

KATARZYNA NAŁĘCZ Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN Pasteura 3, 02-093 Warszawa E-mail: knal@nencki.gov.pl

## KINAZY I FOSFATAZY BIAŁKOWE ZALEŻNE OD JONÓW WAPNIA

Cechą charakterystyczną procesów życiowych, zachodzących w komórce, jest ich wzajemna regulacja pozwalająca na utrzymanie homeostazy, a więc utrzymanie określonych stężeń jonów i metabolitów w odpowiednich przedziałach komórkowych. Komórka, aby przeżyć, musi mieć także zdolność reagowania na zmiany zachodzące w jej otoczeniu, a wywołane pojawieniem się bodźca elektrycznego, zapachowego, świetlnego, a także zmianą stężeń specyficznych substancji, na przykład neuroprzekaźników, hormonów, czynników wzrostowych czy pewnych toksyn. Sygnały zewnętrzne docierają do powierzchni komórek i poprzez oddziaływanie ze swoistymi receptorami uruchamiają cały szereg procesów prowadzących ostatecznie do ekspresji specyficznych genów, a w efekcie do zmiany ilości pewnych białek.

## KASKADA PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW W KOMÓRCE I KINAZY BIAŁKOWE UCZESTNICZĄCE W TYM PROCESIE

W procesie przekazywania sygnałów z receptora na błonie komórkowej do jądra bierze udział szereg białek i związków niskocząsteczkowych zwanych także przekaźnikami wtórnymi. I tak na przykład receptory posiadające 7 fragmentów transbłonowych i połączone z białkami G (np. receptor muskarynowy acetylocholiny, metabotropowe receptory glutaminianu, receptory noradrenaliny, 5-hydroksytryptaminy, angiotensyny II, wazopresyny parathormonu czy czynników uwalniających hormony tyrotropowe i gonadotropowe) wpływają na aktywność podjednostek α tych białek. W konsekwencji podjednostka α białek G oddysocjowuje od podjednostek  $\beta$  i  $\gamma$ , następuje hydroliza GTP związanego z podjednostką α, co może prowadzić do aktywacji kanałów, wpływać na aktywność cyklazy adenylowej, zmieniając poziom cyklicznego AMP (cAMP), czy wreszcie aktywować fosfolipazę C(β1), dając w rezultacie trisfosfoinozytol uwalniający Ca<sup>2+</sup> z endoplazmatycznego retikulum (BEE-RIDGE 1993). Dimer  $\beta/\gamma$  może z kolei aktywować inne izoformy fosfolipazy C (β2 i β3). Poziom trisfosfoinozytolu i następnie wapnia wzrasta także w wyniku działania fosfolipazy C(γ1) aktywowanej przez receptory o aktywności kinaz tyrozynowych (np. receptory antyge-

nów czy czynników wzrostowych). Dodatkowo wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia w komórkach pobudliwych może nastąpić po otworzeniu kanałów wapniowych w błonie plazmatycznej, przy czym mogą to być kanały zarówno regulowane napięciem, jak i związaniem ligandu, na przykład glutaminianu. Z kolei aktywacja receptorów związanych z cyklazą guanylową, na przykład receptora atriopeptydów (przedsionkowych czynników powodujących wydalanie sodu z moczem), czy receptorowych form cyklazy guanylowej aktywowanej peptydami z jaj jeżowca morskiego lub niewrażliwymi na temperaturę enterotoksynami bakteryjnymi (CHINKERS i GARBERS 1991) powodują wzrost stężenia cyklicznego GMP (cGMP).

Zwiększenie ilości niskocząsteczkowych wtórnych przekaźników powoduje aktywację szeregu kinaz białkowych. I tak cAMP stymuluje białkową kinazę A powodując jej dysocjację na dimer zawierający dwie podjednostki regulatorowe i dwa aktywne monomery podjednostek katalitycznych (TAYLOR i współaut. 1990). Aktywność białkowej kinazy A może być stymulowana w wyniku działania takich hormonów, jak hormon uwalniający hormony kortykotropowe, hormon tyreotropowy, adrenokortykotropowy, hormony stymulujące komórki interstycjalne i pęcherzyki Graffa, a także przez prostacykliny PGI<sub>2</sub>, peptydy opioidowe czy adrenalinę i noradrenalinę (poprzez receptor  $\beta$ ).

Wzrost stężenia cGMP, spowodowany aktywacją odpowiednich receptorów, a także rozpuszczalnych form cyklazy guanylowej aktywowanych NO, CO lub rodnikiem hydroksylowym OH, aktywuje białkową kinazę G (TAMIR i współaut. 1996), co wpływa na regulację takich procesów fizjologicznych jak rozluźnienie mięśni, agregację płytek krwi, przekazywanie sygnałów za pomocą neuroprzekaźników czy migrację neutrofili (VANUFFELEN i współaut. 1996).

