

Rozdział 6

Przekazywanie sygnałów w komórce

¹Jolanta Barańska, ²Irena Nalepa

¹Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marceliego Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, email: j.baranska@nencki.gov.pl ²Instytut Farmakologii PAN, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków, email: nfnalepa@cyf-kr.edu.pl

Wprowadzenie + Receptory, rys historyczny, ogólna charakterystyka + Receptory metabotropowe sprzężone z białkami G + Białka G, historia odkrycia, budowa i funkcje + Udział lipidów w przekazywaniu sygnałów + Udział jonów wapnia w sygnalizacji komórkowej + Tlenek azotu a przekazywanie sygnałów w komórce + Receptory jonotropowe + Receptory z wewnętrzną, enzymatyczną aktywnością kinaz + Zaburzenia przepływu informacji a stany chorobowe i farmakoterapia + Uwagi końcowe

Wprowadzenie

Wielokomórkowe organizmy wyższe składają się ze współpracujących ze sobą licznych zespołów komórek. Izolowane z nich pojedyncze komórki są zdolne po dostarczeniu odpowiednich substancji odżywczych do wzrostu i podziału. Hodowla komórek jest obecnie niezwykle popularną metodą, szeroko stosowaną we wszystkich laboratoriach na świecie. Metoda ta ułatwia poznanie wielu procesów metabolicznych oraz zrozumienie mechanizmów odpowiedzi komórki na działające na nią różnorodne, zewnętrzne bodźce. Mechanizm tych odpowiedzi nie jest prosty, bowiem każda żywa komórka jest ograniczona błoną plazmatyczną. Struktura wszystkich błon jest podobna – zbudowane są z dwuwarstwy lipidowej, która służy jako selektywna bariera przepuszczalności pomiędzy komórką a otaczającą ją macierzą pozakomórkową. Niektóre związki chemiczne, jak np. hormony steroidowe mają charakter cząsteczek hydrofobowych i dzięki temu mogą bez trudu przechodzić przez błonę plazmatyczną. Jednak większość hormonów, neuroprzekazników, cytokin, czy antygenów wpływających i regulujących

aktywność komórki to substancje hydrofilowe. Nie mają one możliwości swobodnego wniknięcia do jej wnętrza. W lipidowej strukturze dwuwarstwy błony plazmatycznej znajdują się jednak liczne białka transbłonowe. Są one zdolne wiązać docierające od strony zewnętrznej błony białka, peptydy, czy inne cząsteczki rozpuszczalne w wodzie. To wiązanie wykrywa sygnał, przekazuje informację przez błonę plazmatyczną i inicjuje kaskadę reakcji (kaskadę sygnałów) we wnętrzu komórki, indukując zmiany prowadzące do podziału czy różnicowania. Wspecjalizowane białka pełniące taką funkcję nazywamy receptorami a działające na nie związki chemiczne - substancjami sygnałowymi, ligandami, czy agonistami.

Choć już na początku XX wieku sugerowano występowanie na powierzchni komórek określonych struktur nazwanych receptorami, wiele lat wymagało poznanie ich budowy i zrozumienie roli, jaką odgrywają w odpowiedzi komórki na działający na nią określony sygnał. W obecnym opracowaniu pragniemy przedstawić oddziaływania substancji sygnałowych z receptorami błon plazmatycznych, występującymi w komórkach organizmów zwierzęcych. W wielu przypadkach pobudzenie receptora przez agonistę inicjuje w tych komórkach aktywację białek efektorowych, takich jak kanały jonowe czy enzymy. Ich aktywacja indukuje syntezę kolejnych związków, tzw. wtórnych przekaźników informacji. Powodują one kaskadę następujących po sobie reakcji regulujących w efekcie rozliczne funkcje komórki. W większości przypadków przepływ informacji od receptora przez efektor do wtórnego przekaźnika informacji odbywa się za pośrednictwem kilku uniwersalnych mechanizmów. Ich odkrycie nastąpiło w drugiej połowie XX wieku. W niniejszym rozdziale pragniemy opisać te odkrycia, osiągnięcia nauki światowej, choć każdy miesiąc przynosi nowe obserwacje w tak burzliwie rozwijającej się gałęzi wiedzy.

Tematyka, którą się zajmujemy ma nie tylko istotny aspekt poznawczy, lecz także praktyczny, bowiem współczesna farmakoterapia, jak np. leczenie uzależnień w psychiatrii, czy chemioterapia w onkologii opierają się w dużej mierze na wiedzy związanej z problematyką przekazywania sygnałów w komórce.

Receptory, rys historyczny, ogólna charakterystyka

Każda pojedyncza komórka odpowiada na działające na nią różnorodne sygnały, takie jak hormony, neuroprzekaźniki, czynniki wzrostu, antygeny, substancje zapachowe, kwanty świetlne czy bodźce czuciowe. Już na początku XX wieku stało się oczywiste, że w błonie plazmatycznej muszą znajdować się określone struktury, mające zdolność precyzyjnego rozpoznawania sygnałów i określonej na nie odpowiedzi. Paul Erlich wprowadził w 1906 r. pojęcie receptora jako miejsca, do którego chemicznie łączą się leki i postulował, że integracja między receptorem a oddziałującym na niego związkiem zachodzi na zasadzie klucza pasującego do zamka (z ang.: „Lock and Key” theory). Hipoteza ta okazała się prawdziwa i obowiązuje do dnia dzisiejszego. Ponadto, hipoteza „klucza i zamka” w genialny sposób pokazuje, że utworzenie kompleksu ligand – receptor może zmieniać konformację receptora, tak jak to czyni przekręcenie klucza w zamku i powodować przez to określony efekt. Jednak wykazanie, że receptory są strukturami białkowymi, a także wyjaśnienie, na czym polega oddziaływanie z nimi substancji sygnałowych pozostawało przez wiele lat tajemnicą. Było to spowodowane brakiem odpowiednio rozwiniętych metod badawczych pierwszej połowy XX wieku. Wyizolowanie i badanie struktury białek receptorowych napotykało wielkie trudności, bowiem występują one w bardzo małych ilościach, pikomolach na mg ogólnej zawartości białka. Dopiero druga połowa XX wieku, dzięki powstaniu nowoczesnych technik biologii molekularnej, takich jak klonowanie, sterowana mutageneza, stosowanie techniki chromatografii powinowactwa czy wyspecjalizowanych metod elektrofizjologicznych doprowadziła do burzliwego rozwoju nauk przyrodniczych i „wybuchu” odkryć naukowych.

Do lat 60. XX wieku, aura tajemniczości otaczająca receptory pozwalała uczonym na wysuwanie przeróżnych hipotez dotyczących ich lokalizacji i działania. Jednak już w latach 50. badacz amerykański Earl W. Sutherland odkrył, że hormony - adrenalina i glukagon działając na komórki wątroby powodują powstanie w nich nowego związku – cyklicznego 3', 5'- adenylozomonofosforanu

(cAMP). Sutherland wyizolował ten związek i wykazał, że cAMP powstaje z adenozyntrifosforanu (ATP) w wyniku aktywacji i działania specyficznego enzymu – cyklazy adenylanowej. To odkrycie pozwoliło mu wysunąć w 1962 r. teorię tzw. „wtórnych przekaźników informacji” (z ang.: „Second Messengers” theory). Według teorii Sutherlanda, przekaźnik pierwszego rzędu – hormon wiąże się z receptorem tworząc kompleks, a w wyniku tego receptor nabywa zdolność aktywacji enzymu, cyklazy adenylanowej, co prowadzi do syntezy cAMP (Sutherland i Robinson, 1966). Powstający cAMP jest wtórnym przekaźnikiem informacji, bowiem wywołuje dalsze reakcje w komórce aktywując kinazę białkową A. Odkrycie to - wyjaśnienie jak działa hormon - zostało w 1971 r. uhonorowane przyznaniem Sutherlandowi nagrody Nobla. Teoria Sutherlanda pokazała, że hormon docierając do komórki docelowej nie potrzebuje wnikać do jej wnętrza, aby wywołać określoną odpowiedź.

Innym uczonym, nagrodzonym także nagrodą Nobla (1965) był Jaques L. Monod. Monod jest między innymi twórcą teorii allosteryczności białek głoszącej, że enzym (białko) posiada na swojej powierzchni dwa miejsca (domeny) – jedną aktywną, katalitycznie wiążącą substrat i drugą rozpoznającą cząsteczkę regulatorową. Zgodnie z tą teorią Monod proponował, że przenikająca błonę plazmatyczną cyklaza adenylanowa jest allosterycznie regulowanym enzymem zawierającym dwa miejsca wiązania, receptorowe i katalityczne (Monod i wsp., 1965). Monod sugerował, że część zewnętrzna enzymu stanowi miejsce receptorowe i posiada zdolność wiązania hormonu czy innej cząsteczki sygnałowej, podczas gdy część cząsteczki białka znajdująca się po stronie cytoplazmatycznej błony pełni funkcje katalityczne, ma zdolność wiązania ATP i przekształcania go w cAMP. Teoria ta, bardzo popularna w owym czasie, błędnie zakładała tożsamość białka receptorowego z enzymem. Zwróciła jednak uwagę badaczy na fakt, że wiązanie liganda przez receptor może zmieniać konformację cząsteczki białka receptorowego. Dalsze badania wykazały, że istotnie, konformacyjna zmiana struktury przestrzennej uaktywnia domenę receptora znajdującą się po wewnętrznej stronie błony plazmatycznej i pozwala na wiązanie i aktywację kolejnej cząsteczki innego białka, zdolnej do przekazania dalej określonej informacji.

Wyniki badań Sutherlanda i Monoda miały ogromny wpływ na badania amerykańskiego uczonego, także późniejszego noblisty, Martina Rodbella. Badania Rodbella, uzupełnione przez doświadczenia innego amerykańskiego uczonego, Alfreda Gilmana (też noblisty), potwierdziły słuszność teorii Sutherlanda z tą różnicą, że receptor po związaniu z agonistą i zmianie konformacji nie wiąże się bezpośrednio z enzymem (białkiem efektorowym). Między receptorem a efektorom znajduje się jeszcze inne białko, białko pośredniczące, nazwane białkiem G. A więc, podczas gdy Sutherland proponował sekwencję wydarzeń: hormon – receptor – efektor, badania Rodbella i Gilmana wykazały, że jest to układ: hormon – receptor – białko G – efektor. Historia odkrycia białka G, jego budowa i właściwości będą przedmiotem jednego z późniejszych podrozdziałów.

Należy dodać, że przekazywanie sygnałów z receptora na system efektorowy z udziałem białek G dotyczy tylko jednej dużej nadrodziny błonowych białek receptorowych, tzw. receptorów metabotropowych. Ponadto do receptorów błonowych należy nadrodzina receptorów związanych z kanałami jonowymi, tzw. receptorów jonotropowych oraz nadrodzina receptorów związanych z kinazą tyrozynową lub kinazą serynowo-treoninową. W komórce występują także receptory usytuowane w jej wnętrzu, cytozolowe lub jądrowe, przekazujące sygnały od steroidowych hormonów płciowych (np. progesteronu, estradiolu i testosteronu), mineralokortykoidów (np. aldosteronu), glukokortykoidów (np. kortyzolu), czy związków lipofilnych (np. hormonu tarczycy, czy witaminy D). Będąc cząsteczkami hydrofobowymi przechodzą łatwo przez błonę komórkową. Receptory cytoplazmatyczne po związaniu z hormonem przemieszczają się do jądra, gdzie wiążąc się ze specyficzną sekwencją regulatorową w DNA inicjują transkrypcję wybranego zespołu genów prowadząc do syntezy białek i odpowiedzi komórki. Zainteresowanych czytelników odsyłamy do *Lektur uzupełniających* (patrz: *Książki*).

Do receptorów wiążą się substancje sygnałowe, w wyniku czego dochodzi do pobudzenia bądź do hamowania funkcji receptora. Związki naturalne, zwane agonistami, zazwyczaj pobudzają receptor. Wywołując jego zmianę konformacyjną prowadzą do wewnątrzkomórkowej kaskady reakcji. Inne związki, często syntetyczne, wiążąc się nie wywołują zmiany konformacyjnej i blokują receptor.

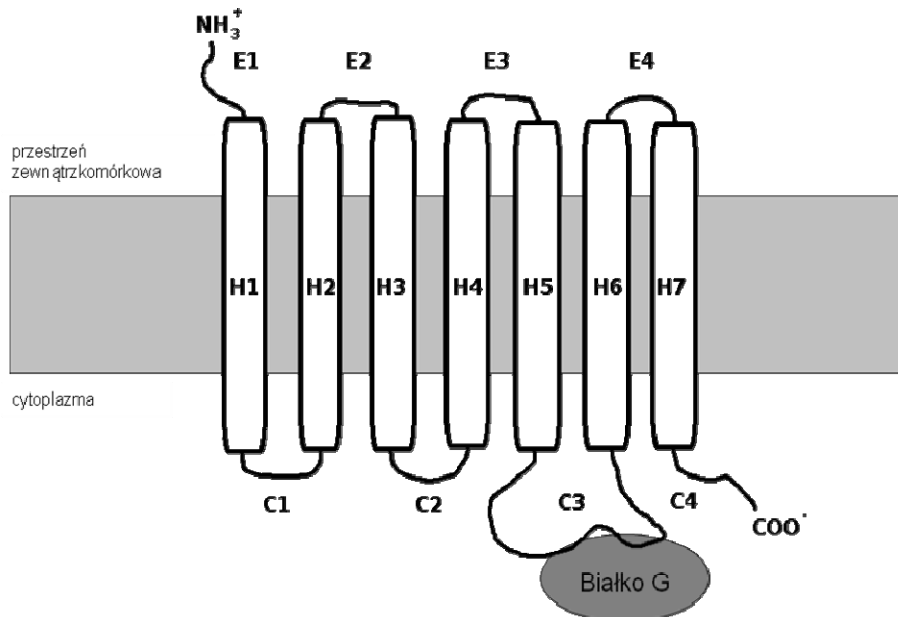
Związki te nazywamy antagonistami. Wiązanie agonistów z receptorem ma zazwyczaj charakter odwracalny, podczas gdy wiązanie antagonistów bywa nieodwracalne. Agoniści jak i antagoniści charakteryzują się dużym powinowactwem do receptora. Wiążą się z receptorem specyficznym w bardzo małych stężeniach. Receptory jonotropowe, bezpośrednio związane z kanałem jonowym przekazują sygnał w ciągu milisekund. Z kolei metabotropowe, związane z białkiem G potrzebują sekund, aby działanie agonisty wywołało określoną odpowiedź w komórce. Jeszcze wolniejsze są receptory związane z kinazami, odpowiedź pobudzonego receptora osiąga szczyt w czasie minut. Najwolniejsze są receptory wewnątrzkomórkowe. Skutek ich pobudzenia występuje w ciągu godzin lub nawet dni.

Wiedza zdobyta w wyniku badań pochodzących z ostatnich kilkudziesięciu lat zmieniła pojęcie funkcjonalnej zależności między ligandem a receptorem i odrzucenie aksjomatu „jeden ligand – jeden receptor”. Obecnie wiadomo, że ten sam neuroprzekaźnik (np. serotonina, czy acetylocholina) jest zdolny do wiązania się zarówno z nadrodziną receptorów metabotropowych jak i jonotropowych, a także z różnymi podrodzinami określonych receptorów metabotropowych (np. noradrenalina). Receptory te wprawdzie rozpoznają ten sam ligand, ale uruchamiają odmienne szlaki sygnałowe i są odpowiedzialne za wiele różnorodnych i często przeciwstawnych funkcji życiowych organizmu.

