

EDYTA KOZIEŁ

*Katedra Biotechnologii Żywności
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja
29-Listopada 46, 31-425 Kraków
e-mail: rrzyla@cyf-kr.edu.pl*

MOLEKULARNE DROGI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU W KOMÓRCIE

Warunkiem prawidłowego funkcjonowania ustroju jest pełna integracja pomiędzy pojedynczymi komórkami budującymi cały organizm. W stosunku do narządów i tkanek rolę integracyjną spełniają układy: nerwowy i hormonalny, które zapewniają optymalne dostosowanie się organizmu do zmian w środowisku. Jedną z podstawowych funkcji komórek, warunkującą ich istnienie, jest rozpoznawanie i reagowanie na bodźce fizyczne i chemiczne, których obecność postrzegana jest przez receptory, białkowe struktury występujące głównie po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Po rozpoznaniu sygnału zewnątrzkomórkowego uruchomiony zostaje system transdukcji, doprowadzający do powstania drugich przekaźników informacji w komórce. Wyróżniamy dwa układy transdukcji (układy występujące w plazmolemie odpowiedzialne za przeniesienie informacji z jej strony zewnętrznej do wnętrza komórki), złożone z trzech składników (trójskładnikowy układ transdukcji) oraz z jednego (jednoskładnikowy układ transdukcji).

Funkcjonowanie trójskładnikowego systemu zależy od następujących elementów:

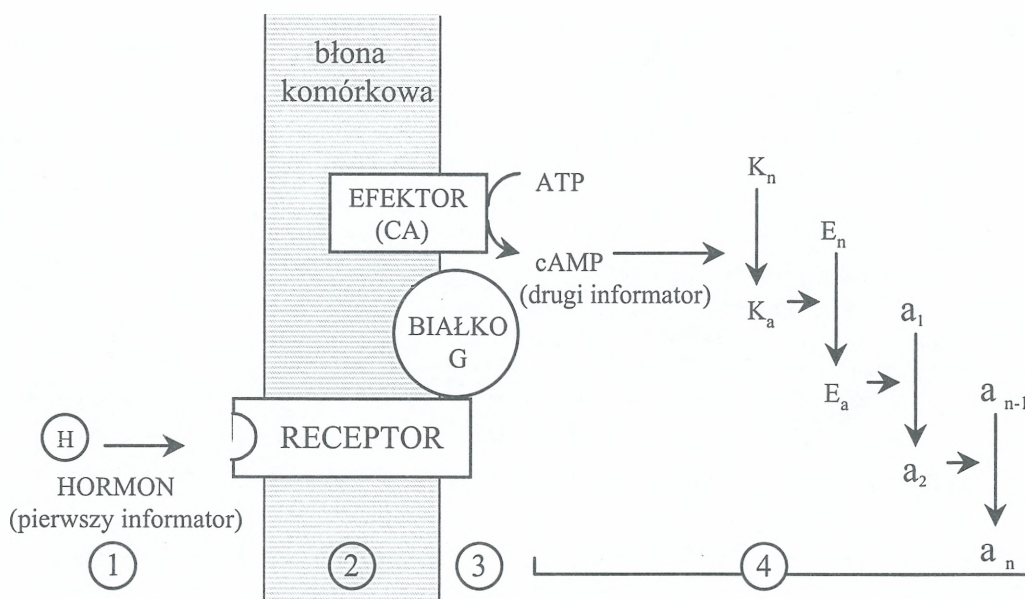
- receptora znajdującego się na zewnętrznej stronie plazmolemy, który po związaniu się z ligandem oddziałuje na białko sprzęgające;
- efektora zlokalizowanego na wewnętrznej stronie plazmolemy, którego aktywacja przez białko sprzęgające powoduje zmianę stężenia drugiego informatora w cytoplazmie, tzn. powoduje wystąpienie pierwotnej odpowiedzi komórkowej (jest enzymem lub kanałem jonowym);
- białek sprzęgających, zwanych też transdukcijnymi, łączących czynnościowo receptor z efekтором.