Aktywacja fosfolipazy C, prowadząca do hydrolizy fosfolipidów inozytolowych daje w rezultacie zwiększenie stężenia diacyloglicerolu i trisfosfoinozytolu, a w dalszej konsekwencji także wzrost stężenia cytozolowego wapnia z  $10^{-8}-10^{-7}$  do  $10^{-6}$  M. Diacyloglicerol pojawia się także jako produkt reakcji katalizowanych przez fosfolipazy A<sub>2</sub> i D. Wzrost ilości wolnego wapnia i diacyloglicerolu prowadzi do aktywacji białkowej kinazy C, stymulowanej przez fosfolipidy i Ca<sup>2+</sup>. Za aktywację szlaku fosfoinozytolu są odpowiedzialne takie hormony, jak tyroksyna, wazopresyna, gonadotropina, tyreotropina, angiotensyna II/III, czy adrenalina działająca przez receptor α. Stymulacja komórki, prowadząca do uwolnienia wapnia z endoplazmatycznego retikulum lub jego napływ z zewnątrz komórki, prowadzą także do związania wapnia przez szereg innych białek w komórce. Należy do nich między innymi kalmodulina, białko o ogromnym znaczeniu dla regulacji procesów komórkowych, aktywujące między innymi białkowe kinazy zależne od wapnia i kalmoduliny, znane w piśmiennictwie anglojęzycznym jako tak zwane CaM kinazy.

Pobudzenie receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej (receptory czynników wzrostowych, czy czynnika insulinopodobnego), a także receptorów cytokin, rozpoczyna odpowiednio całe kaskady fosforylacji, w których biorą udział rozpuszczalne, cytozolowe białka o aktywności kinaz tyrozynowych, chociażby droga prowadząca przez białka JAK i STAT w przypadku pobudzenia przez cytokiny (SCHINDLER i DARNELL 1995) czy poprzez pośredniczące w przekazywaniu sygnału białka Ras (MARSHALL 1995), co w tym przypadku prowadzi ostatecznie do pobudzenia kaskady kinaz specyficznych w stosunku do seryny i treoniny (ZENNER i współaut. 1995).

#### FOSFORYLACJA BIAŁEK, A REGULACJA PROCESÓW KOMÓRKOWYCH

Regulacja aktywności szeregu białek, na przykład enzymów, transporterów, czy czynników transkrypcyjnych, jest kilkuetapowa. Białka te w pierwszym rzędzie muszą ulec ekspresji w określonej tkance lub typie komórek, następnie często tworzą kompleksy oligomeryczne, to znaczy składające się z podjednostek, ulegają także pewnym modyfikacjom posttranslacyjnym (HAN i MARTINAGE 1992), odpowiedzialnym za zmianę stopnia aktywacji lub lokalizację w komórce i ostatecznie reagują na zmiany stężeń jonów i metabolitów w swoim otoczeniu. Modyfikacje posttranslacyjne białek, poza wymienioną oligomeryzacją, obejmują takie procesy chemiczne, jak wytworzenie mostków dwusiarczkowych między cysteinami, hydroksylację proliny i lizyny, siarczanowanie tyrozyny, adenylację tyrozyny, karboksylację glutaminianu, amidację C-końca, amidację grup ε-aminowych lizyny lub metylację, acetylację czy tworzenie wiązań peptydowych tego aminokwasu (HAN i MARTINAGE 1992), a także N- lub O-glikozylację (PAULSON 1989), ADP-rybozylację (HANSON i współaut. 1993), czy zakotwiczanie białek w błonie za

pomocą połączenia C-końca z etanolaminą, glikanem i glikozylofosfatydyloinozytolem (UDENFRIEND 1995). Białka także mogą podlegać metylacji na swoim C-końcu, czy acylacji (najczęściej formylacji, acetylacji i myrystylacji) na swoim N-końcu. Ponadto wolne grupy SH mogą także tworzyć wiązanie tioeterowe w procesie izoprenylacji (GLOMSET i współaut. 1990) lub palmitylacji (MILLIGAN i współaut. 1995), przy czym ten ostatni proces, częściej zachodzący bliżej N-końca białek, jest odwracalny. Także procesy fosforylacji białek należą do zjawisk odwracalnych, a stopień ufosforylowania białek w komórce zależy od regulacji przeciwstawnych procesów katalizowanych odpowiednio przez kinazy i fosfatazy białkowe.

Białka podlegają fosforylacji przez kinazy specyficzne w stosunku do reszt tyrozynowych, serynowych, treoninowych, a także histydyny i asparaginianu. W przypadku fosforylacji tyrozyny, proces ten jest katalizowany przez kinazy tyrozynowe, zarówno będące receptorami, jak i kinazy rozpuszczalne. Osobną grupę stanowią kinazy fosforylujące białka na resztach serynowych i treoninowych. Należą do tej grupy wymienione już kinazy A, C, i G. Pewnym nietypowym białkiem jest kinaza MAP, kinaza białkowa aktywowana przez czynniki wywołujące mitozę (ang. mitogen activated kinase). Jest to właściwie grupa białek, które biorą udział w kaskadzie fosforylacji aktywowanych przez białka ras i kinazy tyrozynowe. Kinazy MAP są fosforylowane na resztach tyrozyny i treoniny przez kinazę kinazy MAP.

Została także opisana dwuetapowa fosforylacja histydyny i asparaginianu, zaobserwowana początkowo u bakterii, a ostatnio także w organizmach eukariotycznych (SWANSON i współaut. 1994). W procesie tym kinaza ulega najpierw autofosforylacji na reszcie histydynowej, po czym wzajemnie fosforylują się podjednostki białka, a następnie w procesie przeniesienia fosforanu ulega ufosforylowaniu asparaginian.