Receptory metabotropowe sprzężone z białkami G

Receptory sprzężone z białkami G (z ang.: G-Protein Coupled Receptors, GPCR) stanowią największą i najbardziej różnorodną grupę receptorów błonowych występujących w przyrodzie. W organizmie człowieka koduje je około 1 % genów a ich liczbę szacuje się na blisko tysiąc. Ich agonistami są związki hydrofilowe mające charakter przekaźników chemicznych, jak np. hormony (z wyjątkiem insuliny), neuroprzekaźniki, czy nukleotydy. Pobudzenie tego typu receptorów następuje także jako wynik oddziaływania bodźców fizycznych, jak bodźce czuciowe, czy oddziaływanie sygnałów świetlnych odbieranych przez receptor światła, rodopsynę.

Receptory GPCR, niezależnie od funkcji mają ten sam plan budowy. Wszystkie są długimi, pojedynczymi łańcuchami białkowymi siedmiokrotnie przenikającymi błonę plazmatyczną i stąd często są określane jako heptahelisowe – 7TM (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat receptora metabotropowego. Receptory należące do tej nadrodziny są długimi, pojedynczymi łańcuchami białkowymi siedmiokrotnie przenikającymi błonę plazmatyczną i są określane jako heptahelisowe – 7TM. Białko G wiąże się do receptora w obrębie jego trzeciej pętli znajdującej się w cytoplazmie. Dalszy opis w tekście

Receptory GPCR są złożone z paruset reszt aminokwasów, a większość z nich to glikoproteiny. Fragmenty łańcucha zanurzone w środowisku lipidowym błony mają budowę α -helisy (H na Ryc. 1) i składają się z 20-25 reszt hydrofobowych aminokwasów. Te heliakalne domeny hydrofobowe są połączone naprzemiennie trzema znajdującymi się na zewnątrz i trzema znajdującymi się wewnątrz komórki pętlami łańcucha. Odcinki transbłonowe są mało zmienne, silnie konserwowane w czasie ewolucji. Koniec aminowy białka receptorowego (N-koniec) jest usytuowany na zewnątrz komórki i może zawierać miejsca ulegające glikozylacji, natomiast koniec karboksylowy (C-koniec) jest zanurzony w cytosolu i zawiera

sekwencje aminokwasów będące miejscami fosforylacji. Miejsce wiązania liganda, docierającego do komórki od strony zewnętrznej znajduje się zazwyczaj w części hydrofobowej łańcucha, w „kieszce” utworzonej w błonie plazmatycznej przez reszty aminokwasów należące do helis transbłonowych. Białko G wiąże się do receptora od strony wewnętrznej błony, w obrębie jego trzeciej pętli znajdującej się w cytoplazmie (Ryc. 1).

Budowa receptorów GPCR została poznana w ciągu ostatnich 20 lat dzięki rozwojowi metod biologii molekularnej, takich jak klonowanie, sekwencjonowanie, czy punktowa mutageniza. Pierwszym w pełni poznany i szczegółowo scharakteryzowanym receptorem tej nadrodziny był receptor β -adrenergiczny. Budowa cząsteczki tego receptora została wydedukowana dzięki znajomości jego struktury pierwszorzędowej zrekonstruowanej po klonowaniu odpowiedniego cDNA i założeniu podobieństwa do poznanej w 1990 r. struktury cząsteczki rodopsyny bakteryjnej. Rodopsyna, metabotropowy receptor sygnałów świetlnych okazała się układem modelowym w badaniach dotyczących budowy receptorów GPCR, bowiem białko to udało się wyizolować ze szczepu bakteryjnego w wystarczającej ilości dla otrzymania jego kryształów i badania struktury metodami elektronowej kriomikroskopii.

Nadrodzinę receptorów GPCR dzielimy na poszczególne rodziny, podrodziny i typy. Ich klasyfikacja opierała się przez wiele lat wyłącznie na swoistości, z jaką do receptorów przyłączają się różne ligandy a więc na kryteriach farmakologicznych. Późniejszy rozwój technik molekularnych umożliwił sklonowanie i określenie różnych podtypów dla opisanych wcześniej pojedynczych receptorów. I tak do rodziny receptorów adrenergicznych należą podrodziny α_1 , α_2 i β , które dzielone są jeszcze na szereg podtypów. Substancje sygnałowe działające na receptory adrenergiczne to klasyczne neuroprzekaźniki, noradrenalina i adrenalina, które jednocześnie są hormonami. Są one wydzielane do krwioobiegu w wyniku zagrożenia, stresu emocjonalnego, ćwiczeń fizycznych, czy nawet zimna. Tak jak receptor β -adrenergiczny był pierwszym scharakteryzowanym receptorem, tak adrenalina jest uważana za pierwszy odkryty hormon. Odkrycia tego dokonali jednocześnie w latach 1894/1895 w Londynie uczeni angielscy, George Oliver i Edward Schäfer, a w

Krakowie uczonego polski, Napoleon Cybulski (nazwał ją nadnerczyną). Podręczniki zajmujące się tą tematyką zawsze wymieniają powyższe nazwiska.

Z noradrenaliną zostały powiązane pierwsze hipotezy dotyczące etiologii schorzeń depresyjnych, które zaproponowano w latach 60. XX w. Zakładały one, że do depresji dochodzi w wyniku deficytu przekazywania monoaminergicznego (noradrenaliny i serotoniny) w mózgu. Zarówno pierwsze leki przeciwdepresyjne, jak i większość zsyntetyzowanych w ciągu następných lat, zostały ukierunkowane by „poprawić” i „wzmocnić” przekazywanie noradrenergiczne i serotoninerdyczne (równocześnie bądź rozdzielnie). W kilka lat później, na tym samym Uniwersytecie Vanderbilta (Nashville, TN, USA) gdzie pracował odkrywca cAMP – E.W. Sutherland, dwóch naukowców – Fridolin Sulser (z pochodzenia Szwajcar) i Polak, Jerzy Vetulani z Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie (przebywający tamże na zagranicznym stażu naukowym) stwierdzili, że wielokrotne podawanie leków przeciwdepresyjnych osłabia system generujący cAMP w odpowiedzi na stymulację noradrenergiczną (Vetulani and Sulser, 1975). Zjawisko to nazwali β -downregulacją i wysunęli hipotezę, że jest ono odpowiedzialne za przeciwdepresyjne działanie leku. Po wielu latach okazało się, że hipoteza ta była jednak niesłuszna – nowo zsyntetyzowane leki przeciwdepresyjne nie wywoływały takich zmian w cAMP. W ten sposób β -downregulacja okazała się nie być koniecznym warunkiem dla przeciwdepresyjnego działania leków (Nalepa and Vetulani, 1993). Tym niemniej, odkrycie zjawiska β -downregulacji było niezwykle ważne ze względu na wykazanie po raz pierwszy, że przewlekle podawane leki przeciwdepresyjne są zdolne do wywołania adaptacyjnych zmian w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej.

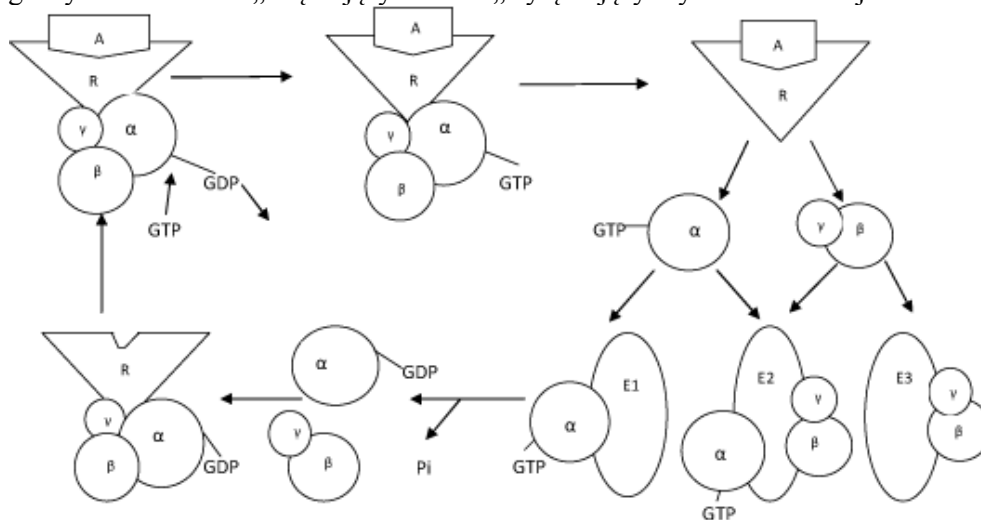
Białka G, historia odkrycia, budowa i funkcje

W latach 60. XX wieku, Martin Rodbell rozpoczął swoją karierę naukową badając tworzenie cAMP w komórkach tłuszczowych. Wykazał, że synteza tego związku zachodzi pod wpływem wielu hormonów, adrenaliny, glukagonu, hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), czy sekretyny i jest różnie regulowana przez enzymy proteolityczne czy jony wapnia. Ponadto, badając izolowane błony plazmatyczne komórek wątroby szczura, będące źródłem zarówno receptora jak i enzymu, ze

zdziwieniem stwierdził, że aby aktywacja receptora β -adrenergicznego wywołała określony efekt konieczna jest obecność nukleotydów guanylanowych. Wynik ten sugerował bardziej skomplikowaną niż przypuszczano sekwencję wydarzeń i spowodował, że zafascynowany teorią cybernetyki Rodbell postanowił wykorzystać ją do analizy procesów zachodzących w komórce. Receptory nazwał dyskryminatorami, a enzymy, których aktywność stymulował hormon – wzmacniaczami. Na drodze dedukcji postulował, że między nimi musi znajdować się jeszcze dodatkowy składnik - przekaźnik (z ang.: transducer). Ta hipotetyczna teoria spotkała się w latach 70. z obojętnością środowiska naukowego (Rodbell, 1992). Dopiero, prowadzone całkowicie niezależnie badania Gilmana wykazały jej słuszność.

Tak jak do odkrycia Rodbella doprowadziła cybernetyka, tak odkrycie Gilmana miało charakter przypadkowy. Gilman badał syntezę cAMP w detergentowych ekstraktach błon plazmatycznych chłoniaka S49 i stwierdził, że podgrzanie preparatu znosi zdolność do tej syntezy. Kiedy przypadkowo do tak podgrzanych błon dodał ekstrakty z błon komórek zmutowanych, niezdolnych do syntezy cAMP, niespodziewanie okazało się, że połączenie obu preparatów przywróciło tę zdolność. Wynik ten można było jedynie wytłumaczyć zakładając, że za syntezę cAMP odpowiadają dwa białka, jedno termolabilne, a drugie odporne na temperaturę. W błonach komórek podgrzanych aktywne byłoby jedynie białko termostabilne, a w zmutowanych, niepodgrzanych, białko termolabilne. To założenie okazało się słuszne. Białko termostabilne zostało oczyszczone do homogenności. Wykazano, że wiąże ono guanozynotrifosforan (GTP) i w tej formie aktywuje cyklazę adenylanową, która jest białkiem termolabilnym. Mutacja, zatem nie dotyczyła braku cyklazy adenylanowej a braku innego białka, koniecznego do aktywacji cyklazy. W 1985 r. Gilman i współpracownicy dysponowali oczyszczonym do homogenności preparatem tego białka, a także oczyszczoną cyklazą adenylanową i receptorem β -adrenergicznym. Wykazali, że gdy na układ działa sygnał, synteza cAMP wymaga obecności receptora, białka przekaźnikowego i enzymu. Białko przekaźnikowe zostało przez Gilmana nazwane białkiem G (Gilman, 1987). Słuszność teorii Rodbella została udowodniona. Za odkrycie białek G, Martin Rodbell i Alfred Gilman zostali w 1994 r. wyróżnieni Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny.

Białka G tworzą rodzinę homologicznych wielopodjednostkowych białek wiążących nukleotydy guanylanowe i przekazujących sygnał od błony plazmatycznej. Należy dodać, że do nadrodziny białek wiążących i hydrolizujących GTP do guanozynodifosforanu (GDP) zalicza się również rodzinę tzw. „małych białek G” (np. białka Ras, Rap, Rho). Nie tworzą one struktur wielopodjednostkowych, mają charakter monomeryczny i przekazują sygnały we wnętrzu komórki. Wszystkie jednak białka G są ściśle regulowane przez nukleotydy guanylanowe – GTP „włączający” i GDP „wyłączający” system informacji.



Ryc. 2. Schemat działania białek G. Białka G składają się z 3 podjednostek α , β i γ . Są nieaktywne, gdy do podjednostki α przyłączony jest GDP, a aktywne, gdy przyłączony jest GTP. Po związaniu agonisty (A) do receptora (R), następuje zmiana konformacyjna receptora i wymiana w białku G GDP na GTP. Białko G staje się aktywne, podjednostka α oddziela się od kompleksu β/γ i aktywuje określony efektor (E1). Kompleks β/γ jest bądź nieaktywny, bądź aktywuje inny efektor (E3), lub ten sam, co podjednostka α (E2). W wyniku hydrolizy GTP przechodzi w GDP, następuje reasocjacja wszystkich podjednostek i białko G z przyłączonym GDP staje się znowu nieaktywne

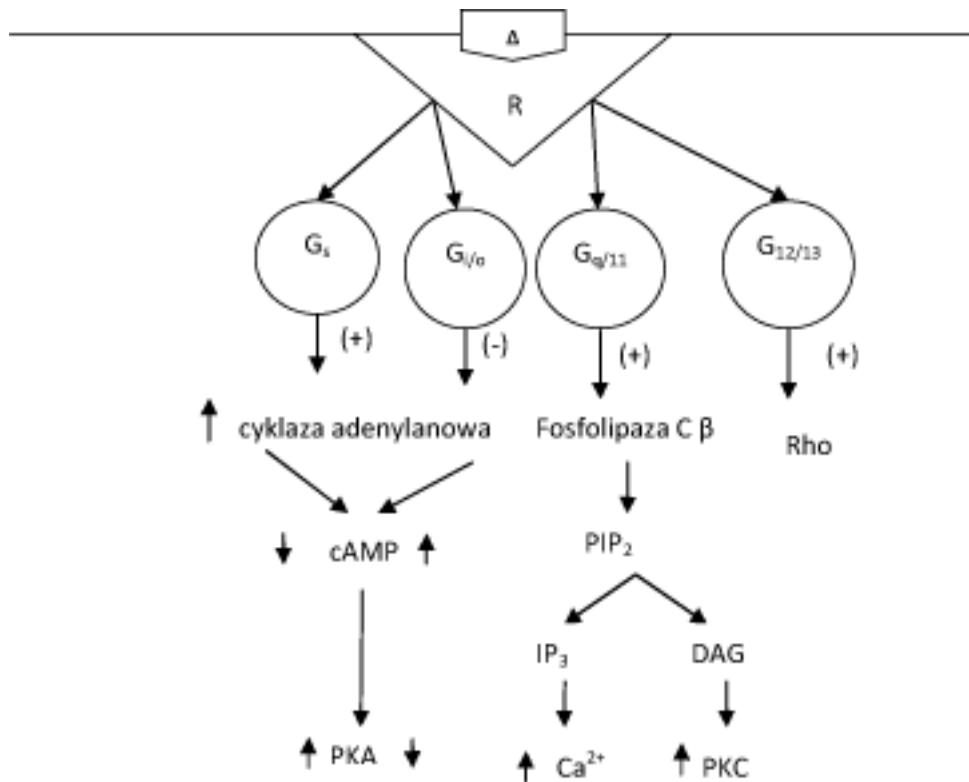
W większości przypadków przepływ sygnałów w błonie plazmatycznej - od receptora przez białko G do efektor - odbywa się według jednego uniwersalnego schematu. Białka G mają budowę trójpodjednostkową, składają się z podjednostek α , β i γ (Ryc. 2). Podjednostka α ma domenę wiążącą GTP. Ma też właściwości enzymu – stałą i silną aktywność GTPazową, bowiem posiada zdolność hydrolizy

GTP do GDP. Z przyłączonym GDP przylega ściśle do podjednostek β i γ , a cały kompleks stanowi formę nieaktywną, związaną z receptorem (Ryc. 2). Agonista działając na receptor powoduje zmianę konformacyjną zarówno receptora jak i białka G. W wyniku tej zmiany z podjednostki α uwalnia się GDP a przyłącza GTP. Powoduje to, że białko G z formy nieaktywnej przekształca się w aktywną. Podjednostka α odłącza się teraz od kompleksu β/γ i aktywuje określony efektor.