Zasadę działania tego układu obrazuje teoria drugiego informatora (Ryc. 1). Zgodnie z nią, w działaniu hormonu na komórkę można wyróżnić kolejne etapy: (i) rozpoznanie informacji,

(ii) jej przeniesienie i (iii) transmisję, prowadzącą do powstania (iv) odpowiedzi biologicznej (WARCHOŁ 1997).

Hormon (pierwszy informator) zostaje selektywnie związany przez odpowiadający mu receptor błonowy. Pod wpływem kompleksu hormon/receptor białko sprzęgające zmienia swoje właściwości i aktywuje enzym (efektor) znajdujący się na wewnętrznej stronie błony komórkowej. Zwiększona aktywność enzymu efektorowego powoduje wzrost stężenia drugiego informatora wewnątrz komórki. Drugi informator zaś, wpływa na aktywność enzymów cytoplazmatycznych poprzez aktywację zależnych od niego kinaz białkowych i powoduje w konsekwencji wystąpienie specyficznej odpowiedzi komórkowej. Rozpoznanie informacji wiąże się bezpośrednio z reakcją pomiędzy ligandem i receptorem. Substancjami, które wywołują swoisty efekt w komórce poprzez receptory błonowe mogą być: hormony peptydowe, neurotransmitery, prostaglandyny, przeciwciężła, sygnały świetlne, substancje zapachowe oraz bodźce czuciowe. Liczba receptorów błonowych w komórce wynosi od 1000 do 300 000 i jest zależna od rodzaju komórki, jej stanu czynnościowego oraz fazy cyklu życiowego. Receptory mają strukturę monomeryczną lub polimeryczną (homodimery lub heterodimery) (ZAWILSKA i VETULANI 1997). Cząsteczki receptorowe mogą przechodzić kilkakrotnie przez dwuwarstwą lipidową błony komórkowej dzięki obecności w ich sekwencji fragmentów o właściwościach hydrofobowych, zwanych domenami śród błonowymi. Opierając się na liczbie i wzajemnym rozmieszczeniu fragmentów śród błonowych można podzielić receptory na 3 klasy (WARCHOŁ 1997).

Do pierwszej zalicza się 2 grupy receptorów, z których jedne mają 4, a drugie 6 fragmentów śród błonowych.



Ryc.1. Hipoteza drugiego informatora.

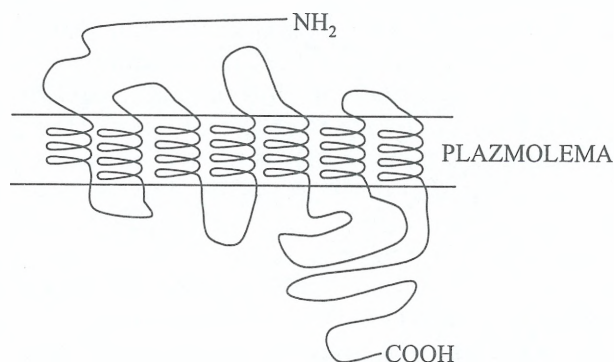
Hormon = ligand (H) — pierwszy informator wiąże się z receptorami na zewnętrznej stronie plazmolemy. Kompleks ten prowadzi do takich zmian w białku sprzęgającym G, że jest ono zdolne do aktywacji efektoru znajdującego się po wewnętrznej stronie błony komórkowej. W przypadku, gdy efekтором jest cyklaza adenyloza (CA) dochodzi do podwyższenia w cytoplazmie stężenia cAMP, pełniącego rolę drugiego informatora. Związek ten reagując z nieaktywną kinazą białkową (K_n) powoduje jej przejście w postać aktywną (K_a).