Na rodzinę kinaz białkowych składa się ponad 300 różnych białek. Badania strukturalne, zainicjowane analiza struktury krystalicznej białkowej kinazy A (KNIGHTON i współaut. 1991) wykazały, że część katalityczna tworzy pewną powtarzającą się strukturę trzeciorzędową. Ciekawe, że wszystkie typy kinaz białkowych, których strukturę poznano, charakteryzują się pewnymi wspólnymi cechami części lub podjednostek katalitycznych, przede wszystkim powtarzalnością struktur β i ułożeniem dwu α-helis w stosunku do nich. Ponadto wszystkie zawierają pętlę bogatą w glicyny, odpowiedzialną za wiązanie ATP, a zwłaszcza reszty fosforanowej (HANKS i współaut. 1988). Zachowana jest także typowa struktura miejsca wiążącego substrat, mimo że różnią się sekwencje aminokwasowe w pobliżu fosforylowanych seryn, treonin, tyrozyn (tab. 1)

Tabela 1. Własności niektórych kinaz białkowych (wg TAYLOR i współaut. 1990)

Kinaza	Struktura czwartorzędowa	Mr (kDa)	Aktywujący ligand	Lokalizacja w komórce	Fosforylowana sekwencja
РКА	$R_2C_2$	R 48,0 C 40,8	cAMP	cytoplazma i błony	LRRAS*GL
PKG	$E_2$	140	cGMP	cytoplazma	LRRAS*GL
РКС	Е	77–80	Ca <sup>2+</sup> , DAG,	cytoplazma i	PLRTLS*VAAKK
			PS	błony	
CaM kinaza II	dekamer,	α 60	Ca <sup>2+</sup> , CaM	cytoplazma	PLARTLS*VAGLPGKK
	dodekamer	β 58			
		γ 59			
		δ 60			
EGFR	Е	170	EGF	transbłonowy	LEDAEY*AARRRRG
Receptor insuliny	$\alpha_2\beta_2$	60	insulina	transbłonowy	IEDNQY8TAREG

CaM — kalmodulina; DAG — diacyloglicerol; EGF — epidermalny czynnik wzrostowy; EGFR — receptor EGF; PS — fosfatydyloseryna.

## KINAZY BIAŁKOWE REGULOWANE PRZEZ Ca<sup>2+</sup>

# KINAZY REGULOWANE PRZEZ Ca<sup>2+</sup>-KALMODULINĘ

Pierwszą poznaną kinazą białkową regulowaną przez Ca<sup>2+</sup>-kalmodulinę była kinaza fosforylazy glikogenu. Kalmodulina jest jednym z głównych receptorów Ca<sup>2+</sup> w wielu komórkach. Kompleks kalmoduliny z wapniem aktywuje szereg enzymów, w tym kinazy białkowe. Część z nich to kinazy katalizujące fosforylację jednego, docelowego białka, jak kinaza lekkiego łańcucha miozyny, kinaza fosforylazy glikogenu czy kinaza III (kinaza czynnika elongacyjnego) (HANSON i SCHULMAN 1992). Przez Ca<sup>2+</sup>-kalmodulinę są aktywowane także kinazy białkowe fosforylujące wiele białek (CaM kinazy), tak zwane kinazy wielofunkcyjne, do których należą kinaza I, kinaza II i kinaza IV.

Najlepiej poznaną jest CaM kinaza białkowa II, w przypadku której holoenzym jest oligomerem składającym się głównie z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , występujących w stosunku od 6:1 do 1:8 (VALLANO 1990); stwierdzono także obecność innych izoform,  $\gamma$  i  $\delta$  (TOBIMATSU i FU-JISAWA 1989). Chociaż izomery te są kodowane przez różne geny stwierdzono 85% homologii w sekwencji aminokwasów i zachowanie homologii funkcjonalnej, podobnej do formy  $\alpha$ . I tak w podjednostce  $\alpha$  aminokwasy od 1 do 263–274 stanowią część katalityczną, homologiczną do innych kinaz regulowanych przez kalmodulinę (kinazy lekkiego łańcucha miozyny, czy kinazy fosforylazy). Region od 275 do 314 aminokwasu jest częścią regulatorową, zawierającą sekwencje odpowiedzialne za autoinhibicję i wiązanie kalmoduliny. Koniec C odpowiada natomiast za oligomeryzację i asocjację podjednostek w holoenzym (LEVINE i SA-HYOUN 1987, LIN i współaut. 1987).

CaM kinaza II nie jest aktywna przy niskim stężeniu wapnia (ryc. 1), gdy jednak stężenie tego jonu wzrasta do 0,5–1  $\mu$ M, 4 jony Ca<sup>2+</sup> wiążą się z 1 cząsteczką kalmoduliny, co zwiększa jej powinowactwo do wielu białek. W przypadku CaM kinazy II, kalmodulina wiąże się do dwu sąsiednich podjednostek z krótkimi domenami: zasądową (<sup>296</sup> Arg-Arg-Lys<sup>298</sup>) i hydrofobową (Fen<sup>293</sup>, Ala<sup>295</sup>) (PUTKEY i WA-XHAM 1996). Domena ta jest odpowiedzialna także za autoinhibicję kinazy (KELLY i współaut. 1988). Zmiana konformacyjna po związaniu kalmoduliny powoduje autofosforylację między podjednostkami na Tre<sup>286</sup>, a następnie związanie Mg<sup>2+</sup> -ATP. Zachodząca dalej między podjednostkami lub w obrębie tej samej podjednostki autofosforylacja na resztach seryno-

wych i treoninowych powoduje dalszą zmianę konformacyjną kinazy, a w konsekwencji powolną dysocjację kalmoduliny. Autofosforylacja powoduje, że kinaza może dalej katalizować fosforylację białek w sposób niezależny od wapnia. Autofosforylacja na Tre<sup>286</sup> zmniejsza zdolność kalmoduliny do oddysocjowania (HANSON i SCHULMAN 1992), gdy jednak miejsce wiążące kalmodulinę zostanie odsłonięte w wyniku powolnej dysocjacji, kinaza ulega raptownej autofosforylacji na Tre<sup>305</sup> i Tre<sup>306</sup> w reakcji niezależnej od  $Ca^{2+}$  (PATTON i współaut. 1990), co hamuje dalszą aktywację przez kalmodulinę. Proces fosforylacji może być odwrócony przez fosfatazy białkowe 1 lub 2A (HASHIMOTO i współaut. 1987, LOU i SCHUL-MAN 1989, PATTON i współaut. 1990).