Są doniesienia wskazujące, że nie tylko podjednostka α białek G_q posiada zdolność aktywacji określonych efektorów, lecz że taką zdolność posiadają również podjednostki β/γ . Dobrym przykładem może być aktywacja fosfolipazy C typu β , która w różnych komórkach może być aktywowana przez podjednostkę α białka G_q lub przez podjednostki β/γ białka G_i . Aktywność białka G utrzymuje się tak długo, jak długo do podjednostki α przyłączony jest GTP. Kiedy w wyniku hydrolizy powstaje GDP jest to sygnałem do ponownego łączenia się wszystkich trzech podjednostek i białko G staje się znowu nieaktywne (Ryc. 2). Należy dodać, że w niektórych typach białek G, podjednostka α zawiera specjalną domenę ulegającą modyfikacji przez toksyny bakteryjne, krztuśca i cholery. Toksyna cholery powoduje blokadę aktywności GTPazowej i uniemożliwia hydrolizę GTP, co utrzymuje cyklazę adenylanową w stanie przedłużonej aktywności. Uporczywa biegunka będąca objawem choroby jest spowodowana wzrostem stężenia cAMP i wydzielaniem wody przez komórki jelita. Z kolei, toksyna krztuśca uniemożliwia interakcję z receptorem, co hamuje przekaz sygnałów przez białko.

Klasyfikacja białek G opiera się na właściwościach i podobieństwie aminokwasów podjednostki α (masa cząsteczkowa 39 – 46 kDa). Wyróżnia się 4 główne typy tych białek: G_s , $G_{i/o}$, G_q i $G_{12/13}$ (Ryc. 3) (Hepler i Gilman, 1992). Rola białek G_s polega na stymulacji cyklazy adenylanowej i zwiększeniu stężenia cAMP powstającego z ATP w reakcji cyklizacji. W reakcji tej ATP uwalnia pirofosforan, a pozostała reszta fosforanowa połączona z $C^{5'}$ rybozy tworzy dodatkowe wiązanie estrowe z $C^{3'}$ tego samego cukru. Powstały cAMP jest szybko rozkładany do AMP przez fosfodiesterazę cAMP, enzymem konstytutywnie aktywny w komórce, toteż stężenie cAMP, w zależności od odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe sygnały szybko się zmienia. cAMP jest rozpuszczalny w wodzie, dzięki czemu łatwo przemieszcza się od błony plazmatycznej do innych struktur, np. jądra komórkowego. cAMP wiąże

się i aktywuje kinazę białkową A (PKA), która następnie fosforyluje szereg białek docelowych (Ryc. 3). Docierając do jądra, PKA fosforyluje regulatorowe białka genów, które po ufosforylowaniu stymulują transkrypcję. W przedstawionym szlaku sygnalizacyjnym możemy, zatem wyróżnić następujące etapy: hormon (agonista) - receptor o 7 helisach – białko G_s – cyklaza adenylanowa (stymulacja aktywności enzymu) - cAMP (zwiększenie stężenia) – PKA – regulatorowe białka genów – transkrypcja genów. Ten łańcuch następujących po sobie wydarzeń kontroluje syntezę nowych docelowych białek czy hormonów w komórce.



Ryc. 3. Schemat działania receptora metabotropowego o 7 domenach transbłonowych (R), przekazującego sygnał na różne białka G. Receptor działając na białko G_s stymuluje, a na białko $G_{i/o}$ hamuje cyklazę adenylanową, zwiększając lub zmniejszając stężenie cAMP i aktywność kinazy białkowej A (PKA). Białko $G_{q/11}$ pobudza fosfolipazę C typu β co prowadzi do hydrolizy fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforanu (PIP $_2$), powstania trisfosfoinozytolu (IP $_3$) i diacyloglicerolu (DAG). IP $_3$ odpowiada za wzrost stężenia Ca $^{2+}$ w komórce, a DAG za aktywację kinazy białkowej C (PKC). Białko $G_{12/13}$ aktywuje małe białko G, białko Rho

Następny szlak sygnalizacyjny jest podobny do opisywanego powyżej. Jedynie receptor będąc związany z białkiem G_i nie stymuluje, ale hamuje aktywność cykazy adenylanowej i zmniejsza stężenie cAMP w komórce (Ryc. 3). W skład białek tej klasy wchodzi także białka G_o , które występują w mózgu i aktywują fosfolipazę A_2 , oraz białka G_t stymulowane przez światło i występujące w pręcikach siatkówki oka. Receptor sygnałów świetlnych, uaktywniona światłem rodopsyna aktywuje białko G_t – transducynę, oddziałującą na białko efektorowe, fosfodiesterazę specyficzną dla cyklicznego 3',5'- guanozynomonofosforanu (cGMP). W następstwie obniżenia poziomu cGMP dochodzi do zamknięcia kanałów jonowych zależnych od tego cyklicznego nukleotydu i zmiany potencjału błonowego. Powoduje to powstanie impulsu nerwowego przesyłanego do mózgu. Typy białek G_s i G_i są czułe na toksyny bakteryjne, G_s - toksynę cholery, a G_i - krztuśca.

Następne dwa typy białek, G_q i $G_{12/13}$ są nieczułe na toksyny. Białko $G_{12/13}$ aktywuje małe białko G – Rho, a G_q aktywuje białko efektorowe - fosfolipazę C typu β (Rc. 3). W wyniku tej aktywacji tworzone są wtórne przekaźniki informacji: inozytolo-(1,4,5)-trisfosforan (IP_3) i 1,2-diacylglicerol (DAG) oraz następuje zwiększenie poziomu wolnych jonów wapnia w komórce (Ryc. 3). Szlak sygnalizacyjny, w którym bierze udział fosfolipaza C typu β będzie omówiony szerzej w następnym podrozdziale.

Podział rodzin receptorów metabotropowych na poszczególne podrodziny zależy nie tylko od swoistości, z jaką przyłączają ligandy, lecz także funkcji. I tak wśród omawianych już receptorów adrenergicznych, receptory α_1 są związane z białkiem G_q , α_2 z białkiem G_i , a receptory β -adrenergiczne z białkiem G_s . Badania przeprowadzone przez Irenę Nalepę (IF PAN) doprowadziły do stwierdzenia nasilenia wewnątrzkomórkowych efektów stymulacji receptorów β -adrenergicznych przez receptory α_1 -adrenergiczne i wykazały, że aktywacja białkowej kinazy C (PKC), (do której dochodzi w wyniku pobudzenia receptora α_1 -adrenergicznego) pełni istotną rolę w potencjalizacji tworzenia cAMP po aktywacji receptora β -adrenergicznego w korze mózgowej szczura. A ponadto, że ten „dialog” receptorów α_1 - i β -adrenergicznych przeciwdziała β -downregulacji i może mieć istotne znaczenie dla mechanizmu działania leków przeciwdepresyjnych

(Nalepa, 1994). Podobny dialog receptorów α_1 - i β -adrenergicznych (prowadzący do nasilenia generacji cAMP) istnieje również w szyszynce. Szyszynka to struktura mózgu odpowiedzialna za syntezę melatoniny i regulację rytmu dobowego. Aktywność enzymu syntetyzującego melatoninę zależy od wzrostu poziomu cAMP w komórce. Zagadnieniem modulacji sygnalizacji melatoninowej zajmowały się zespoły Jolanty B. Zawilskiej i Jerzego Z. Nowaka z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Z białkami G_i są także związane receptory opioidowe, które są miejscem uchwytu dla farmakologicznego działania morfiny – leku przeciwbólowego o równoczesnym znacznym potencjale uzależniającym. Badania nad rolą tych receptorów i innych elementów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w procesie uzależnień są prowadzone przez zespół Ryszarda Przewłockiego (IF PAN).

Między receptorami sprzężonymi z białkami G zachodzą liczne współzależności. Ujemne sprzężenie zwrotne może nastąpić w przypadku jednoczesnej aktywacji receptorów sprzężonych z białkami G_i i G_s . W efekcie odpowiedź komórki będzie od tego, który typ receptora w komórce dominuje, a także od stężenia i dostępności ligandów. Z kolei działanie synergistyczne, wzmacniające sygnał może mieć miejsce w przypadku kilku agonistów działających na różne receptory, ale sprzężonych z tym samym typem białka G. Należy dodać, że ten sam ligand może działać na różne receptory. Zespół Jolanty Barańskiej z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie (IBD PAN) wykazał, że adenylozynodifosforan (ADP) działając na komórki glejaka C6 jednocześnie aktywuje receptor nukleotydowy $P2Y_1$ sprzężony z białkiem G_q i receptor $P2Y_{12}$ sprzężony z białkiem G_i i inicjuje różne szlaki sygnalizacyjne (Barańska i wsp., 2004). Takie działanie prowadzi do kompleksowej odpowiedzi komórki i zwielokrotnienia sygnału.

Udział lipidów w przekazywaniu informacji

Włączenie lipidów w mechanizm przekazywania informacji datuje się od eksperymentów Hokin i Hokin prowadzonych w Montrealu w czasie, gdy w Cambridge Watson i Crick trudzili się nad poznaniem struktury podwójnej helisy

DNA. Wyniki ich badań opublikowane w 1953 r. wykazały, że acetylocholina działając na komórki trzustki gołębia stymuluje inkorporację radioaktywnego fosforanu ^{32}P we frakcję fosfolipidów inozytolowych (Hokin i Hokin, 1953). Okazało się, że wiele agonistów działających na różne komórki wywołuje rozpad a następnie resyntezę tych fosfolipidów. Zjawisko to nie było związane ze zmianami stężenia cAMP, a jego znaczenie pozostawało długo tajemnicą. Dwadzieścia lat później, Michell połączył je z towarzyszącym mu zwiększeniem stężenia wolnych jonów wapnia (Ca^{2+}) w komórce (Michell, 1975). Michell sugerował, że zmiany stężenia Ca^{2+} są związane z prowadzoną przez fosfolipazę C hydrolizą określonego fosfolipidu, fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforanu (PIP_2). Rozpad PIP_2 powoduje powstanie trisfosfoinozytoli (IP_3) i diacyloglicerolu (DAG). Hipoteza ta, trudna do udokumentowania była przyjęta krytycznie, bowiem PIP_2 występuje w komórkach zwierzęcych w niezwykle małych ilościach, stanowiąc ułamek procentu wszystkich fosfolipidów błon (<0.1%). Dopiero prowadzone w latach 80. badania grupy badaczy brytyjskich z pracowni Berridge'a pokazały, że wprowadzenie do przepuszczalnych komórek trzustki egzogenego IP_3 istotnie powoduje zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (Streb i wsp., 1983). Ponieważ doświadczenia odbywały się w środowisku o niskim poziomie, lub pozbawionym jonów wapnia, wyniki świadczyły o uwalnianiu Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych.

Dalsze intensywne badania potwierdziły, że hydroliza fosfolipidu inozytoloowego PIP_2 następuje w wyniku aktywacji fosfolipazy C typu β . Fosfolipaza ta nie działa na inne fosfolipidy inozytowe. Badania wykazały także, że GTP (podobnie jak w przypadku cykazy adenylanowej) stymuluje aktywność fosfolipazy. Okazało się więc, że szlak sygnałowy, którego wynikiem jest zwiększenie stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} przebiega podobnie jak w przypadku szlaków zmieniających stężenie cAMP w komórce, a mianowicie z udziałem białek G. W proces ten jest włączony inny typ białek G, białka G_q , ale mechanizm działania jest taki sam.

Szlak sygnalizacyjny, w którym bierze udział fosfolipaza C typu β jest, zatem następujący: Agonista działa na specyficzny receptor metabotropowy o 7 domenach transbłonowych, sprzężony z białkiem G_q . Podjednostka α tego białka

aktywuje fosfolipazę C typu β . Zaktywowany enzym działa hydrolitycznie na fosfolipid PIP_2 (Ryc. 4). W wyniku hydrolizy powstają dwa wtórne przekaźniki informacji IP_3 i DAG. IP_3 , potrójnie ufosforylowana cząsteczka inozytolu, jest dobrze rozpuszczalny w wodzie i dyfunduje z błony plazmatycznej do siateczki śródplazmatycznej. Siateczka śródplazmatyczna jest głównym magazynem jonów wapnia w komórce zwierzęcej. IP_3 łączy się ze specyficznym receptorem znajdującym się w błonie tej organelli. Receptor ten jest tetrametrem. Jego podjednostki otaczają przestrzeń będącą kanałem. Po związaniu IP_3 kanał receptora otwiera się i zmagazynowany Ca^{2+} zostaje uwolniony do cytosolu (Ryc. 4).

Ponadto PIP_2 w błonie plazmatycznej oddziałuje z białkami cytoszkieletu i tworzy sieć połączeń z wieloma białkami sygnalizacyjnymi zawierającymi w swojej cząsteczce tzw. domenę PH, homologiczną do plekstryny. Zagadnieniem tym zajmuje się zespół Andrzeja Soboty i Katarzyny Kwiatkowskiej z IBD PAN. Należy dodać, że PIP_2 może nie tylko ulegać hydrolizie, lecz także fosforylacji. Powstaje wtedy z niego w wyniku działania kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), fosfolipid: fosfatydyloinozytolo-(3,4,5)-trifosforan (PIP_3), niehydrolizowany przez fosfolipazę C typu β . PIP_3 rekrutuje z cytoplazmy do błony plazmatycznej nieaktywną kinazę białkową B, zwaną także Akt i wiążąc się z nią umożliwia jej fosforylację a przez to aktywację. Szlak sygnałowy włączający PI3K/Akt pełni istotne funkcje w procesach pro życiowych, zapobiega programowanej śmierci komórek - apoptozie. Zagadnieniem tym, a także problemem starzenia komórek i organizmu (w tym ludzkiego) zajmuje się zespół Ewy Sikory. Kinaza Akt ma również znaczenie kluczowe w regulacji migracji i inwazyjności komórek nowotworowych. Z kolei, tym zagadnieniem zajmuje się zespół Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek. Wymienione powyżej zespoły pracują również w IBD PAN w Warszawie.