W klasie drugiej znajdują się receptory mające 7 domen śródbłonowych (Ryc. 2). Są one monomerami, homodimerami bądź potranslacyjnymi heterodimerami. Receptory te działają w ramach trójskładnikowego systemu transdukcji, przekazując sygnał na cząsteczki efektorowe poprzez wiążące się z nimi białka G. Do tej grupy należą receptory dla neuropeptydów, IL-8, sekretyny, parathormonu, kalcytoniny i inne. Do klasy tej zalicza się również receptory działające poprzez kanały jonowe (BROWN i BIRNBAUMER 1990, REUTER i SIGEL 1991).

Do trzeciej klasy receptorów zalicza się te, które mają tylko jeden fragment śródbłonowy. Są to receptory dla insuliny, czynników wzrostu i większości cytokin (Ryc. 3).

Na podstawie wieloletnich badań nad systemem trójskładnikowej transdukcji sygnału wiadomo, że cząsteczki receptora oraz efektor (enzym, kanał jonowy) występują niezależnie od siebie i przesuwają się swobodnie w płaszczynie błony komórkowej i jako takie nie oddziałują na siebie. Ich czynnościowe powiązanie jest możliwe dzięki obecności w plazmolemie białek odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału od związanego z ligandem receptora do enzymu efektorowego (KWIATKOWSKA 1988, HEPLER i GILMAN 1992, ROBBELL 1992, BOURNE 1994, BARAŃSKA 1999). Wykrycie tych białek przez Martina Rodbella i Alfreda Gilmana zostało uhonorowane nagrodą Nobla w 1994 r. w dziedzinie fizjologii i medycyny (patrz BARAŃSKA

1994, ADLER 1995, KURLANDZKA i FRONK 1995). Białka te, ze względu na zdolność wiązania i hydrolizy nukleotydów guanylowych, zostały nazwane białkami G. Czas hydrolizy GTP do GDP reguluje szybkość transmisji sygnału.

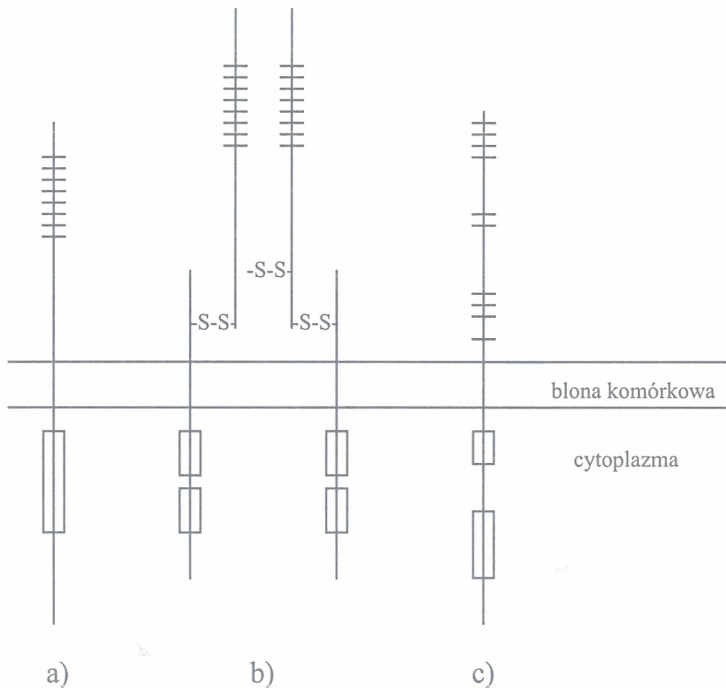


Ryc. 2. Schemat budowy receptora β_2 -adrenergicznego. Łańcuch polipeptydowy cząsteczki 7-krotnie przechodzi przez plazmolemę (WARCHOŁ 1997).