Specyficzność zależnej od kalmoduliny białkowej kinazy I (CaM kinazy I) przypomina raczej aktywność kinazy białkowej A (NAIRN i GREENGARD 1987), zwłaszcza jeśli chodzi o fosforylację synapsyny I. Kinaza ta jest monomerem i także podlega autofosforylacji na treoninie.

Zależna od kalmoduliny białkowa kinaza IV, zwana także kinazą Gr ze względu na jej obfite występowanie w ziarnistych komórkach w móżdżku (ang. cerebellar granule cells) wykazuje 32% identyczności z kinazą II (MEANS i współaut. 1991). Składa się z dwóch podjed-



Rys. 1. Struktura i mechanizm działania kinazy białkowej II zależnej od  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny.

a. Uproszczony schemat struktury z zaznaczeniem poszczególnych rejonów białka. b. Schemat aktywacji i autofosforylacja kinazy. K — domena katalityczna, I — domena odpowiedzialna za hamowanie, P — miejsca ufosforylowane, kształt hantli odpowiada kalmodulinie ze związanym wapniem (zmodyfikowane wg HANSON i SCHULMANA 1992).

nostek o masach cząsteczkowych 56 i 67 kDa. Kinaza ta także ulega autofosforylacji na treoninie, jednak efekty tego procesu są stosunkowo złożone, bowiem aktywność przestaje być zależna od wapnia i jednocześnie wzrasta powinowactwo do ATP i substratu. Kinaza ta występuje w jądrze (JENSEN i współaut. 1991) i jej aktywność wiąże się ze stymulacją transkrypcji, która zachodzi przez fosforylację CREB (białka wiążącego element odpowiadający za wiązanie cAMP, ang. cAMP-responsive element binding protein) (ENSLEN i współaut. 1994). Kinaza IV wiąże ponad 3 mole fosforanu na mol enzymu (Okuno i współaut. 1995), przy czym początkowa fosforylacja zachodząca na bogatym w seryny końcu N białka jest niezbędna do aktywacji. Kinaza IV też zawiera w swojej strukturze domenę odpowiedzialną za autoinhibicję (TOKUMITSU i współaut. 1994). W ciągu ostatnich trzech lat zidentyfikowano także kaskadę kinaz zależnych od kalmoduliny, w której kinaza CaM kinazy fosforyluje i aktywuje kinazy I i IV (LEE i EDELMAN 1994, SELBERT i współaut. 1995, TOKUMITSU i współaut. 1994). Kaskada kinaz CaM może aktywować kinazy MAP (ERK-2, JNK-1, p38) i stymuluje transkrypcję przez fosforylację Elk-1 (ENSLEN i współaut. 1996).

### KINAZA BIAŁKOWA C

Odkrycie przez Nishizukę i współpracowników (INOUE i współaut. 1977, TAKAI i współaut. 1977) nowej białkowej kinazy niezależnej od cAMP, stymulowanej natomiast przez fosfolipidy i wapń, doprowadziło do nazwania tego enzymu kinazą białkową C, ze względu na stwierdzoną zależność od Ca2+. Sklonowanie szeregu izoform tej kinazy pozwoliło na określenie, że tylko tak zwane klasyczne izoformy ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II i  $\gamma$ ) są regulowane przez wapń. Okazało się, że w izoformach kinazy C występują cztery zachowane w ewolucji domeny C1-C4 (COUSSENS i współaut. 1986). Domena C1 (rys. 2) zawiera fragment sekwencji bogaty w cysteiny, podwojony w większości izoenzymów; fragmenty te tworzą miejsce wiążące diacyloglicerol i estry forbolu, aktywatory kinazy C (BELL i BURNS 1991). Przed domeną bogatą w cysteiny, bliżej końca N białka, znajduje się sekwencja odpowiedzialna za autoinhibicję kinazy, tak zwana domena pseudosubstratowa (HOUSE i KEMP 1987). Domena C2 jest rozpoznawana przez kwaśne lipidy i w niektórych izoformach stanowi także miejsce wiążące Ca<sup>2+</sup> (NEWTON 1993, 1995a). Głównymi lipidowymi aktywatorami są fosfatydyloseryna i diacyloglicerol; częściową aktywację enzymu można także zaobserwować w obecności bisfosforanu inozytolu, kwasu fosfatydowego czy arachidonowego (BELL i BURNS 1991). Domeny C3 i C4 stanowią część katalityczną i zawierają miejsca wiążące ATP oraz substrat białkowy (TAYLOR i RADZIO-ANDZELM 1994). Region oddzielający część regulatorową kinazy od jej części katalitycznej ulega łatwo proteolizie, gdy enzym jest przyczepiony do błony (NEW-TON 1995b). Oddzielona w ten sposób domena katalityczna (kinaza białkowa M) jest uwolniona od pseudosubstratu i jest formą aktywną (INOUE i współaut. 1977).