Drugi wtórny przekaźnik informacji powstający w wyniku hydrolizy PIP_2 to diacyloglicerol – DAG. DAG pozostaje w błonie plazmatycznej i aktywuje kinazę białkową C (PKC) (Ryc. 4). Od czasu odkrycia Nishizuka, który w końcu lat 70. opisał kinazę białkową zależną od DAG, lipidowi temu przypisuje się duże znaczenie jako naturalnemu aktywatorowi tej kinazy (Nishizuka, 1992). Wywołane działaniem agonistów pojawienie się DAG w komórce wielokrotnie przewyższa

ilość PIP_2 znajdującego się w błonie komórkowej. Okazało się, że DAG pochodzi także z hydrolizy innego fosfolipidu, fosfatydylocholine będącej głównym fosfolipidem błon wszystkich komórek organizmów eukariotycznych. DAG uwolniony z PIP_2 jest szybko metabolizowany, podczas gdy pochodzący z hydrolizy fosfatydylocholine utrzymuje się przez dłuższy okres. Hydroliza fosfatydylocholine zachodzi w wyniku aktywacji fosfolipazy D. Produktami hydrolizy jest cholina i kwas fosfatydowy; DAG tworzy się w wyniku defosforylacji kwasu fosfatydowego. Fosfolipaza D jest aktywowana przez PKC i Ca^{2+} , a więc wtórnie wobec początkowej aktywacji fosfolipazy C. Wiadomo jednak, że stymulacja aktywności fosfolipazy D może być także bezpośrednio włączona w szlaki sygnałowe regulowane przez białka G, czy sprzężone z kinazą tyrozynową.

Inne lipidy pełniące ważną rolę w przekazywaniu sygnałów w organizmie to 20-węglowe eikozanoidy: prostaglandyny, prostacykliny, tromboksany i leukotrieny. Ich prekursorem jest kwas arachidonowy, wielonienasycony kwas tłuszczowy (20:4), będący produktem działania fosfolipazy A_2 na fosfolipidy i lipazy na DAG. Związki te występują w wielu tkankach, a będąc nietrwałe uważane są za „lokalne hormony”. Prostaglandyny stymulują stany zapalne, regulują przepływ krwi i modulują przekazywanie impulsów nerwowych przez synapsy. W 1982 r., szwedzcy badacze Sune K. Bergstrom i Bengt I. Samuelsson, a także badacz brytyjski John R. Vane uzyskali za pionierskie badania nad powyższymi związkami Nagrodę Nobla. Bergstrom i Samuelsson byli pierwszymi, którzy wyizolowali i określili molekularną strukturę prostaglandyn i tromboksanów i wytłumaczyli ich syntezę. Wielkim odkryciem Vane'a było wytłumaczenie, na czym polega przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe działanie aspiryny. Okazało się bowiem, że aspiryna hamuje aktywność cyklooksygenazy, enzymu koniecznego dla syntezy prostaglandyn z kwasu arachidonowego. Blokuję także syntezę tromboksanu, bowiem także i ten eikozanoid powstaje z kwasu arachidonowego z udziałem cyklooksygenazy. Tromboksan to jeden z głównych czynników odpowiedzialnych za agregację płytek krwi, toteż aspiryna hamując jego syntezę działa przeciwzakrzepowo. Wybitny polski uczonec, lekarz i farmakolog Ryszard J. Gryglewski, będąc w zespole Vane'a odkrył w 1976 r.

prostacyklinę, toteż jak mówi się w środowisku „otarł” się o Nagrodę Nobla. Gryglewski pracując w Collegium Medicum na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie wyjaśnił mechanizm uwalniania tego związku ze śródbłonna tętnic, opisał jego właściwości, odkrył selektywny inhibitor syntezy tromboksanu (Gryglewski i wsp., 1977). Gryglewski badał także zależność między działaniem aspiryny a napadami astmy oskrzelowej, a także wpływ tlenku azotu (NO) na kurczliwość naczyń krwionośnych. Tematyka ta jest kontynuowana przez Stefana Chłopickiego i Aldonę Dembińską-Kieć zajmujących się w Collegium Medicum podobnymi problemami. W Collegium Medium pracuje także Piotr Laidler badający procesy sygnalizacyjne prowadzące do progresji i zahamowania rozwoju komórek nowotworowych różnego typu.

Podsumowując - wcześniej sądzono, że lipidy pełnią tylko funkcje zapasowe, lub strukturalne, toteż włączenie ich pod koniec XX wieku w procesy przekazywania sygnałów „zastrzeżone” uprzednio dla białek miało charakter wręcz rewolucyjny.

Udział jonów wapnia w sygnalizacji komórkowej

Badania lat ostatnich wykazały kluczową rolę Ca^{2+} jako wtórnego przekaźnika informacji w komórkach eukariotycznych. Dany związek, aby być uważany za wtórny przekaźnik powinien spełniać określone kryteria. Są nimi: (1) występowanie w komórce w niskich stężeniach, zwiększających się gwałtownie po pobudzeniu i równie szybko wracających do stanu wyjściowego, (2) zmiany stężenia powinny stanowić sygnał inicjujący rozpoczęcie kaskady wydarzeń prowadzących do określonej odpowiedzi metabolicznej. Jony Ca^{2+} , podobnie jak cAMP, cGMP, IP_3 i DAG spełniają te kryteria. Stężenia Ca^{2+} w komórce jest niskie, a poczynając od drożdży i kończąc na człowieku zmiana stężenia tego jonu kontroluje tak różne życiowe procesy jak poziom cyklicznych nukleotydów, wydzielanie hormonów i neurotransmiterów, wzrost, podział i różnicowanie. Najpotężniejsza fala wapniowa, z jaką styka się organizm następuje przy zapłodnieniu, kiedy plemnik wnika do komórki jajowej. Z kolei, kiedy zawodzą naturalne procesy regulacyjne, np. przy niedotlenieniu, wewnątrz komórki zostaje

zalne przez Ca^{2+} powodując destrukcję i śmierć. A więc, Ca^{2+} odgrywa szczególną rolę na początku i końcu życia.

Stężenie Ca^{2+} w cytosolu jest niskie i wynosi w komórce niepobudzonej około 10^{-7} M (50-100 nmoli/l). Stanowi to wartość dziesięć tysięcy razy mniejszą niż poziom tego jonu w płynach ustrojowych, wynoszący około 10^{-3} M (1-2 mmole/l). Po pobudzeniu komórki stężenie Ca^{2+} wzrasta dziesięciokrotnie do 10^{-6} M (1 $\mu\text{mol/l}$). Przy tak dużej różnicy stężeń konieczność utrzymania stałego, niskiego poziomu Ca^{2+} w komórce (w wysokich stężeniach Ca^{2+} jest cytotoksyczny) wymusza niejako istnienie specjalnych mechanizmów, takich jak pompy, kanały, czy wymiennicze, przez które Ca^{2+} jest usuwany na zewnątrz lub magazynowany w wewnątrzkomórkowych organellach.

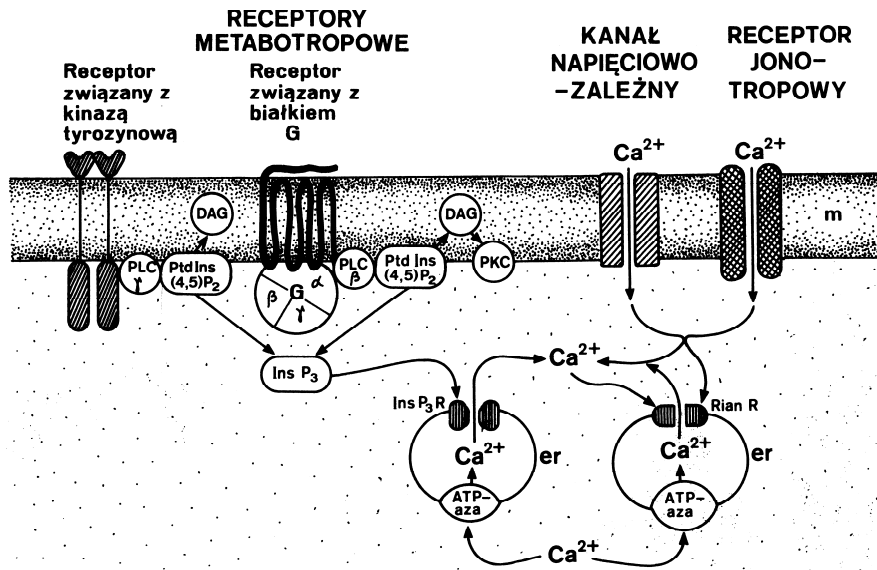
Nadmiar Ca^{2+} z cytosolu komórki jest usuwany na zewnątrz, wbrew gradientowi stężeń przez enzym błony plazmatycznej Ca^{2+} -ATPazę, zwaną także pompą wapniową. Proces ten odbywa się kosztem energii uzyskiwanej z hydrolizy ATP ($\text{ATP}/\text{Ca}^{2+} = 1:1$). Problematyka homeostazy wapniowej a szczególnie mechanizm działania plazmatycznej pompy wapniowej, jej regulacja i połączenia ze szlakami sygnalizacyjnymi stanowi od lat przedmiot badań wybitnego badacza włoskiego, Ernesto Carafoli (Carafoli i wsp., 2001). Inny mechanizm usuwania Ca^{2+} prezentuje wymiennicz sodowo-wapniowy, będący białkiem błonowym transportującym jony sodu na wymianę z wapniem ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} = 3:1$). Wapń jest także magazynowany w organellach wewnątrzkomórkowych, takich jak jądro i mitochondria (magazyny o dużej pojemności, lecz małym powinowactwie) oraz siateczce śródplazmatycznej, charakteryzującej się dużym powinowactwem i małą pojemnością, co pozwala na szybkie uwalnianie tego jonu. Do siateczki śródplazmatycznej Ca^{2+} jest pompowany przez Ca^{2+} -ATPazę, różniącą się szeregiem właściwości od tej występującej w błonie plazmatycznej ($\text{ATP}/\text{Ca}^{2+} = 1:2$). W utrzymaniu homeostazy wapniowej w komórce główną rolę odgrywa siateczka śródplazmatyczna. Jony Ca^{2+} zmagazynowane wewnątrz siateczki związane są z określonymi białkami wiążącymi Ca^{2+} , kalsekwestryną i kalretikulina. Stężenie wolnych jonów wapnia w cytosolu jest utrzymywane na niskim poziomie także przez wiązanie tych jonów przez wielkocząsteczkowe białka. Wiązanie to ma dodatkowe znaczenie dla komórki, bowiem Ca^{2+} wiążąc się

zmienia konformacje tych białek, a przez to ich funkcje. Są to często enzymy aktywowane przez połączenie z Ca^{2+} lub białka, które dzięki połączeniu mogą łatwiej reagować z miejscami czynnymi enzymu. Najbardziej znanym w cytosolu białkiem wiążącym Ca^{2+} jest kalmodulina, która wiążąc 4 jony wapniowe zmienia swoją konformację i dzięki temu wchodzi w interakcję z wieloma białkami aktywując je. Białkami tymi są np. wymieniona powyżej Ca^{2+} -ATPaza błony plazmatycznej, fosfodiesteraza cAMP, czy kinaza zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny (CaM-PK). Zespół Jacka Kuźnickiego i Anny Filipek z IBD PAN i Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie specjalizuje się w problematyce białek wiążących Ca^{2+} . Prócz badań nad kalmoduliną, ich specjalnym zainteresowaniem cieszy się rodzina białek S-100. Do białek S-100 należy np. kalcyklina wiążąca się z białkiem CacyBP, grającym rolę w procesie ubikwitynacji (Leśniak i Kuźnicki, 2006). Białko to na początku lat 90. zostało po raz pierwszy wyizolowane i oczyszczone przez zespół Kuźnickiego - Annę Filipek i Urszulę Wojdę (IBD PAN). Z kolei, pracujący w tym samym Instytucie zespół Sławomira Pikuły zajmuje się aneksynami, białkami wiążącymi zarówno Ca^{2+} jak i fosfolipidy.

Kontrolowane wnikanie Ca^{2+} do komórki odbywa się przez różnego rodzaju kanały jonowe (Ryc. 4). Napływ jonów, w tym Ca^{2+} odbywa się zawsze zgodnie z gradientem stężeń. Wśród kanałów jonowych oddzielną grupę stanowią kanały wchodzące w skład receptorów jonotropowych (patrz podrozdział: *Receptory jonotropowe*).

Innego rodzaju kanały, przez które jony Ca^{2+} wnikają do komórki to tzw. kanały zależne od napięcia (Ryc. 4). Ich otwarcie następuje w wyniku zmiany potencjału błonowego w stosunku do potencjału spoczynkowego komórki (-70 mV). Kanały te, odkryte w latach 50. zeszłego wieku, w zależności od różnic w budowie oraz właściwości funkcjonalnych, (np. czas otwarcia, przewodność i wrażliwość na potencjał) dzielimy na kanały L, N, P, Q, R i T. Najbardziej popularny kanał L składa się z 5 podjednostek. Właściwy kanał tworzy jedna z podjednostek składająca się z 4 domen transbłonowych, każda zawierająca 6 segmentów przenikających przez błonę. Opis ten pokazuje jak bardzo skomplikowana jest budowa tego typu kanałów. Kanały te, aktywowane przez

depolaryzację występują w tzw. komórkach pobudliwych, którymi u kręgowców są wszystkie typy komórek mięśniowych, neurony i niektóre komórki wydzielnicze. W komórkach pobudliwych napływ jonów Ca^{2+} do komórki odbywa się głównie przez ten typ kanałów, komórki niepobudliwe tego typu kanałów nie posiadają.



Ryc. 4. Schemat mobilizacji Ca^{2+} w komórce. Jony wapnia wnikają do komórki poprzez kanały napięciowo-zależne i receptory jonotropowe. Mobilizacja Ca^{2+} może zachodzić również w wyniku aktywacji receptorów metabotropowych związanych z białkiem G, lub receptorów związanych z kinazą tyrozynową. Następuje wtedy, odpowiednio, aktywacja fosfolipazy C typu β (PLC β), lub fosfolipazy C typu γ (PLC γ), hydroliza fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforanu (PtdIns(4,5)P₂), powstanie diacyloglicerolu (DAG) i trisfosfoinozytolu (InsP₃). InsP₃ łączy się ze specyficznym receptorem (InsP₃R) w błonie siateczki śródplazmatycznej (er) i otwiera znajdujący się w nim kanał, przez który do cytosolu uwalniane zostają jony Ca^{2+} . DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC). Wapń wnikający do komórki może oddziaływać również na receptory rianodinowe (Rian R) otwierając je. Do wnętrza siateczki śródplazmatycznej Ca^{2+} jest przenoszony aktywnie przez Ca^{2+} -ATPazę (ATP-aza). (Zauważ, że na rycinie fosfolipid inozytolowy PIP₂ - oznaczony jest jako PtdIns(4,5)P₂, a trisfosfoinozytol IP₃ - jako InsP₃) (Według: Barańska, Kosmos 1997, 46: 33-44, dzięki uprzejmości redakcji)

W komórkach niepobudliwych mobilizacja Ca^{2+} w komórce ma charakter dwufazowy. Pierwszą fazę stanowi opisany już w poprzednim rozdziale szlak sygnalizacyjny, w którym aktywacja receptora metabotropowego o 7 domenach transbłonowych, sprzężonego z białkiem G_q prowadzi do aktywacji fosfolipazy C

typu β , hydrolizy PIP_2 , powstania cząsteczki IP_3 i interakcji IP_3 ze specyficznym receptorem w błonie siateczki śródplazmatycznej (er) (Ryc. 4, zauważ: na rycinie PIP_2 oznaczony jako $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, a IP_3 jako InsP_3). Zmiana konformacyjna receptora (InsP_3R) powoduje otwarcie kanału i uwolnienie jonów Ca^{2+} zmagazynowanych w tej organelli do cytosolu. Także pobudzenie receptorów związanych z kinazą tyrozynową może aktywować fosfolipazę C typu γ (szczegóły w dalszym podrozdziale) powodując podobnie jak w przypadku aktywacji fosfolipazy C typu β powstanie IP_3 i uwolnienie Ca^{2+} do cytosolu (Ryc. 4). Należy dodać, że w komórkach pobudliwych np. neuronach, prócz receptorów specyficznych dla IP_3 , w błonie siateczki śródplazmatycznej znajdują się jeszcze tzw. receptory rianodinowe (RianR), otwierane w wyniku zwiększonego stężenie jonów Ca^{2+} w cytosolu (Ryc. 4).