Szybkość przekazywania sygnału tą drogą wynosi kilka sekund i jest szybkością pośrednią, niższą od szybkości przekazywania sygnału za pośrednictwem kanałów jonowych zależnych od ligandu, a wyższą od przenoszenia sygnału poprzez kinazy tyrozynowe (TAYLOR 1990). Opracowany w latach 70. i aktualny do dziś schemat mechanizmu transdukcji sygnału w komórce dotyczył tylko jednego systemu przekaźników, prowadzących w rezultacie do stymulacji cykla-

zy adenylationowej (GILMAN 1984, NOWAK 1995). Obecnie wiadomo, że istnieje cała rodzina homologicznych białek, które dzieli się na: wysokocząsteczkowe lub heterotrimerowe białka wiążące i hydrolizujące GTP oraz niskocząsteczkowe, monomeryczne lub tzw. małe białka G o masie cząsteczkowej 20–25 kDa (BARBACID 1987, BOURNE i współaut. 1991, EXTON 1998, SAITO 1998). Do tych ostatnich należą: czynnik elongacyjny Tu, produkty protoonkogenów *ras*, genów *rac*, *rap* i *rho*. Wszystkie wysokocząsteczkowe białka wiążące GTP zbudowane są z trzech podjednostek: α (39–46 kDa), β (37 kDa) i γ (8 kDa) (RIDLEY 1997, KHOSRAVI-FAR i współaut. 1998, HALL 1999). Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów G_α i mechanizmów działania wyróżnia się cztery klasy białek G, oznaczane jako G_s , G_i , G_q i G_{12} . W każdej z tych grup występuje szereg podklas (HILDENRANDT i współaut. 1983). W świetle najnowszych badań wiadomo, że istnieje co najmniej 21 form pod-

domo, że aktywatorem niektórych białek G jest toksyna cholery (G_s), natomiast inhibitorem innych — toksyna krztuśca (G_i). Toksyny powodują ADP-rybozylację białka G i odpowiednio stymulację lub inhibicję aktywności GTP-azowej. Podjednostki β i γ są ściśle ze sobą związane i nie występują osobno. Ich budowa nie zależy od rodzaju białka G. Przeniesienie informacji przez białka G, z receptora aktywowanego ligandem na specyficzny efektor, wiąże się ściśle z cyklicznymi przemianami białek G (RODBELL 1997, HEPLER 1999). W stanie nie pobudzonym wszystkie trzy podjednostki białka G są ściśle ze sobą powiązane, a podjednostka α wiąże silnie GDP (KLEIN 1993, WARCHOŁ 1997). Receptor związany z hormonem wpływa na białko G obniżając powinowactwo podjednostki α do GDP. Następnie dochodzi do uwolnienia GDP, a jego miejsce zajmuje GTP. W konsekwencji następuje zmiana konformacyjna białka G, dysocjacja do podjednostki α i kompleksu $\beta\gamma$ oraz



Ryc. 3. Molekularna budowa receptora dla EGF (a), insuliny (b) i PDGF (c).

Kreskami poprzecznymi zaznaczono miejsca występowania cysteiny, a regiony bogate w nią — podwójnymi poprzecznymi kreskami. Prostokątami obrysowano domeny odpowiedzialne za aktywność kinazy tyrozynowej.

jednostek α , 4 formy β i 6 form γ . Fakt ten stwarza możliwość licznych kombinacji budowy trimerycznego białka G, pełniącego określone biologiczne funkcje w komórce. Najbardziej heterogenną jest podjednostka α . W jej obrębie znajduje się jedno miejsce wiążące GTP lub GDP i w określonych warunkach hydrolizuje ona związany GTP do GDP i pirofosforanu (PPi). Oprócz tych sekwencji, podjednostki α białek G posiadają domeny odpowiedzialne za ich współdziałanie z białkami efektorowymi. Bardzo pomocną w badaniu białek G okazała się wrażliwość wielu z nich na toksyny bakteryjne (HOLMGREN 1981, FIORENTINI i współaut. 1998). Wia-

