

- transformujący czynnik wzrostowy typu β 22, 23, 44, 49, 50, 51, 84, 103, 120, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204
aktywność biologiczna 23, 203
magazynowanie 24
mechanizmy aktywacji receptora TGF β 51, 197, 200, 201, 202, 203, 204
regulowana Smad ekspresja genów 84, 158, 202
synteza 197, 198
uwalnianie form dojrziałych 198, 199, 200
- tratwy lipidowe 37
- tromboksany 16, 17, 18
- trombopoetyna 21, 22, 187, 208
- TRRAP *zob.* białko zasocjowane z domeną transaktywacji/transformacji
- TSC1/2 *zob.* białka stwardnienia guzowego
- Tx *zob.* tromboksany
- typy receptorów błonowych 35
- typy receptorów cytokin 24, 53, 56
- typy receptorów GPCR 43
- VEGF *zob.* czynnik wzrostowy naczyńiowych komórek endotelialnych
- wewnątrzkomórkowa domena białka Notch 61, 62, 63, 153, 160
- WW *zob.* domeny WW
- wymiennik jonowy Na/Ca (NCX) 147, 148

Redaktor	<i>Dorota Węgierska</i>
Korekta	<i>Barbara Cabala</i>
Skład i łamanie	<i>Jerzy Najder</i>

Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego
Redakcja: ul. Michałowskiego 9/2, 31-126 Kraków
tel. 12-631-18-80, 12-631-18-82, fax 12-631-18-83