Uwolnienie Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej (pierwsza faza) powoduje w następnej drugiej fazie wnikanie tego jonu do wnętrza komórki z macierzy pozakomórkowej. Tak, jak Michael Berridge i jego zespół odegrał ogromną rolę w wytłumaczeniu roli IP_3 (Berridge, 1993), tak amerykański uczoney James Putney zaproponował w 1986 r. model tłumaczący wnikanie Ca^{2+} do komórki w drugiej fazie tego procesu. Proces ten nazwał „capacitative calcium entry” (tłumaczony jako: „pojemnościowa teoria wnikania wapnia”). Według tej teorii, druga faza jest spowodowana nagłym opróżnieniem magazynów siateczki śródplazmatycznej z Ca^{2+} i destabilizacją błony plazmatycznej w miejscach, gdzie odległość błony od tej organelli jest niewielka (proces niepokazany na rycinie 4). W tych właśnie miejscach następowałoby otwieranie kanałów (niebędących kanałami zależnymi od napięcia) i wnikanie Ca^{2+} z macierzy pozakomórkowej do wnętrza komórki (Putney, 1986). Ten mechanizm jest typowy dla komórek niepobudliwych. Hodowane komórki glejaka C6 mogą stanowić modelowy przykład komórek niepobudliwych, charakteryzujących się zgodnym z teorią pojemnościową dwufazowym mechanizmem wnikania Ca^{2+} do komórki (Barańska i wsp., 1999). Rolą mitochondriów w pojemnościowym mechanizmie wnikania Ca^{2+} do komórek zajmuje się zespół Jerzego Duszyńskiego z IBD PAN (Duszyński i wsp., 2006).

Tlenek azotu a przekazywanie sygnałów w komórce

Wykazanie, że tlenek azotu (NO), nietrwały gaz toksyczny, pełni istotną rolę jako fizjologiczny, wewnątrzkomórkowy przekaźnik sygnału było jednym z najbardziej zdumiewających odkryć naukowych lat ostatnich. Początkowe znaczenie roli NO dotyczyło sugestii Ignarro, że to ten gaz pełni rolę odkrytego na początku lat 80. przez Furchgotta śródbłonkowego czynnika rozkurczającego naczyń (z ang.: endothelium-derived-relaxing-factor, EDRF). Badania późniejsze wykazały, że istotnie tak jest i wyjaśniły, że uwalniana z zakończeń nerwowych acetylocholina oddziałuje na receptory komórek śródbłonka wyścielające naczynia krwionośne. Powoduje to syntezę i natychmiastowe uwolnienie NO z tych komórek. NO dyfunduje do komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych i powoduje ich relaksację. W efekcie następuje rozkurcz naczyń krwionośnych, krew płynie łatwiej. To odkrycie tłumaczyło działanie nitrogliceryny, przekształcanej w organizmie do NO. Od blisko 100 lat nitrogliceryna jest stosowana u pacjentów chorujących na bóle wywołane niedostatecznym przepływem krwi przez mięsień sercowy.

Tlenek azotu powstaje z aminokwasu L-argininy w wyniku działania enzymu: syntazy NO (NOS). Znane są dwie główne izoformy tego enzymu. Pierwsza, tzw. konstytutywna NOS występuje w cytosolu śródbłonka i komórek nerwowych. Jej aktywność jest uzależniona od kompleksu Ca^{2+} - kalmodulina. Ligandy, acetylocholina, bradykinina, ATP, działając na receptory metabotropowe związane z fosfolipazą C zwiększają stężenie Ca^{2+} w cytosolu i aktywują enzym. Druga izoforma syntazy jest najczęściej związana z błonami, jej aktywność nie zależy od Ca^{2+} i kalmoduliny. Jest aktywowana przez cytokiny i infekcje bakteryjne, występuje w wielu tkankach, np. sarkolemie mięśni szkieletowych, kardiomiocytach, nabłonkach oskrzeli, czy śluzówce jelita i żołądka.

Powstający NO nie jest magazynowany w komórce. *In vivo*, czas półtrwania NO wynosi 2-5 sek, toteż natychmiast dyfunduje z komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej. Zetknąwszy się z wodą i tlenem przekształca się w azotany i azotyny wydalane z moczem, a także oddziałuje parakrynnie na sąsiadujące

komórki i równie łatwo jak się uwalnia, tak i wnika do komórki docelowej. Błona plazmatyczna nie stanowi dla NO bariery.

Powyższe informacje nie mówią jeszcze, w jaki sposób NO działa jako przekaźnik sygnału. Badania wykazały, że wnika do komórki NO łączy się i aktywuje cytosolową formę cyklazy guanylanowej, która przekształca GTP w cGMP, podobnie jak cyklaza adenylanowa przekształca ATP w cAMP. Odkrycie zależności między NO a cyklazą guanylanową nie było łatwe, między kolejnymi odkryciami mijały lata. Na początku lat 60., kilka lat po odkryciu cAMP przez Sutherlanda, odkryto cGMP w moczu szczura (1963), a następnie, pod koniec lat 60., w wielu tkankach ssaków. Jednak cała dekada lat 70. stała pod znakiem niemożności znalezienia jakichkolwiek hormonów, czy innych ligandów działających pobudzająco na komórkę i inicjujących aktywację cyklazy guanylanowej. Fakt uczestnictwa cGMP w kaskadzie procesów przekazujących sygnał świetlny w komórkach fotoreceptorowych siatkówki wydawał się mieć charakter wyjątkowy i sądzono, że cGMP ma niewielkie znaczenie biologiczne. Choć już dawniej badania Murada wykazały, że NO uwalniany z nitrogliceryny zwiększa poziom cGMP w tkankach, dopiero dzięki pogłębionej wiedzy dotyczącej NO udało się w latach 80. wykazać, że to NO jest aktywatorem tej cyklazy. Dlatego też, cyklazę guanylanową często nazywa się wewnątrzkomórkowym receptorem dla NO (Murad, 1994). Aktywacja polega na związaniu NO z hemową grupą prostetyczną cyklazy; zmiana konformacyjna zwiększa aktywność enzymu 200 krotnie. Cyklaza guanylanowa jest także aktywowana, choć nie tak intensywnie, przez rodnik hydroksylowy, a także przez inny gaz, tlenek węgla.

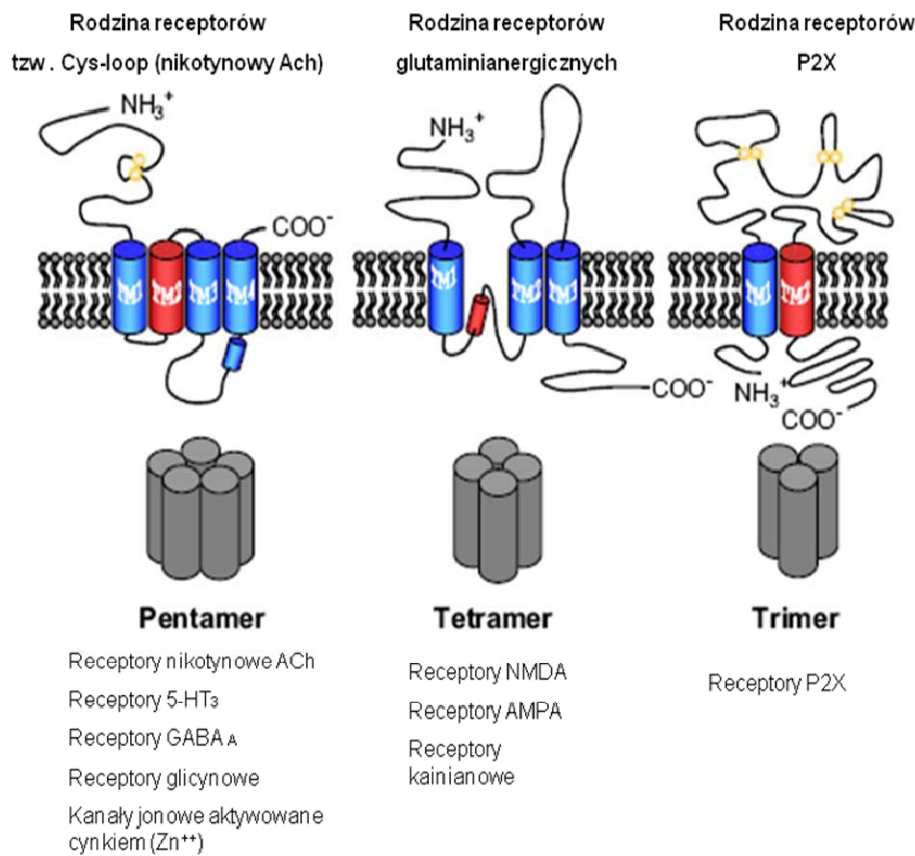
Działanie NO związane z aktywacją cyklazy guanylanowej i powstaniem cGMP powoduje hamowanie agregacji płytek krwi, regulację procesów widzenia, sekrecję i adsorpcję jonów w nerwie i w jelicie oraz pośredniczy w sygnalizacji między neuronami. Za pionierskie badania i wy tłumaczenie roli NO jako cząsteczki sygnałowej w układzie sercowo-naczyniowym, badacze amerykańscy Louis J. Ignarro, Robert F. Furchgott i Ferid Murad uzyskali w 1998 r. nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Problematyką roli cGMP w regulacji syntezy NO i przekazywaniem sygnałów z udziałem receptorów nukleotydowych w nerwie zajmuje się zespół Stefana Angielskiego z Akademii Medycznej w

Gdańsku. Zespół Barbary Przewłockiej (IF PAN) zajmujący się badaniem procesów przewodnictwa bólowego wykazał między innymi, że podawanie inhibitorów NOS nasila przeciwbólne efekty morfiny i agonistów receptorów opioidowych oraz oksotremoryny. Z kolei, Wojciech Gorczyca z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu zajmuje się modulatorową rolą cGMP w układzie immunologicznym i przekazywaniu sygnałów w komórkach fotoreceptorowych, a Józef Dulak z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie prowadzi badania nad rolą NO w regulacji aktywności czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) stymulującego proces angiogenezy oraz rolą tlenu węgla jako gazowego modulatora genów (Dulak i wsp., 2008). Natomiast zespół kierowany przez Joannę Strosznajder z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej w Warszawie prowadzi badania nad rolą zaburzenia przekazywania sygnału przy udziale szlaku (NO)/cGMP w procesie starzenia mózgu.

Receptory jonotropowe

Receptory jonotropowe, w przeciwieństwie do receptorów metabotropowych, nie są związane ze szlakami wtórnych przekaźników, natomiast są bezpośrednio połączone z kanałami jonowymi. Po zadziałaniu na receptor odpowiedniego stymulatora (liganda), w miejscu allosterycznym (dalekim od miejsca kanału) dochodzi do zmian konformacyjnych, w efekcie kanał jonowy otwiera się umożliwiając napływ jonów – kationów (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) lub anionów (Cl^-). Taki system komunikacji komórki z otaczającym środowiskiem jest możliwy dzięki działaniu tylko niektórych hormonów i neuroprzekaźników, takich jak acetylocholina (ACh), serotonina (5-HT), kwas γ -aminomasłowy (GABA), kwas glutaminowy oraz nukleotydy purynergiczne. Ponieważ proces ten jest o wiele szybszy niż sygnalizacja z udziałem receptorów metabotropowych, został nazwany „szybkim przekaźnictwem synaptycznym” (w przypadku ośrodkowego układu nerwowego) i jako taki musi być precyzyjnie regulowany, a receptory jonotropowe biorące w nim udział mają budowę bardziej skomplikowaną. Składają się z wielu podjednostek, z których każda może występować w kilku wariantach

molekularnych (różniących się w pewnym stopniu składem aminokwasów) oraz posiadają wiele miejsc, do których przyłączają się różne modulatory zapewniające precyzyjną regulację czasu otwarcia kanału.



Ryc. 5. Trzy kategorie strukturalne receptorów jonotropowych: pentameryczna, tetrameryczna i trimeryczna, ukazujące liczbę podjednostek formujących kanał jonowy. Schematy budowy receptorów należących do poszczególnych podrodzin przedstawiają lokalizację zewnątrz- i wewnątrzkomórkową końców białka receptorowego, wielokrotność przenikania łańcucha białkowego przez błonę plazmatyczną (cylindry) oraz reszty cysteinowe biorące udział w tworzeniu mostków (wiązań) dwusiarczkowych. U dołu ryciny podano przykłady receptorów należących do poszczególnych kategorii. Receptor nikotynowy aktywowany acetylocholiną (ACh), receptor serotoninowy (5HT₃) i kanał aktywowany cynkiem formują kanały jonowe selektywne dla kationów. Receptory dla kwasu γ -aminomasłowego typu A (GABA_A) oraz strychnino-zależny receptor glicynowy po aktywacji są przepuszczalne dla anionów. (Według: Collingridge i wsp., *Neuropharmacology*, 2009, 56: 2-5, zmodyfikowano).

Obecna klasyfikacja receptorów jonotropowych, dokonana w oparciu o ich strukturę wyróżnia trzy rodziny, których przedstawiciele różnią się rodzajem i ilością podjednostek wchodzących w skład kanału jonowego: (i) receptory o budowie pentamerycznej (np. nikotynowy receptor cholinergiczny, receptor serotoninowy – 5-HT₃, receptor GABA-A); (ii) tetramery (np. receptory dla kwasu glutaminowego – NMDA i AMPA oraz receptory dla kwasu kainowego); (iii) trimery (np. receptory nukleotydów typu P2X dla ATP) (Ryc. 5).

Poniżej omówiono kilka wybranych przedstawicieli dużej nadrodziny receptorów jonotropowych. Pierwszym receptorem jonotropowym, który oczyszczono i sklonowano był nikotynowy receptor cholinergiczny (nAChR) – przepuszczalny dla jonów Na⁺ i K⁺. Jego aktywator – acetylocholina, była pierwszą endogenną substancją chemiczną, którą uznano za neuroprzekaźnik. Odkrył ją Henry H. Dale (w 1914 r.), który początkowo opisał stymulujące działanie acetylocholiny na tkankę mięśnia sercowego, a następnie Otto Loewi stwierdził, że jest to neuroprzekaźnik uwalniany z nerwu błędnego. Za te odkrycia obydwaj uczeni zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w 1936 r. Rozróżniamy dwa typy nAChR: mięśniowy i neuronalny, które różnią się składem podjednostek tworzących kanał jonowy. Mięśniowy receptor nikotynowy zbudowany z dwóch podjednostek typu α , oraz podjednostek β , γ i δ występuje w mięśniach szkieletowych (na złączach nerwowo-mięśniowych). Do redukcji liczby nAChR dochodzi w jednym ze schorzeń mięśniowych – nużliwości mięśni (miastenia gravis). W tym schorzeniu o podłożu autoimmunologicznym wytwarzane są przeciwciała przeciwko nAChR powodując ich agregację i przyspieszoną degradację. Neuronalny nAChR – również pentamer, zbudowany jest jedynie z dwóch typów podjednostek α i β . Receptor ten odgrywa rolę w modulacji uwalniania różnych neuroprzekaźników i jest zaangażowany w procesach pamięciowych i uczenia.