Rys. 2. Schemat struktury izoenzymów białkowej kinazy C.

Przedstawiono budowę izoform klasycznych (a), nowych (b) i atypowych (c). Literami C1–C4 oznaczono domeny konserwatywne i zaznaczono liczbę tak zwanych "palców cynkowych w domenie C1".

Znanych jest 11 izoenzymów kinazy białkowej C i można je, dzięki podobieństwu strukturalnemu, podzielić na trzy grupy (NI-SHIZUKA 1995). Najlepiej są poznane tak zwane klasyczne (konwencjonalne) izoformy, a mianowicie α, βI i βII (powstające w wyniku alternatywnego składania RNA) oraz y. Ich domena C2 zawiera miejsce wiążące wapń. Drugą dobrze scharakteryzowaną grupą są tak zwane nowe białkowe kinazy C ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\tau$ ,  $\mu$ ), które są podobne do form konwencjonalnych, z tą różnicą, że domena C2 nie ma grup funkcyjnych wiążących Ca<sup>2+</sup>. Trzecią grupę stanowią tak zwane formy atypowe,  $\zeta$  i  $\lambda$ , które nie mają domeny C2, a w domenie C1 posiadają tylko 1 fragment bogaty w cysteiny, co najprawdopodobniej jest przyczyną ich braku wrażliwości na estry forbolu.

Białkowa kinaza C fosforyluje reszty serynowe i treoninowe, w których pobliżu znajdują się aminokwasy zasadowe (KENNELY i KREBS 1991). Aktywacja kinazy polega na odsłonieciu domeny pseudosubstratowej, która w tej postaci łatwo ulega proteolizie. Związanie aktywatorów, jakimi są estry forbolu lub diacyloglicerol, z kinazą powoduje związanie enzymu z błoną (KRAFT i ANDERSON 1983), a także obniżenie stężeń wapnia i fosfatydyloseryny, a więc ligandów domeny C2, niezbędnych do aktywacji (NEWTON i KERANEN 1994). Związanie fosfatydyloseryny, a w klasycznych izoformach także wapnia, do domeny C2, zwiększa powinowactwo kinazy do ujemnie naładowanych fosfolipidów, a także powoduje zmianę konformacyjną, ułatwiającą zajście proteolitycznego rozszczepienia części katalitycznej i regulatorowej.

Białkowa kinaza C jest syntezowana w formie nieaktywnej, a następnie podlega trzem kolejnym fosforylacjom (NEWTON 1995b). Pierwsza fosforylacja (katalizowana przez nie zidentyfikowaną kinazę) na  $\text{Tre}^{500}$  zachodzi jeszcze w trakcie syntezy białka. Wywołana tą fosforylacją zmiana konformacyjna powoduje autofosforylację na końcu C kinazy ( $\text{Tre}^{641}$ ), a następnie na Ser<sup>660</sup>, co doprowadza do uwolnienia enzymu do cytozolu. Wydaje się, że pierwsza fosforylacja jest procesem odwracalnym (NEWTON 1995b), co sugeruje, że białkowa kinaza C może być regulowana przez dwa niezależne szlaki, a mianowicie przez fosforylację/defosforylację wpływającą na subkomórkową lokalizację enzymu i poprzez przekaźniki drugiego rzędu ułatwiające przyłączenie kinazy do błon.

Znanych jest wiele białkowych substratów kinazy C, ich fosforylacja może wpływać na funkcję receptorów, kanałów, a także zmieniać procesy metaboliczne czy ekspresję genów. Wszystkie te zjawiska mają wpływ z jednej strony na wzrost i podział komórek, a z drugiej — na procesy różnicowania (CLEMENS i współaut. 1982).

#### FOSFATAZY BIAŁKOWE

Około 30% białek komórkowych jest w formie ufosforylowanej. Proces odwrotny, a więc usunięcie reszty fosforanowej jest katalizowane przez fosfatazy białkowe. Fosfatazy białkowe, biorąc po uwagę podobieństwa strukturalne, podzielono na cztery grupy (rys. 3). Pierwszą stanowią fosfatazy specyficzne w stosunku do fosfoseryny i fosfotreoniny, tak zwana grupa PP (zwana też PSTP), do której należą PP1, PP2A i PP2B, znana jako kalcyneuryna (COHEN 1989). Fosfataza PP2C, chociaż także wykazująca specyficzność do ufosforylo-



Rys. 3. Schemat budowy fosfataz serynowo/treoninowych z grupy PP.

Liczby z prawej oznaczają liczbę aminokwasów w poszczególnych białkach. W przypadku fosfatazy PP2B pokazano schemat budowy podjednostki A i gwiazdkami zaznaczono miejsca interakcji z regulatorową podjednostką B (zmodyfikowane wg COHEN i COHENA 1989). wanych reszt seryny i treoniny, nie wykazuje podobieństw strukturalnych w stosunku do pierwszej grupy, ponadto jest stymulowana przez jony magnezu. Ufosforylowane reszty tyrozyny podlegają hydrolizie dzięki fosfatazom tyrozynowym (PTP), a także fosfatazom, które defosforylują, oprócz fosfotyrozyn, także fosfoserynę i fosfotreoninę. Wreszcie czwartą grupę stanowią fosfatazy o niskiej masie cząsteczkowej, które hydrolizują arylowe estry fosforanu.