domo, że aktywatorem niektórych białek G jest toksyna cholery (G_s), natomiast inhibitorem innych — toksyna krztuśca (G_i). Toksyny powodują ADP-rybozylację białka G i odpowiednio stymulację lub inhibicję aktywności GTP-azowej. Podjednostki β i γ są ściśle ze sobą związane i nie występują osobno. Ich budowa nie zależy od rodzaju białka G. Przeniesienie informacji przez białka G, z receptora aktywowanego ligandem na specyficzny efektor, wiąże się ściśle z cyklicznymi przemianami białek G (RODBELL 1997, HEPLER 1999). W stanie nie pobudzonym wszystkie trzy podjednostki białka G są ściśle ze sobą powiązane, a podjednostka α wiąże silnie GDP (KLEIN 1993, WARCHOŁ 1997). Receptor związany z hormonem wpływa na białko G obniżając powinowactwo podjednostki α do GDP. Następnie dochodzi do uwolnienia GDP, a jego miejsce zajmuje GTP. W konsekwencji następuje zmiana konformacyjna białka G, dysocjacja do podjednostki α i kompleksu $\beta\gamma$ oraz

stymulacja efektoru. Przekazywanie sygnału kończy hydroliza GTP, związanego z podjednostką α , co prowadzi do reasocjacji podjednostek. Utworzone trimeryczne białko G jest gotowe do przyjęcia następnego sygnału. Aktywowany receptor może stymulować wiele cząsteczek białka G, w wyniku czego sygnał ulega wzmocnieniu. Uwolniona podczas stymulacji podjednostka α odgrywa decydującą rolę w reakcji z efektorami. Natomiast kompleks podjednostek $\beta\gamma$ przez długi czas był uważany jedynie za część trimerycznego białka G ułatwiającego połączenie z błoną i receptorem. Jednakże wyniki nowszych prac wskazują na udział w tych reakcjach również

kompleksu $\beta\gamma$, a w niektórych przypadkach udział zarówno podjednostki α , jak i kompleksu $\beta\gamma$ (MORRIS i SCARLATA 1997, HO i MURRELL-LAG-

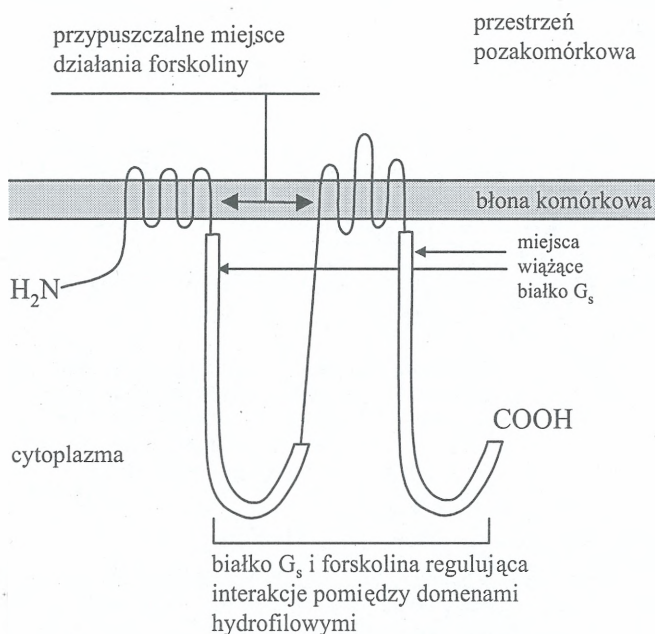
Tabela 1. Przykłady niskocząsteczkowych białek wiążących GTP i ich wewnątrzkomórkowa lokalizacja (ADLER 1995).