Jedynym receptorem jonotropowym pobudzonym przez neuroprzekaźnik monoaminergiczny – serotoninę (do monoamin należą noradrenalina, dopamina i serotonina), jest receptor 5HT₃, przepuszczalny dla kationów Ca²⁺, Na⁺, K⁺. U ludzi zidentyfikowano 5 odmian podjednostek wchodzących w skład tego receptora – 5-HT₃(A-E). Rozmieszczenie receptora 5-HT₃ ograniczone jest do neuronów. Receptor 5-HT₃ występuje na neuronach zarówno ośrodkowego jak i obwodowego układu

nerwowego. Między innymi jest zlokalizowany na zakończeniach czuciowych nerwu błędnego i tam odpowiada za występowanie odruchu wymiotnego. Dlatego też antagoniści tego receptora stosowani są jako leki (ondansetron/Zofran) przeciwdziałające wymiotom wywołanym radio- i chemioterapią.

Struktura receptora GABA-A została opisana w latach 80. XX w. Tym niemniej aktywujący go GABA był już znany od końca wieku XIX, a jego rolę jako głównego hamującego neuroprzekaźnika w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) opisano w latach 50. XX wieku. Połączenie GABA z receptorem powoduje otwarcie kanału chlorkowego i napływ jonów Cl^- do wnętrza neuronu. Dotychczas sklonowano pięć klas glikoproteinowych podjednostek (dla rozróżnienia oznaczanych greckimi literami) oraz zidentyfikowano piętnaście genów kodujących różne odmiany tych podjednostek (sześć odmian podjednostki α , cztery podjednostki β , trzy podjednostki γ , jedną δ oraz dwie podjednostki ρ). Farmakologiczne właściwości GABA-A zależą od rodzaju podjednostek, z jakich zbudowany jest dany receptor. Obok wiązania się z endogennym GABA, receptor ten jest punktem uchwytu dla wielu substancji, włączając wiele leków (barbiturany, benzodiazepiny i neurosteroidy), które są modulatorami aktywności receptora.

Przedstawicielem receptora o budowie tetramerycznej jest receptor NMDA, przepuszczalny dla jonów wapniowych i sodowych. Do jego aktywacji są potrzebne nie tylko „siły chemiczne” w postaci głównego agonisty – kwasu glutaminowego i związania koagonisty – glicyny, ale również odpowiednio duża depolaryzacja, która umożliwia usunięcie fizycznej blokady w postaci jonu magnezowego, tkwiącego we wnętrzu kanału receptora. Dotychczas sklonowano dwie główne rodziny podjednostek NR1 i NR2, z których ostatnia jest reprezentowana przez 4 geny (NR2A-D). Kompleks receptora NMDA może być modulowany przez wiele niezależnych czynników, włączając jony Zn^{2+} , które go hamują, a na ostateczny wynik tej modulacji ma ponadto wpływ określona kompozycja podjednostkowa.

Jonowe receptory dla glutaminianu pośredniczą w uruchamianiu większości neurotransmisyjnych sygnałów pobudzających i kontrolują procesy uczenia i zapamiętywania. Tym niemniej, ich nadmierna stymulacja prowadzi do masywnego napływu jonów wapniowych do komórki, co powoduje wystąpienie ekscytotoksyczności i prowadzi do śmierci komórki. Proces ekscytotoksyczności

przyczynia się do występowania wielu schorzeń neurologicznych, takich jak padaczka czy też uszkodzeń mózgu wynikających z czasowego niedokrwienia (ischemii) oraz różnych schorzeń neurodegeneracyjnych (np. choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera, płasawica Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne).

Badania nad rolą różnych klas receptorów jonotropowych w patofizjologii OUN są szeroko zakrojone na świecie i są prowadzone także w wielu polskich ośrodkach naukowych. Przytaczamy tu zaledwie kilka nazwisk polskich badaczy, którzy kierują zespołami zajmującymi się różnymi aspektami funkcjonowania tych receptorów w kontekście niektórych procesów: Jolanta Skangiel-Kramska z IBD PAN – rola w plastyczności przekazywania synaptycznego; Jerzy Łazarewicz (IMDiK PAN) – badania w procesie mózgowej ischemii; Andrzej Pilc i Piotr Popik (IF PAN) oraz Wojciech Danysz (obecnie Merz Pharmaceuticals, Frankfurt nad Menem, Niemcy) – badania w kierunku przeciwdepresyjnego, przeciwlękowego i przeciwwzależnieniowego potencjału ligandów receptorów jonotropowych dla glutaminianu; Krystyna Ossowska (IF PAN) – badania nad przeciwparkinsonowskim działaniem ligandów glutaminianergicznych; Władysław Lasoń (IF PAN) – badania nad przeciwpadaczkowym działaniem modulatorów receptora GABA-A; Krzysztof Wędzony (IF PAN) – badania nad wpływem leków przeciwpsychotycznych na symptomy schizofrenii modelowane przez postnatalne podawanie antagonistów receptora NMDA.

Receptory z wewnętrzną, enzymatyczną aktywnością kinaz

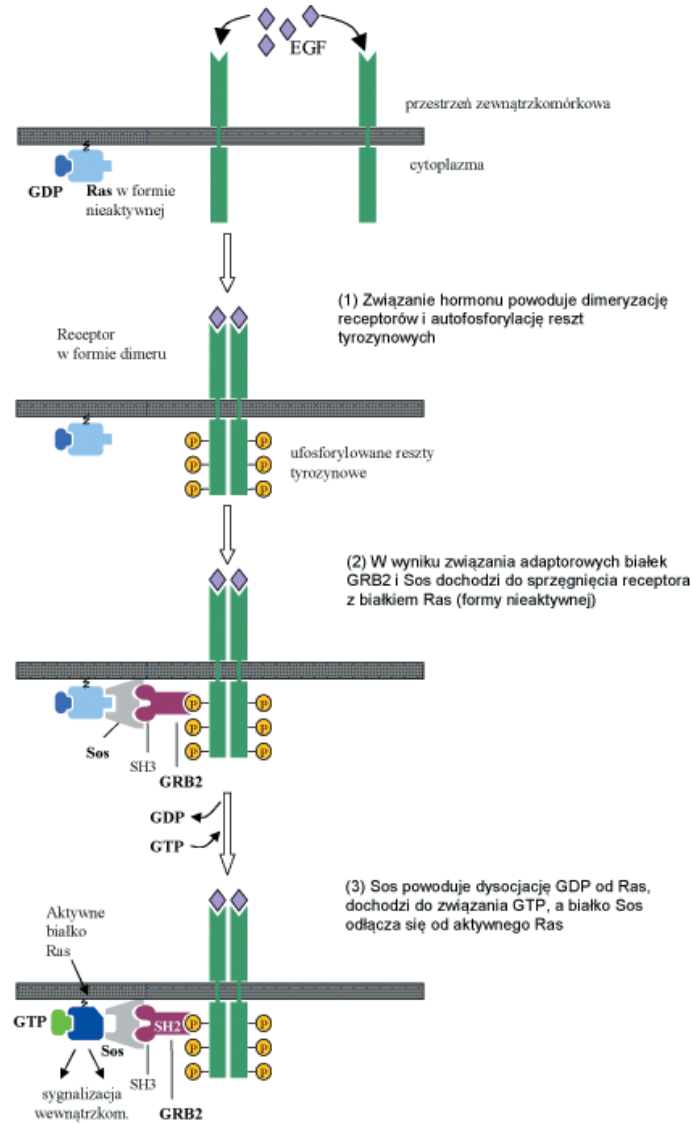
Nadrodzina receptorów mających aktywność kinaz cechuje się, podobnie jak nadrodziny innych receptorów, swoistym, charakterystycznym schematem budowy. Receptory te składają się z trzech domen - zewnętrznej domeny receptorowej składającej się z łańcucha polipetydowego wiążącego agonistę, krótkiej, pojedynczej domeny transbłonowej o strukturze α helisy i katalitycznej domeny cytosolowej. Domena cytosolowa zbudowana jest także z łańcucha polipeptydowego; każdy z łańcuchów składa się z 400-700 reszt aminokwasowych. N-koniec białka receptorowego znajduje się na zewnątrz komórki, a C-koniec w jej wnętrzu. W skład domeny katalitycznej receptora jako jej integralna część wchodzi kinaza

tyrozynowa lub serynowo-treoninowa. Domena katalityczna zawiera również miejsca wiązania ATP. Te miejsca katalizują przeniesienie grupy fosforanowej z ATP na własną cząsteczkę w ramach autofosforylacji lub z udziałem określonej kinazy na reszty tyrozynowe czy serynowe i treoninowe różnorodnych białek. W obecnym podrozdziale będziemy głównie opisywać problematykę związaną z receptorami o aktywności kinaz tyrozynowych szeroko rozpowszechnionych w organizmach zwierzęcych, wspominając jedynie o receptorach mających aktywność kinaz serynowo-treoninowych i o receptorach pozbawionych w wewnętrznej części katalitycznej aktywności kinaz.

Receptory związane z aktywnością kinazy tyrozynowej (RTK) obejmują receptory dla tak zróżnicowanych substancji sygnałowych jak hormony peptydowe (np. insulina, hormon wzrostu), cytokiny i czynniki wzrostu. Czynniki wzrostu nerwu (NGF) i czynnik wzrostu naskórka (EGF) zostały odkryte i scharakteryzowane jako pierwsze substancje tego typu, a ich odkrywcy – włoska uczona, biolog ewolucyjny – Rita Levi-Montalcini oraz amerykański biochemik – Stanley Cohen zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w 1986 r. Innymi przykładowymi czynnikami wzrostu są czynniki z płytek krwi (PDGF), fibroblastów (FGF), nabłonka naczyń (VEGF), hepatocytów (HGF), czynnik wzrostu insulinopodobny (IGF-1), a także inne czynniki kontrolujące wzrost komórek nerwowych, jak czynnik wzrostu nerwu pochodzenia mózgowego (BDNF) i neurotrofiny (NT-3, NT-4/5, NT-6).

Związanie czynników wzrostu do zewnątrzkomórkowej domeny receptora i postępująca za tym zmiana konformacyjna powoduje łączenie się ze sobą sąsiadujących receptorów (dimeryzacja). Umożliwia to interakcję między domenami cytoplazmatycznymi tych receptorów i ich wzajemną autofosforylację, oraz rekrutację różnych białek cytoplazmatycznych. Do RTK wiążą się głównie białka charakteryzujące się obecnością tzw. domen SH2 lub SH3. Domeny SH2 stanowią fragment około 100 aminokwasów identycznych z fragmentem występującym w cytoplazmatycznej kinazie tyrozynowej Src i zostały odkryte w wielu białkach komórkowych. Domeny te rozpoznają ufosforylowaną tyrozinę w receptorze, jednak specyficzność wiązania danego białka zależy od sekwencji aminokwasowych otaczających tyrozinę i domenę SH2. Domeny SH3, zawierające około 60 aminokwasów wiążą się z fragmentami białek bogatych w

prolinę. Odkrycie tych domen było przełomem w poznaniu mechanizmu działania kinaz tyrozynowych uczestniczących w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Należy dodać, że aktywacja receptora może być zakończona przez działanie fosfataz tyrozynowych, które usuwają od receptora grupy fosforanowe wprowadzone uprzednio w odpowiedzi na sygnał zewnątrzkomórkowy.



Ryc. 6. Budowa i schemat aktywacji receptora o własnej aktywności kinazy tyrozyny (RTK), na przykładzie receptora EGF. Opis w tekście

Szlak przykazywania sygnałów w komórce z udziałem receptorów zawierających kinazę tyrozynową przebiega następująco: po związaniu agonisty, następuje dimeryzacja i autofosforylacja receptora (Ryc. 6). Następnie zaktywowany RTK wiąże tzw. białka adaptorowe, Shc i Grb2, zawierające domeny SH2/SH3. Białka te z kolei werbują białko Sos w pobliże błony plazmatycznej.

Białko Sos jest aktywatorem wymiany nukleotydów guanylanowych w białku Ras. Białko Ras to małe białko G, nieaktywne z przyłączonym GDP, a aktywne po wymianie GDP na GTP. Aktywne białko Ras stymuluje serynowo-treoninową kinazę Raf, która rozpoczyna kaskadę tzw. kinaz MAP (białka aktywowane przez miogeny) omówionych przy końcu tego podrozdziału.

Obok opisanych powyżej białek adaptorowych Shc i Grb2, również inne białka posiadające domeny SH2 mogą wiązać się z aktywowanymi RTK. W przypadku aktywacji receptora PDGF dochodzi do przyłączenia białek GAP (białko aktywujące GTP-azę Ras, ułatwiające defosforylację GTP i powstanie GDP, przez co Ras staje się nieaktywne) czy białek należących do rodziny Src. Do zaaktywowanych RTK wiążą się także białka enzymatyczne, takie jak fosfolipaza C typu γ (Ryc. 4) czy PI3K (patrz podrozdział: *Udział lipidów w przekazywaniu informacji*). Fosfolipaza C typu γ stanowi inną formę izoenzymatyczną niż fosfolipaza C typu β , aktywowana przez białko G_q , jednak obydwa typy fosfolipazy C hydrolizują PIP_2 , a więc rozpoczynają szlak sygnalizacyjny, w którym powstaje IP_3 i DAG (Ryc. 4). Z kolei PI3K fosforyluje występujący w błonie plazmatycznej PIP_2 do PIP_3 i powoduje inicjację szlaku sygnalizacyjnego PI3K/Akt. Należy także wspomnieć, że czas trwania sygnału PIP_3 w komórce zależy od aktywności fosfatazy PTEN (z ang.: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), która odcinając reszty fosforanowe od PIP_3 przełącza sygnał ponownie do PIP_2 . Stwierdzono, że PTEN pełni rolę supresora nowotworów, a brak aktywności tego enzymu obserwowany jest w wielu zaawansowanych nowotworach u ludzi.

Oprócz receptorowych kinaz tyrozynowych, istnieje liczna i niezwykle ważna dla sygnalizacji wewnątrzkomórkowej grupa białek – tzw. niereceptorowych kinaz tyrozynowych (np. src, Abl), występujących w cytoplazmie i niezwiązanych z żadnym receptorem, a których odkrycie miało

zasadniczy wpływ na powiązanie podłoża niektórych schorzeń z anomaliami w sygnalizacji komórkowej. Badania prowadzące do odkrycia niereceptorowych kinaz tyrozynowych miały swój początek, gdy dwaj naukowcy z Uniwersytetu w Kaliforni – J. Michael Bishop i Harold E. Varmus (nagrodzeni następnie Nagrodą Nobla w 1989 r.), ogłosili w 1976 r., że mechanizm powstawania mięsaka (sarcoma) u kurcząt polega na indukowanej wirusem (*Rous sarcoma virus*) zmianie prawidłowego genu w genomie kurczęcia w gen nowotworowy, który nazwali *src*. Na podstawie badań prowadzonych również w latach 70., Owen N. Witte i Dawid Baltimore wykazali, że wirus Abelson u myszy działa na podobnej zasadzie, zmieniając prawidłowy gen przez dołączenie własnego (wirusowego) materiału genetycznego i powodując, że białko ABL, kodowane przez zmieniony gen, stymulowało nadmierne podziały komórkowe. Równocześnie, Ray Erikson wykazał w 1978 r., że pochodzący z wirusa *Rous sarkoma* transformujący czynnik (*v-Src*) jest kinazą białkową.