Fosfataza PP2B (kalcyneuryna), chociaż wykazuje specyficzność w stosunku do ufosforylowanych reszt seryny i treoniny jest jednak unikalna, ponieważ jej aktywność jest regulowana przez Ca/kalmodulinę. Kalcyneuryna jest heterodimerem, składającym się z katalitycznej podjednostki A (58 i 59 kDa) i mniejszej, regulatorowej podjednostki B (19 kDa). Izoenzymy kalcyneuryny A powstają w wyniku alternatywngo składania RNA, chociaż opisano także izoformę, będącą produktem innego genu (COHEN i COHEN 1989). Kalcyneuryna B jest kodowana przez pojedynczy gen we wszystkich tkankach z wyjątkiem jąder, w których występują trzy izoenzymy - produkty genów zlokalizowanych na trzech różnych chromosomach (WANG i współaut. 1996). Kalcyneuryna A wykazuje ponad 40% homologii z PP1 i PP2A (ITO i współaut. 1989), jest ona jednak o 170 aminokwasów dłuższa na C-końcu. Rejon ten ma zdolność wiązania kalmoduliny i podjednostki B (KINCAID i współaut. 1988), zawiera

także domenę (aminokwasy 457-482) odpowiedzialną za autoinhibicję (HASHIMOTO i współaut. 1990). Usunięcie tej domeny powoduje, że kalcyneuryna staje się fosfatazą niezależną od Ca<sup>2+</sup> (O'KEEFE i współaut. 1992). W miejscu aktywnym, związane koordynacyjnie z histydyną, asparaginianem i asparaginą znajdują się Zn<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> (GRIFFITH i współaut. 1995). Uważa się, iż metale ułatwiają defosforylację poprzez uzyskanie właściwej orientacji białkowego substratu, a także poprzez zwiększenie elektrofilowości fosforu i aktywację wody do nukleofilowego ataku w stosunku do substratu. Kalcyneuryna B posiada cztery domeny wiążące wapń, o tak zwanej strukturze "EF-hand", podobne do takich domen w kalmodulinie (BABU i współaut. 1988). Podjednostka B jest myrystylowana na swoim końcu N, chociaż rola tej posttranslacyjnej modyfikacji jest dość niejasna i nie wydaje się, aby miała służyć zakotwiczaniu w błonie; postulowany jest raczej efekt stabilizujący strukturę heterodimeru (KENNEDY i współaut. 1996).

Aktywności fosfataz białkowych, podobnie jak i kinaz podlegają wielu procesom regulacji. Kalcyneuryna jest głównie hamowana przez leki immunosupresyjne, na przykład FK506--FPKBP i cyklosporynę-cyklofilinę (LIU i współaut. 1991). Związki te w limfocytach T prowa-

dzą do zahamowania defosforylacji czynnika transkrypcyjnego NF-Atp (JAIN i współaut. 1993), który kontroluje ekspresję genów kodujących interleukinę-2 i czynnik martwicy nowotworów. Kalcyneuryna reguluje także aktywność jądrowej fosfatazy 1, a więc ma w konsekwencji wpływ na stopień ufosforylowania CREB - białka wiążącego element odpowiadający za wiązanie cAMP (BITO i współaut. 1996). Kalcyneuryna hamuje stymulowana przez wapń aktywność czynnika transkrypcyjnego AP-1 na poziomie indukcji c-fos (SU i współaut. 1996). Niedawno wykazano spadek aktywności kalcyneuryny w chorobie Alzheimera, co być może ma związek z nadmierną fosforylacją białka tau (LADNER i wsłpółaut. 1996). Poziom fosforylacji białek zależy od aktywności dwu przeciwstawnych sobie procesów, fosforylacji i defosforylacji. Jak ważne są oba te procesy, może świadczyć fakt, iż geny kodujące kinazy i fosfatazy białkowe stanowią 4% genomu organizmów eukariotycznych (HUNTER 1995). Nie wszystkie kinazy czy fosfatazy są bezpośrednio regulowane przez wapń, tym niemniej należy wziąć pod uwagę fakt, że katalizowane reakcje są zwykle tylko elementem całej kaskady procesów, w których przynajmniej jeden jest od wapnia zależny.

### CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASES AND PHOSPHATASES

#### Summary

Signal transduction pathways promote the stimulation of protein kinases activities, resulting in protein phosphorylation — a reversible posttranslational modification. Increased levels of the second messengers, such as cAMP, cGMP, calcium and diacylglycerol raise the activity of protein kinases A, G, and C, respectively. Binding of agonists and cytokines to their receptors results in a cascade of tyrosines' phosphorylation catalysed by either receptor or soluble tyrosine kinases. Out of protein kinases directly regulated by Ca<sup>2+</sup>, the protein kinase C and calcium/calmodulin-dependent multifunctional kinases are characterized in more detail. The structural similarities, especially in the catalytic domain, are emphasized. A classification of protein phosphatases (PP) is presented. The PP2B (calcineurin) protein is described and compared with the other members of the PP family.

#### LITERATURA

- BABU Y. S., BUGG C. E., COOK W. J., 1988. Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. J. Mol. Biol. 204, 191–204.
- BELL R. M., BURNS D. J., 1991. Lipid activation of protein kinase C. J. Biol. Chem. 266, 4661–4664.
- BERRIDGE M. J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 361, 315–325.
- BITO H., DEISSEROTH K., TSIEN R. W., 1996. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent swith for hippocampal gene expression. Cell 87, 1203–1214.
- CHINKERS M., GARBERS D. L., 1991. Signal transduction by guanylyl cyclases. Annu. Rev. Biochem. 60, 553–575.