Białko	Frakcja w której występuje
rab i (YPT 1)	siateczka śródplazmatyczna, aparat Golgiego
rab 3a	pęcherzyki sekrecyjne
rab 5	wczesne endosomy, błony plazmatyczne
rab 7	późne endosomy
SEC 4	pęcherzyki sekrecyjne
ARF	aparat Golgiego, cytozol
SAR 1	siateczka śródplazmatyczne

NADO 1999, KAWANO i współaut. 1999). Dotychczasowe badania pozwoliły na poznanie efektorów współdziałających z określonymi rodzajami białek G w transdukcji sygnału poprzez błonę komórkową (TAUSSIG i TAUSSIG 1998). I tak stwierdzono, że białka G_s odpowiedzialne są za aktywację cyklazy adenylanowej (AC) oraz oddziaływanie na kanał wapniowy i sodowy (DOLPHIN 1998). Białka G_i natomiast prowadzą do

komórkowy ma swój określony komplet niskocząsteczkowych białek Ras. W Tabeli 1 podano przykłady lokalizacji tych białek. Opisano ponad czterdzieści niskocząsteczkowych białek G. W oparciu o podobieństwo budowy można podzielić je na cztery grupy. Podobnie jak w przypadku białek heterotrimerycznych, podział ten w znacznej mierze odpowiada podziałowi opartemu na funkcji poszczególnych białek. Są to więc białka regulujące różnicowanie i wzrost komórek, regulujące organizację cytoszkieletu, biorące udział w transporcie poprzez błonę, np. aparatu Golgiego, błonę jądrową oraz biorące udział w procesie egzocytozy (KWIATKOWSKA-KORCZAK 1995).

Cyklaza adenylanowa jest enzymem efektorowym o masie cząsteczkowej 110–180 kDa, występującym wyłącznie w obrębie błony komórkowej (NOWAK 1995) (Ryc. 4). Różne izoformy tego enzymu katalizują przejście ATP w 3'5'-cykliczny adenozynomonofosforan (cAMP) i pirofosforan (PPi). W cząsteczce cyklazy adenylanowej wyróżnia się dwie domeny hydrofobowe (każda posiada sześć segmentów wewnątrzblonowych) oraz dwie duże domeny hydrofilowe. Domeny hydrofilowe AC są najprawdopodobniej odpowiedzialne za wiązanie białka G i ka-



Ryc.4. Organizacja przestrzenna cząsteczki cyklazy adenylanowej (NOWAK 1995).

hamowania aktywności AC, aktywacji fosfolipazy C (PLC) i fosfolipazy A_2 (PLA $_2$) oraz odpowiadają za funkcjonowanie kanałów K^+ i Ca^{2+} . Białka G_q współdziałają z PLC, natomiast białka G_{12} z małym białkiem Rho (BARAŃSKA 1999). Niskocząsteczkowe białka wiążące GTP wykryto prawie we wszystkich rodzajach tkanek. Wiele komórek ma kilkanaście różnych takich białek, a zlokalizowano je zarówno we frakcji błon, jak i w cytoplazmie. Każdy przedział wewnątrz-