Kinaza Src okazała się być elementem, który pełni rolę ważnego integratora sygnałów zainicjowanych przez stymulację receptorów różnego typu. Wprawdzie początkowo pojmowano sygnalizację zachodzącą z udziałem GPCR i RTK jako odrębne i niezależne szlaki informacji wewnątrzkomórkowej, jednak później okazało się, że mogą one „współpracować” między sobą oraz z innymi szlakami sygnalizacji właśnie za pośrednictwem cytoplazmatycznych, niereceptorowych kinaz tyrozynowych i to jeszcze zanim dojdzie do konwergencji sygnałów na kinazach MAP (Ryc. 7). Niereceptorowe, cytoplazmatyczne kinazy tyrozynowe należące do rodzin wspomnianych już Src i Abl oraz Fyn i Fak mogą wiązać się z błonowymi receptorami RTK i być przez nie aktywowane. Ponadto kinaza Fak może być aktywowana sygnałem pochodzącym z macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez stymulację tzw. receptorów integrynowych. W ten sposób, dokonuje się integracja sygnału pochodzącego od receptorowych i cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych, który przy udziale białka Ras jest następnie przekazywany do kaskady kinaz MAP. Sygnał dochodzący tą drogą do kinaz MAP może być już wcześniej modulowany przez elementy szlaków sygnalizacyjnych uruchamianych przez GPCR (Ryc. 7). Wykorzystują one różne białka pomostowe do regulowania aktywności, co najmniej trzech rodzin cytoplazmatycznych kinaz

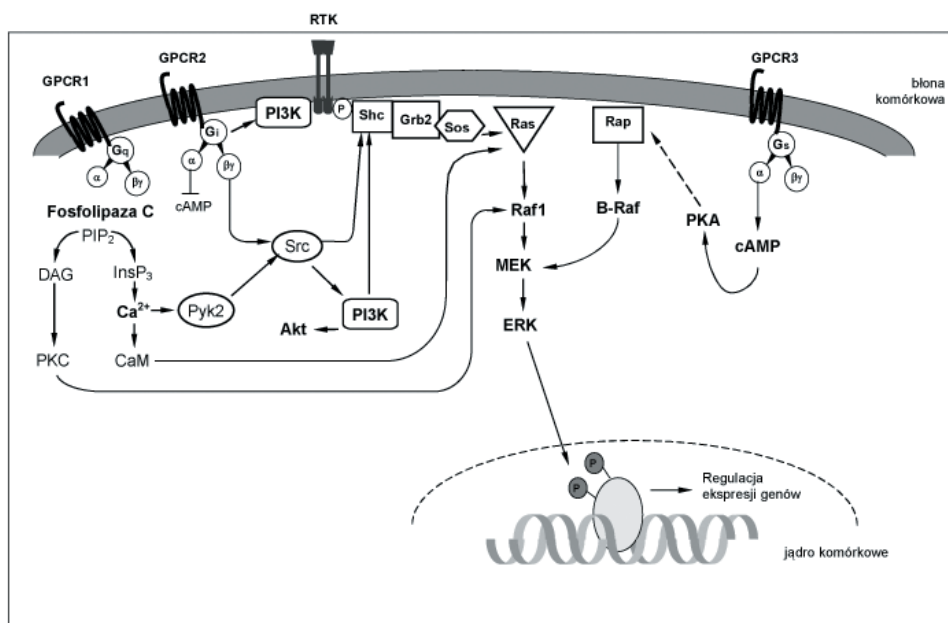
tyrozynowych. Do aktywacji kinaz Src dochodzi: (i) przy udziale PI3K pobudzonej przez podjednostki β/γ białek G_i ; (ii) w procesie internalizacji niektórych receptorów GPCR; (iii) drogą cytoplazmatycznych kinaz Pyk2 i FAK, których aktywność jest częściowo regulowana przy udziale fosfolipazy C typu β i PKC. Również podjednostki α białek G mogą być zaangażowane w przekazywaniu sygnału do kinaz MAP. Dzieje się to na drodze niezależnej od Ras, za pośrednictwem innych małych białek GTP-azowych np. z rodziny Rap i Rho. Oczywiście nie należy rozumieć, że opisane powyżej sposoby dialogu pomiędzy szlakami sygnalizacji wewnątrzkomórkowej zachodzą równocześnie w każdej komórce. Przytoczono tu jedynie możliwości różnych sposobów komunikacji, które jednak ściśle zależą od typu tkanki i składu białkowego danej komórki oraz kolejności docierających doń sygnałów.

Jak wspomniano, RTK mogą być aktywowane przez cytokiny. Jednak inne klasy cytokin mogą również aktywować inne typy receptorów, włączając receptory metabotropowe dla chemokin, a także receptory pozbawione własnej aktywności kinaz tyrozynowych. W tym przypadku do pobudzonego receptora cytokin, np. typu interleukin, łączą się po dimeryzacji receptorów cytoplazmatyczne kinazy tyrozynowe. Na przykład receptory dla interleukiny 2 wykorzystują cytoplazmatyczne kinazy tyrozynowe z rodziny tzw. „kinazy Janusa” (Jaks); fosforylują one białka z rodziny Stat, mogące służyć jako czynniki transkrypcyjne. Druga droga, która może być wykorzystywana przez te receptory prowadzi poprzez kinazy cytoplazmatyczne należące do rodziny Src (np. Lck, Syk), do białek Ras by wreszcie trafić do kinaz MAP.

Przedstawicielem grupy receptorów, w skład których wchodzi kinaza serynowo-treoninowa jest receptor transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β). Po przyłączeniu agonisty, tzw. receptory typu II dimeryzują, a następnie po przyłączeniu dwóch następnych (receptory typu I) tworzą tetramer. Receptory typu II mają konstytutywną kinazę serynowo-treoninową. Po utworzeniu tetramery następuje fosforylacja reszt serynowych receptorów typu II, aktywacja kinazy serynowo-treoninowej receptorów typu I i rozpoczęcie kaskady sygnałów. Agonistą tych receptorów jest TGF- β , jedna z najważniejszych cytokin, hamująca wzrost większości komórek.

Kinazy MAP (MAPK), na które przekazywany jest sygnał z białka Raf, są podobnie jak Raf kinazami serynowo-treoninowymi, które pośredniczą w przekazywaniu sygnałów związanych z różnymi procesami, włączając proliferację, różnicowanie, przeżycie, śmierć i transformację nowotworową. Tę różnorodność nietrudno zrozumieć, bo przy uważnym czytaniu podrozdziału nasuwa się nieodparty wniosek, że właściwie „wszystkie drogi prowadzą do kinaz MAP. Rodzina ssaczych MAPK składa się z ERK (tzw. kinazy regulowane zewnątrzkomórkowymi sygnałami), p38 MAP i kinazy c-Jun NH2-końca (JNK, znanej także jako białkowa kinaza aktywowana stresem – SAPK). Każda z tych kinaz występuje w kilku izoformach. Aktywność każdej MAPK jest regulowana na zasadzie hierarchicznie zorganizowanej osi, składającej się, co najmniej z 3 elementów: MAPK kinazy kinazy (MAP3K), MAPK kinazy (MAP2K) oraz MAPK, a każdy element faktycznie reprezentuje oddzielną rodzinę enzymów. „Scenariusz” jest następujący: MAP3K-y (aktywowane przez białka zwane MAPK4 lub przez GTP-azy) fosforylują i aktywują MAP2K-y, które z kolei fosforylują i aktywują MAPK-y. Kaskada reakcji wykorzystujących aktywację przez fosforylację biegnie dalej – aktywne MAPK-y fosforylują różne wewnątrzkomórkowe białkowe substraty, włączając czynniki transkrypcyjne, (np. Elk-1, c-Jun, ATF2, and p53), które modulują aktywność transkrypcyjną genów. Rycina 7 przedstawia ogólny schemat sygnalizacji wewnątrzkomórkowej nakreślonej w niniejszym rozdziale.

Omówione w niniejszym podrozdziale szlaki sygnalizacyjne przewijają się przez tematykę badawczą wielu polskich laboratoriów. Wśród nich pragniemy wymienić zespół Teresy Zalewskiej (IMDiK PAN) badający rolę sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej i kinaz Fak i Pyk w procesie zmian indukowanych niedokrwieniem mózgowym oraz zespół Bogusławy Budziszewskiej (IF PAN), zajmujący się badaniem udziału szlaku MAPK na efekty stosowania różnych leków psychotropowych.



Ryc. 7. Ogólny schemat sieci sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Receptory metabotropowe (GPCR1, GPCR2, GPCR3) sprzężone z różnymi podtypami białek G, po aktywacji zewnątrzkomórkowym sygnałem uruchamiają wtórne przekaźniki informacji: cykliczny AMP (cAMP), inozytolo-(1,4,5)-trisfosforan (IP₃) i 1,2-diacylglicerol (DAG) oraz następuje zwiększenie poziomu wolnych jonów wapnia w komórce. Zaktywowanie receptorów o własnej aktywności kinaz tyrozynowych (RTK) uruchamia kaskadę fosforylacji białek, która prowadzi do kinaz MAP, a następnie sygnał dociera do jądra komórkowego i moduluje aktywność transkrypcyjną genów kodujących różne białka komórkowe. „Dialog” pomiędzy szlakami uruchamianymi przez GPCR i RTK może się odbywać dzięki cytoplazmatycznym niereceptorowym kinazom tyrozynowym, np. Src. Dalszy opis w tekście

Zaburzenia przepływu informacji a stany chorobowe i farmakoterapia

Wszystkie badania prowadzone w obszarze badań podstawowych mają na celu nie tylko poznanie i zrozumienie funkcjonowania człowieka i otaczającego go środowiska. Zawsze rozważane jest także ich zastosowanie praktyczne. Tak też było z osiągnięciami naukowymi dokonanymi w XX w. i zapewne będzie z tymi, które nadejdą w wieku XXI. Intensywny rozwój nauk biologicznych i techniki umożliwiające powstanie nowych metod badawczych zaowocowały wiedzą, która

stanowi inspirację do opracowywania i zastosowania różnych strategii w leczeniu.

Konsekwencją odkryć naukowych dokonywanych w różnych okresach minionego wieku było wprowadzenie do leczenia antybiotyków, leków nasercowych, leków psychotropowych, leków przeciwalergiczych oraz leków stosowanych w schorzeniach neurodegeneracyjnych i chorobach nowotworowych. Mechanizm farmakologicznego działania większości ze wspomnianych leków opiera się na ingerowaniu w biologię komórki za pośrednictwem receptorów błonowych, (czyli na etapie odbierania sygnału przez komórkę) lub na modulowaniu aktywności enzymów syntetyzujących biologicznie czynne cząsteczki. Wiele grup leków, o różnych wskazaniach terapeutycznych, działa bezpośrednio na receptor (blokując go lub pobudzając) lub w sposób pośredni modulując sygnał chemiczny odbierany przez receptor (np. powodując przedłużone działanie monoamin na receptor przez inhibitory wychwytu zwrotnego). Antagoniści receptorów β -adrenergicznych stanowią jedną z najważniejszych grup leków stosowanych w chorobach układu krążenia (chorobie niedokrwiennej serca, nadciśnieniu i niektórych typach zaburzeń rytmu serca). Działanie terapeutyczne tych tzw. β -adrenolityków, wynika z blokowania przez nie receptorów β -adrenergicznych i hamowania działania amin katecholowych (noradrenaliny, adrenaliny). Natomiast pobudzanie receptora β_2 -adrenergicznego jest wywoływane przez działanie leków β -adrenomimetycznych, które powodują rozkurczanie oskrzeli i są stosowane w terapii astmy oskrzelowej. Z kolei w alergiach stosuje się leki blokujące receptor histaminowy H_1 , co znosi objawy wywołane histaminą, będącą jednym z bardziej znaczących mediatorów tych reakcji.

Strategia hamowania aktywności enzymów jest wykorzystywana zarówno w przypadku leków stosowanych w leczeniu chorób układu krążenia (inhibitory konwertazy angiotensyny, podwyższające ilość krążącej angiotensyny I i obniżające stężenie angiotensyny II i III), jak i w farmakoterapii miażdżycy (statyny będące inhibitorami reduktazy hydroksymetylo-koenzymu A, odpowiedzialnej za syntezę cholesterolu) i w mechanizmie działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, które hamują aktywność cyklooksygenazy.

Jeszcze inną strategią wykorzystywaną w farmakologii jest stosowanie leków, które są prekursorami neurotransmiterów (np. aminokwas L-DOPA dla syntezy dopaminy, stosowany w chorobie Parkinsona), bądź podawanie gotowych preparatów hormonalnych (np. insulina, hormony steroidowe) i witamin (wspomagających działanie enzymów) w celu uzupełnienia ich endogennego poziomu.

Z kolei leki przeciwdepresyjne powodują nasilenie transmisji serotonergicznej i/lub noradrenergicznej, wykorzystując mechanizm pośredni polegający na zwiększaniu dostępności monoamin, (czyli aktywatorów receptorów) w przestrzeni synaptycznej. Może to być osiągnięte dwiema drogami: w wyniku hamowania wychwyty zwrotnego neurotransmiterów, bądź też przez hamowanie aktywności enzymów rozkładających monoaminy. Inhibitory tego enzymu – monoaminooksydazy (MAO), są wykorzystywane zarówno w leczeniu schorzeń depresyjnych jak i chorobie Parkinsona. Inhibitory innego enzymu, acetylocholinoesterazy rozkładającej acetylocholinę, zwiększają stężenie endogennej acetylocholiny w sąsiedztwie receptorów cholinergicznym i są stosowane w leczeniu choroby Alzheimera.

Z tych przytoczonych przykładów wyraźnie widać, że farmakologiczny mechanizm działania stosowanych obecnie i nieustannie udoskonalanych leków jest ukierunkowany na etap odbierania sygnału przez receptor błonowy i na modulowanie aktywności enzymów katabolizujących bądź syntetyzujących niektóre biologicznie czynne cząsteczki. Jednak okazuje się, że wywoływane przez leki zwiększanie (w sąsiedztwie receptorów) dostępności monoamin, które następnie stymulują odpowiednie receptory, może mieć dalekosiężne konsekwencje. W przypadku leków przeciwdepresyjnych, obok modulacji gęstości receptorów w błonie komórkowej, aktywności białek G i szlaku cyklicznego AMP, leki te wywołują zmiany w aktywności i ekspresji kinaz białkowych: PKA i zależnej od wapnia i kalmoduliny kinazy II (CaM II). Ponadto mogą modulować niektóre procesy zależne od PKC i wywoływać zmiany w ekspresji genów kodujących białka receptorowe i czynniki transkrypcyjne. Co więcej, leki te nasilają także ekspresję genów kodujących czynnik wzrostu, BDNF i jego receptor, trkB. Odkrycie, że podawanie BDNF wywołuje efekt przeciwdepresyjny (modele

zwierzęce) oraz, że chroniczne podawanie leków przeciwdepresyjnych nasila neurogenezę w hipokampie dorosłych szczurów, doprowadziły do zaproponowania molekularnej i komórkowej hipotezy depresji. Uważa się, że to właśnie te powyżej wspomniane zmiany adaptacyjne, pojawiające się po dłuższym podawaniu leku, są odpowiedzialne za jego efekt przeciwdepresyjny.