- CLEMENS M. J., TRAYER I., MENAYA J., 1982. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. J. Cell Sci. 103, 881–887.
- COHEN P., 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. Annu. Rev. Biochem. 58, 453–508.
- COHEN P., COHEN P. T. W., 1989. Protein phosphatases come of age. J. Biol. Chem. 264, 21435–21438.
- COUSSENS L., PARKER P. J., RHEE L., YANG-FENG T. L., CHEN E., WATERFIELD M. D., FRANCKE U., ULLRICH A., 1986. Multiple distinct forms of bovine and human protein kinase C suggests diversity in cellular signaling pathways. Science 233, 859–866.

- ENSLEN H., SUN P., BRICKEY D., SODERLING S., KLAMO E., SODERLING T. R., 1994. Characterization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. J. Biol. Chem. 269, 15520–15527.
- ENSLEN H., TOKUMITSU H., STORK P. J. S., DAVIS R. J., SO-DERLING T. R., 1996. Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10803–10808.
- GLOMSET J. A., GELB M. H., FARNSWORTH C. C., 1990. Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. Trends Biochem. Sci. 15, 139–142.
- GRIFFITH J. P., KIM J. L., KIM E. E., SINTCHAK M. D., THOM-SON J. A., FITZGIBBON M. J., FLEMING M. A., CARON P. R., HSIAO K., NAVIA M. A., 1995. X-Ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. Cell 82, 507–522.
- HAN K. -K., MARTINAGE A., 1992. Post-translational chemical modification(s) of proteins. Int. J. Biochem. 24, 19–28.
- HANKS S. K., QUINN A. M., HUNTER T., 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 241, 42–52.
- HANSON P. I., SCHULMAN H., 1992. Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases. Annu. Rev. Biochem. 61, 559–601.
- HANSON K., ABOUL-ELA N., JACOBSON M. K., WU M.-C., 1993. Evidence for unusual stability of ADP-ribosyl linkage to membrane proteins of a murine leukemic cell line. Archiv. Biochem. Biophys. 302. 193–199.
- HASHIMOTO Y., SCHWORER C. M., COLBRAN R. J., SODERLING T. R., 1987. Autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulindependent protein kinase II. Effects on total and Ca<sup>2+</sup> independent activities and kinetic parameters. J. Biol. Chem. 262, 8051–8055.
- HASHIMOTO Y., PERRINO B. A., SODERLING T. R., 1990. Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. J. Biol. Chem. 265, 1924–1927.
- HOUSE C., KEMP B., 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototype in its regulatory domain. Science 238, 1726–1728.
- HUNTER Y., 1995. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. Cell 80, 225–236.
- INOUE M., KISHIMOTO A., TAKAI Y., NISHIZUKA Y., 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues II. J. Biol. Chem. 252, 7610–7616.
- ITO A., HASHIMOTO T., HIRAI M., TAKEDA T., SHUNTOH H., KUNO T., TANAKA C., 1989. The complete primary structure of calcineurin A, a calmodulin binding protein homologous with protein phosphatases 1 and 2A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1492–1497.
- JAIN J., MCCAFFREY P.G., MINER Z., KERPPOLA T. K., LAM-BERT J. N., VERDINE G. L., CURRAN T., RAO A., 1993. The T-cell transcription factor NF-Atp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. Nature 365, 352–355.
- JENSEN K. F., OHMSTEDE C. -A., FISHER S. R., SAHYOUN N., 1991. Nuclear and axonal localization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2850–2853.
- KELLY P. T., WEINBERGER R. P., WAXHAM M. N., 1988. Active site-directed inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type II by a bifunctional calmodu-

lin-binding peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4991–4995.

- KENNEDY M.T., BROCKMAN H., RUSNAK F., 1996. Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. J. Biol. Chem. 271, 26517–26521.
- KENNELLY P. J., KREBS E. G., 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. J. Biol. Chem. 266, 15555–15558.
- KINCAID R. L., NIGHTINGALE M. S., MARTIN B. M., 1988. Characterization of a cDNA clone encoding the calmodulinbinding domain of mouse brain calcineurin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8983–8987.
- KNIGHTON D. R., ZHENG J. -H., TEN EYK L. H., XUONG N. -H., TAYLOR S. S., SOWADSKI J. M., 1991. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. Science 253, 414–420.
- KRAFT A. S., ANDERSON W. B., 1983. Phorbol esters increase the amount of Ca<sup>2+</sup>, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. Nature 301, 621–623.
- LADNER C. J., CZECH J., MAURICE J., LORENS S. A., LEE J. M., 1996. Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathological changes. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55, 924–931.
- LEE J. C., EDELMAN A. M., 1994. A protein activator of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase Ia. J. Biol. Chem. 269, 2158–2164.
- LEVINE H., SAHYOUN N. E., 1987. Characterization of a soluble Mr-30,000 catalytic fragment of the neuronal calmodulin-dependent protein kinase II. Eur. J. Biochem. 168, 481–486.
- LIN C. R., KAPILOFF M. S., DURGERIAN S., TATEMOTO K., RUS-SO A. F., HANSON P., SCHULMAN H., ROSENFELD M. G., 1987. Molecular cloning of a brain-specific calcium/calmodulin-dependent protein kinase. Proc. Natl. Ascad. Sci. USA 84, 5962–5966.
- LIU J., FARMER J. D., LANE W. S., FRIEDMAN J., WEISSMAN I., SCREIBER S. L., 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell 66, 80–815.
- LOU L. L., SCHULMAN H., 1989. Distinct autophosphorylation sites sequentially produce autonomy and inhibition of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase. J. Neurosci. 9, 2020–2032.
- MARSHALL M. S., 1995. Ras target proteins in eukaryotic cells. FASEB J. 9, 1311–1318.
- MEANS A. R., CRUZALEGUI F., LEMAGUERESSE B., NEEDLE-MAN D. S., SLAUGHTER G.R., i współaut., 1991. A novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase and a male germ cell-specific calmodulin-binding protein are derived from the same gene. Mol. Cell. Biol. 11, 3960–3971.
- MILLIGAN G., PARENTI M., MEGEE A. I., 1995. The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. Trends Biochem. Sci. 20, 181–186.
- NAIRN A. C., GREENGARD P., 1987. Purification and characterization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinaze I from bovine brain. J. Biol. Chem. 262, 7273–7281.
- NEWTON A. C., 1993. Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22, 1–25.