Obecnie wiadomo, że u podłoża praktycznie wszystkich schorzeń występujących u ludzi leżą nieprawidłowości w komunikacji wewnątrz – i międzykomórkowej oraz błędy w jej kontroli, które pojawiają się na etapie posttranslacyjnej modyfikacji białek, bądź też wynikają z mutacji genetycznych. Modyfikacja białek zachodząca w wyniku fosforylacji/defosforylacji służy jako „molekularny przełącznik” i w sposób dynamiczny reguluje aktywność enzymów oraz bezpośrednio interakcje między białkami. Wewnątrzkomórkowe sygnały, które zapoczątkowują modyfikacje są często wzmacniane i rozprzestrzeniane przez kaskadę kolejnych reakcji fosforylacji. W ten sposób ścieżki przekazywania sygnału determinują odpowiedź komórki na określony sygnał, a aberracje w funkcjonowaniu sygnałowych kinaz i ich substratów są zaangażowane w powstawaniu różnych schorzeń. Do roku 2002 znaleziono mutacje w ludzkich genach kodujących 21 receptorowych i 9 cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych oraz 11 fosfataz. Konsekwencją tych mutacji jest pojawienie się w organizmie białek o nadmiernej bądź zahamowanej aktywności enzymatycznej. Wywołany mutacją patologiczny wzrost aktywności 15 receptorowych i 6 cytoplazmatycznych kinaz białkowych jest obserwowany w różnych postaciach nowotworów. Przeciwnie, stwierdzono, że zahamowanie aktywności 6 receptorowych i 3 niereceptorowych kinaz towarzyszy takim schorzeniom jak dystrofia siatkówki oka, cukrzyca insulino-niezależna, dziedziczny obrzęk limfatyczny i ciężki deficyt odporności. Z kolei brak aktywności 9 białkowych fosfataz tyrozynowych zauważono w niektórych postaciach neuropatii (dystrofii mięśniowej, epilepsji mioklonicznej) i nowotworów (rak prostaty, tarczycy i sporadyczne nowotwory piersi).

Jednymi z najbardziej obiecujących leków przeciwnowotworowych są inhibitory receptorowych i niereceptorowych białkowych kinaz tyrozynowych, a zaburzenia w związanych z nimi szlakach przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego są obecnie uznawane za podłoże schorzeń nowotworowych. Przyczyny zaburzeń

mogą być różne i spowodowane bądź nadmierną ekspresją receptorów dla czynników wzrostowych, które są sprzężone z kinazą tyrozyny, bądź też mutacją powodującą, iż receptor jest utrzymywany w konstytutywnie aktywnej formie. W połowie 2001 r., wprowadzono pierwszy lek przeciwnowotworowy, który został ukierunkowany na jedną z niereceptorowych kinaz tyrozynowych. Lekiem tym jest Gleevec/Glivec, który blokuje kinazę Abl i znajduje zastosowanie w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej. Kilka lat później okazało się, że lek ten może także hamować z podobną siłą kinazę tyrozynową receptora PDGF i został zaakceptowany do leczenia nowotworów jelit i żołądka. Z kolei, znaczne podwyższenie ekspresji receptora EGF obserwuje się w wielu nowotworach pochodzenia nabłonkowego (nowotworach płuc i sutka). Mutacja samego białka Ras, prowadząca do powstania stale aktywnej (onkogennej) formy receptora EGF została stwierdzona w 25% przypadków nowotworów u ludzi. Wśród leków, wprowadzonych ostatnio do kliniki i ukierunkowanych na „naprawę” tego szlaku jest Cetuximab – przeciwciało, które wiąże się do zewnątrzkomórkowej domeny receptora EGF oraz gefitinib (Iressa), będący silnym inhibitorem związanej z EGF kinazy tyrozynowej i stosowany w raku trzustki i niedrobnokomórkowych nowotworach płuc. W różnych fazach badań klinicznych znajdują się kolejne związki potencjalnie przeciwnowotworowe, zaprojektowane w celu zahamowania angiogenezy (przeciwciała domeny VEGF) oraz inne, z grupy inhibitorów p38MAPK, zaprojektowane w kierunku zastosowania w schorzeniach o podłożu autoimmunologicznym. Czytelników zainteresowanych tymi zagadnieniami zachęcamy do lektury podręcznika Farmakologii, w którym jeden z rozdziałów jest poświęcony lekom w kontekście sygnału wewnątrzkomórkowego (*Lektury uzupełniające*, patrz: *Książki*).

Jeszcze inną strategią leczniczą, zaproponowaną w wyniku osiągnięć badawczych z przełomu XX i XXI w. są próby stosowania przeszczepów komórek macierzystych w celu regeneracji rejonów mózgu uszkodzonych pod względem funkcjonalnym. Również polscy naukowcy mają zasługi w tym obszarze. I tak, zespół pod kierownictwem Krystyny Domańskiej-Janik (IMDiK PAN) wyselekcjonował progenitorowe komórki neuralne pochodzące z krwi pępowinowej, mogące w odpowiednich warunkach środowiskowych różnicować się do komórek o

fenotypie neuronów, astrocytów i komórek glejowych. Dotychczas jedynie transplantacja szpiku kostnego jest procedurą ogólnie akceptowaną klinicznie (w przypadku nowotworów krwi). Kolejne badania pokażą czy transplantacja komórek macierzystych stanie się efektywną terapią przy różnych schorzeniach neurologicznych i stanach funkcjonalnego uszkodzenia mózgu.

Ostatnia, przyznana w XX w. Nagroda Nobla (2000 r.) za „*odkrycia w badaniach nad przekazywaniem sygnału w systemie nerwowym*” (laureaci Arvid Carlsson, Paul Greengard, Eric R. Kandel), może być rozpatrywana jako symboliczne podsumowanie badań minionego stulecia nad sygnalizacją komórkową: **neuroprzebieżnik** (odkrycie neuroprzebieżnikowego charakteru dopaminy, A. Carlsson) – **sygnał wewnątrzkomórkowy** (uruchamianie kaskad sygnałowych po zadziałaniu dopaminy i innych neuroprzebieżników, fosforylacja lub defosforylacja pewnych kluczowych białek prowadząca do modulacji ich funkcji, P. Greengard) – „**chemia neuronów**” u **podłoża procesów mentalnych** (proces uczenia jako wynik wzmocnienia sygnału w synapsie; stwierdzenie, że mechanizm formowania pamięci u ssaków jest podobny i zlokalizowany w synapsie, E. R. Kandel). W XXI w., jedna z Nagród Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny została przyznana za odkrycie "*zjawiska interferencji RNA – wyciszanie genów przez dwuniciowe fragmenty RNA*" (laureaci Andrew Z. Fire i Craig C. Mello, 2006 r.). Badania te są podwaliną do opracowywania nowych strategii terapeutycznych – terapii genowych, które zapewne będą się rozwijały w XXI w. przy nieodłącznym postępie biochemii, biotechnologii, bioinformatyki, bioobrazowania i wszystkich specjalności naukowych z przedrostkiem „bio” w nazwie, które już dziś łączą się w badaniach biomedycznych.

W niniejszym podrozdziale opisano praktyczne zastosowania odkryć naukowych XX w., dotyczące przekazywania sygnałów komórkowych. Na co dzień nie zastanawiamy się nad tym, że to właśnie dzięki tym odkryciom zawdzięczamy ogromny rozwój farmakologii, otrzymywanie leków rekombinowanych (np. insulina, somatotropina, erytropoetyna) stosowanych w terapiach substytucyjnych, powszechne działania profilaktyczne (stosowanie szczepionek), diagnostykę schorzeń metabolicznych i innych, co w połączeniu z ogólną poprawą warunków bytowania ludzi przedłużyło i poprawiło jakość ich życia.

Uwagi końcowe

Poczynając od drugiej połowy XX wieku w wielu dziedzinach nauk biologicznych nastąpił ogromny postęp. Jednym z największych odkryć rzucających nowe światło na problem organizacji życia w wielokomórkowych organizmach jest wiedza dotycząca „porozumiewania” między komórkami różnych tkanek, a także poznanie sygnalizacji przekazywanej wewnątrz danej komórki. Prowadzone badania pokazały jak działa hormon uwalniany z jednych tkanek i docierający w strumieniu krwi do komórek docelowych innych tkanek, jak działają i jak są zbudowane receptory. Wykazano, że w mechanizmie przekazywania sygnałów biorą udział nie tylko białka, lecz i lipidy. Specyficzne domeny wchodzące w skład cząsteczek określonych związków ułatwiają wiązanie lipid – białko lub białko – białko i zmieniając konformację cząsteczki powodują zmianę funkcji tych związków. Odkryto, że przekaźnikiem informacji mogą być jony wapnia, a także, że taką funkcję pełni gaz, tlenek azotu. Wytlumaczono jak działają czynniki wzrostu, a także jak określone sygnały docierając do jądra komórkowego zmieniają ekspresję genów i wywołują określoną odpowiedź komórki.

Wymienione powyżej odkrycia, szczególnie te nagrodzone Nagrodą Nobla, były poczynając od lat 50. XX wieku zazwyczaj wynikiem prac zespołów międzynarodowych pracujących w laboratoriach amerykańskich. Problematyka przekazywania sygnałów w komórce stawała się jednak coraz bardziej przedmiotem badań innych ośrodków naukowych na świecie. W Polsce „wybuch” badań związanych z tą tematyką nastąpił w latach 90. w momencie przemian ustrojowych i ekonomicznych. Towarzyszyło im także intensywne wzajemne szkolenie. Wyrazem tego było zorganizowanie w 1993 r. w Warszawie przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne Szkoły Zimowej nt. „Przekazywanie sygnałów w komórce”, a także w tym samym czasie organizacja Konferencji Receptorowych w Łodzi. Konferencje w Łodzi były organizowane przez Polskie Towarzystwo Badań Układu Nerwowego a także Zakład Amin Biogennych PAN, z wiodącym udziałem Jerzego Z. Nowaka i Jolanty B. Zawilskiej. Wynikiem tych działań była publikacja przez Wydawnictwo Naukowe PWN książek wymienionych poniżej wśród *Lektur uzupełniających*. Należy także wspomnieć o dorocznych konferencjach naukowo-szkoleniowych organizowanych przez Instytut

Farmakologii PAN w Krakowie (Szkoły Zimowe IF PAN), zainicjowanych w 1984 r., na których omawiane są najnowsze odkrycia dotyczące mechanizmów działania różnych leków psychotropowych w kontekście sygnałów wewnątrzkomórkowych, a prezentowane wykłady pojawiają się w postaci drukowanej w formie skryptów publikowanych każdego roku.

Jak powiedziano, problematyka przekazywania sygnałów w komórce stawała się coraz bardziej popularna i obecnie prawie już nie ma biologicznych czy biomedycznych laboratoriów w Polsce, które w mniejszym czy w większym zakresie nie zajmowałyby się tą tematyką w różnych jej aspektach. Konieczność zawężenia ram tego rozdziału nie pozwoliła nam na wymienienie wszystkich znakomitych badaczy zajmujących się tą dziedziną wiedzy w Polsce. Liczymy na wyrozumiałość z ich strony. Poznanie sieci sygnalizacji wewnątrzkomórkowej dokonane w XX wieku spowodowało przełom w pojmowaniu etiologii wielu chorób i stworzyło podwaliny do nowych strategii farmakoterapii. W procesie tym aktywnie uczestniczyli polscy naukowcy, pracując nie tylko w macierzystych laboratoriach, lecz także w wielu miejscach na świecie podczas naukowych staży. W tym kontekście, ściśle rozgraniczenie osiągnięć naukowych na polskie i zagraniczne wydaje się być nieuzasadnione, bowiem nieskrępowana wymiana pomysłów, doświadczeń, metod i poglądów jest podstawową cechą efektywnej pracy naukowej.

Lektura uzupełniająca

Książki:

- Konarska L. (red) (1995): Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Nalepa I. (2003): Leki a przekaźnictwo wewnątrzkomórkowe, w: Farmakologia. Podstawy farmakoterapii (red. W. Kostowski i Z.S. Herman), Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa. (Wydanie III), str. 100-126.
- Nowak J.Z., Zawilska J.B. (red) (2004) Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. (Wydanie II, rozszerzone).

Czasopisma:

- Barańska J. (1997): Wapń jako pierwotny i wtórny przekaźnik informacji. Udział Ca^{2+} w cyklu komórkowym, sekrecji i adhezji. *Kosmos* 46:33-44.
- Barańska J., Czajkowski R., Sabała P. (2004): Cross-talk between nucleotide receptor-induced signaling pathways in serum-deprived and non-starved glioma C6 cells. *Advances in Enzyme Regulation* 44: 219-232.
- Barańska J., Przybyłek K., Sabała P. (1999): Capacitative calcium entry. Glioma C6 as a model of nonexcitable cells. *Pol. J. Pharmacol.* 51: 153-162.
- Berridge M. J. (1993): Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 361: 315-325.
- Carafoli E., Santella L., Bianca D., Brini M. (2001): Generation, control and processing of cellular calcium signals, w: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (red. G.D. Fasman) 36: 107-260
- Collingridge G.L., Olsen R.W., Peters J, Spedding M.A. (2009): Nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56: 2-5.
- Dulak J., Deshane J., Józkowicz A. Agarwal A. (2008): Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation* 117: 231-241.
- Duszyński J., Koziół R., Brutkowski W., Szczepanowska J., Zabłocki K. (2006): The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 380-387.
- Gilman A.G. (1987): G proteins, transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
- Gryglewski R.J., Żmuda A., Korbut R., Kręcioch E., Bieron K. (1977): Selective inhibition of thromboxane A2 biosynthesis in blood platelets. *Nature* 267: 627-628.
- Hepler J.R., Gilman A.G. (1992): G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17: 383-387.
- Hokin M.R., Hokin L.E. (1953): Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* 203: 967-977.

- Leśniak W., Kuźnicki J. (2006): Binding and functional characteristics of two E-box motifs within the S100A6 (calcyklin) gene promoter. *J. Cell Biochem.* 97: 1017-1024.
- Michell R.H. (1975): Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 81-147.
- Monod J., Wyman J., Changeux J.P. (1965): On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12: 88-118.
- Murad F. (1994): Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv. Pharmacol.* 26: 19-33.
- Nalepa I. (1994): The effect of psychotropic drugs on the interaction of protein kinase C with second messenger systems in the rat cerebral cortex. *Pol. J. Pharmacol.*, 46: 1-14.
- Nalepa I., Vetulani J. (1993): Enhancement of the responsiveness of cortical adrenergic receptors by chronic administration of the 5-hydroxytryptamine uptake inhibitor citalopram. *J. Neurochem.*, 60: 2029-2035.
- Nishizuka Y. (1992): Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
- Putney J.W. Jr. (1986): A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1-12.
- Rodbell M. (1992): The role of GTP-binding proteins in signal transductions; from the sublimely simple to the conceptually complex. *Curr. Top. Regul.* 32: 1-49.
- Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J., Schulz I. (1983): Release of Ca^{2+} from nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306: 67-69.
- Sutherland E.W., Robinson G.A. (1966): The role of cyclic-3'5'AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacol. Rev.* 18: 145-161.
- Vetulani J., Sulser F. (1975): Action of various antidepressant treatments reduces reactivity of noradrenergic cyclic AMP-generating system in limbic forebrain. *Nature* 257: 495-496.