- NEWTON A. C., 1995a. Protein kinase C. Seeing two domains. Curr. Biol. 5, 973–976.
- NEWTON A. C., 1995b. Protein kinase C: structure, function, and regulation. J. Biol. Chem. 270, 28495–28498.
- NEWTON A. C., KERANEN L. M., 1994. Phosphatidyl-L-serine is necessary for protein kinase C's high affinity interaction with diacylglycerol-containing membranes. Biochemistry 33, 6651-6658.
- NISHIZUKA Y., 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responces. FASEB J. 9, 484–496.
- O'KEEFE S. J., TAMURA J., KINCAID R., TOCCI M. J., O'NEILL E. A., 1992. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. Nature 357, 692–694.
- OKUNO S., KITANI T., FUJISAWA H., 1995. Full activation of brain calmodulin-dependent protein kinase IV requires phosphorylation of the amino-terminal serine-rich region by calmodulin-dependent protein kinase IV kinase. J. Biochem. 117, 686–690..
- PATTON B. L., MILLER S. G., KENNEDY M. B., 1990. Activation of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin is inhibited by autophosphorylation of threonine within the calmodulin-binding domain. J. Biol. Chem. 265, 11204–11212.
- PAULSON J. C., 1989. Glycoproteins: what are the sugar chains for? Trends Biochem. Sci. 14, 272–276.
- PUTKEY J. A., WAXHAM M. N., 1996. A peptide model for calmodulin trapping by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. J. Biol. Chem. 271, 29619–29623.
- SCHINDLER C., DARNELL J. E., 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT pathway. Annu. Rev. Biochem. 64, 621–651.
- SELBERT M. A., ANDERSON K. A., HUANG Q. H., GOLDSTEIN E. G., MEANS A. R., EDELMAN A. M., 1995. Phosphorylation and activation of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase IV by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase Ia kinase. J. Biol. Chem. 270, 17616–17621.
- SU Q., EUGSTER H. P., RYFFEL B., DUMONT F. J., 1996. Cyclosporin A enhances the calcium-dependent induction of AP-1 complex and c-fos mRNA in a T cell lymphoma. Biochim. Biophys. Res. Commun. 229, 249–256.
- SWANSON R. V., ALEX L. A., SIMON M. I., 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two component sy-

stems and the limits of homology. Trends Biochem. Sci. 19, 485–490.

- TAKAI Y., KISHIMOTO A., INOUE M., NISHIZUKA Y., 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. J. Biol. Chem. 252, 7603–7609.
- TAMIR H., LIU K., ADLERSBERG M., HSIUNG S., GERSHON M.D., 1996. Acidification of serotonin secretory vesicles induced by a plasma membrane calcium receptor. J. Biol. Chem. 271, 6441–6450.
- TAYLOR S. S., RADZIO-ANDZELM E., 1994. Three protein kinase structures define a common motif. Structure 2, 345–355.
- TAYLOR S. S., BUECHLER, J. A., YONEMOTO, W., 1990. cAMPdependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. Annu. Rev. Biochem. 59, 971–1005.
- TOBIMATSU T., FUJISAWA H., 1989. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. J. Biol.Chem. 264, 17907–17912.
- TOKUMITSU H., BRICKEY D. A., GLOD J., HIDAKA H., SIKELA J., SODERLING T R., 1994. Activation mechanisms for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV. Identification of a brain CaM-kinase IV kinase. J. Biol. Chem. 269, 28640–29647.
- UDENFRIEND S., 1995. How glycosyl-phosphatidylinositolanchored membrane proteins are made. Annu. Rev. Biochem. 64, 563–591.
- VALLANO M. L., 1990. Developmental regulation of type II calcium/calmodulin-dependent kinase isoforms in rat cerebellum. J. Neurobiol. 21, 1262–1273
- VANUFFELEN B, E., DE KOSTER B. M., VANSTEVENINCK J., EL-FERINK J. G. R., 1996. Carbon monoxide enhances human neutrophil migration in a cyclic GMP-dependent way. Biochim. Biophys. Res. Commun. 226, 21–26.
- WANG M. G., GUERINI D., KLEE C. B., MCBRIDE O. W., 1996. Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin (PPP3R1) are located on human chromosomes 4, 10q21 q22 and 2p16 p15. Cytogenet. Cell. Genet. 72, 236–241.
- ZENNER G., ZUR HAUSEN J. D., BURN P., MUSTELIN T., 1995. Towards unraveling the complexity of T cell signal transduction. BioEssays 17, 967–975.