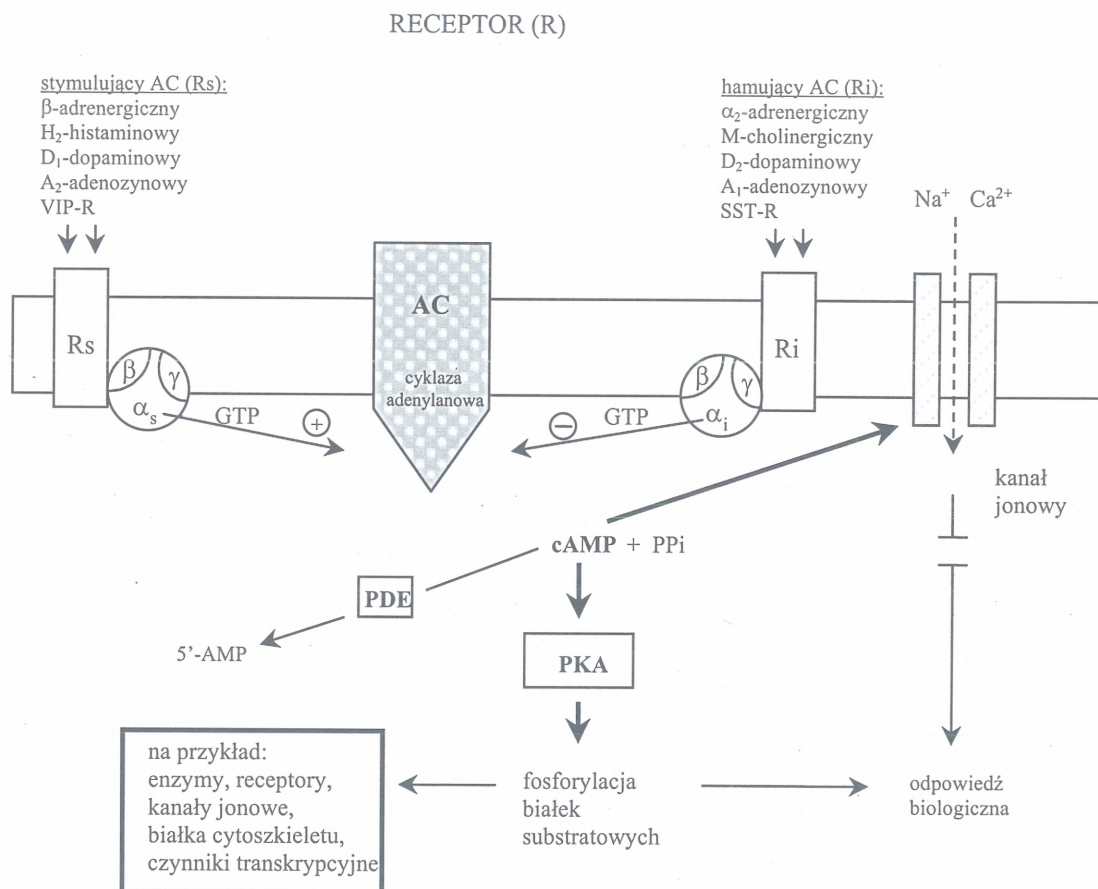
talizę reakcji enzymatycznej. Są one strukturalnie podobne do siebie oraz do analogicznych fragmentów cytoplazmatycznych we wszystkich izoenzymach cyklazy adenylanowej. N- i C-końce enzymu znajdują się po stronie cytoplazmy. Do wyrażenia pełnej aktywności katalitycznej cząsteczki cyklazy wymagana jest interakcja pomiędzy domenami hydrofilowymi i fragmentami wewnątrzblonowymi. Do czynników stymulujących aktywność niektórych izoform en-

zemu należą: białka G_s , forskolina oraz kompleks jonów Ca^{2+} z kalmoduliną (Ca^{2+}/CaM), aktywujący i stabilizujący AC (DESSAUER i współaut. 1997, 1998).

W warunkach *in vivo* na aktywność AC mają wpływ jony wapnia, magnezu i fluoru. Poziom cAMP w komórce jest regulowany z jednej strony przez biorącą udział w jego syntezie AC, a z drugiej przez fosfodiesterazy (PDE), powodujące rozpad tego związku. W obecności jonów wapnia wzrasta również aktywność PDE zależnych od kompleksu kalmoduliny z tymi jonami, co wywołuje szybki spadek stężenia cAMP w komórce. cAMP wywiera swój efekt poprzez aktyw-

stony, receptory, białka cytoszkieletu, czynniki transkrypcyjne, kanały jonowe i inne. Na aktywność kinaz białkowych zależnych od cAMP, obok ich autofosforylacji, mają również wpływ jony wapnia. Unieczynnianie białek aktywowanych przez fosforylasy, jednocześnie zakończenie związanej z nimi odpowiedzi komórkowej, jest bezpośrednio związane z obecnością enzymów zwanych fosfatazami fosfoproteinowymi.

Już stosunkowo dawno stwierdzono, że wiele komórek odpowiada na bodźce zewnętrzne nie tylko zmianą stężenia cAMP, ale także jonów Ca^{2+} (TSUNODA 1993, TRETYN 1994). Istotne jest,



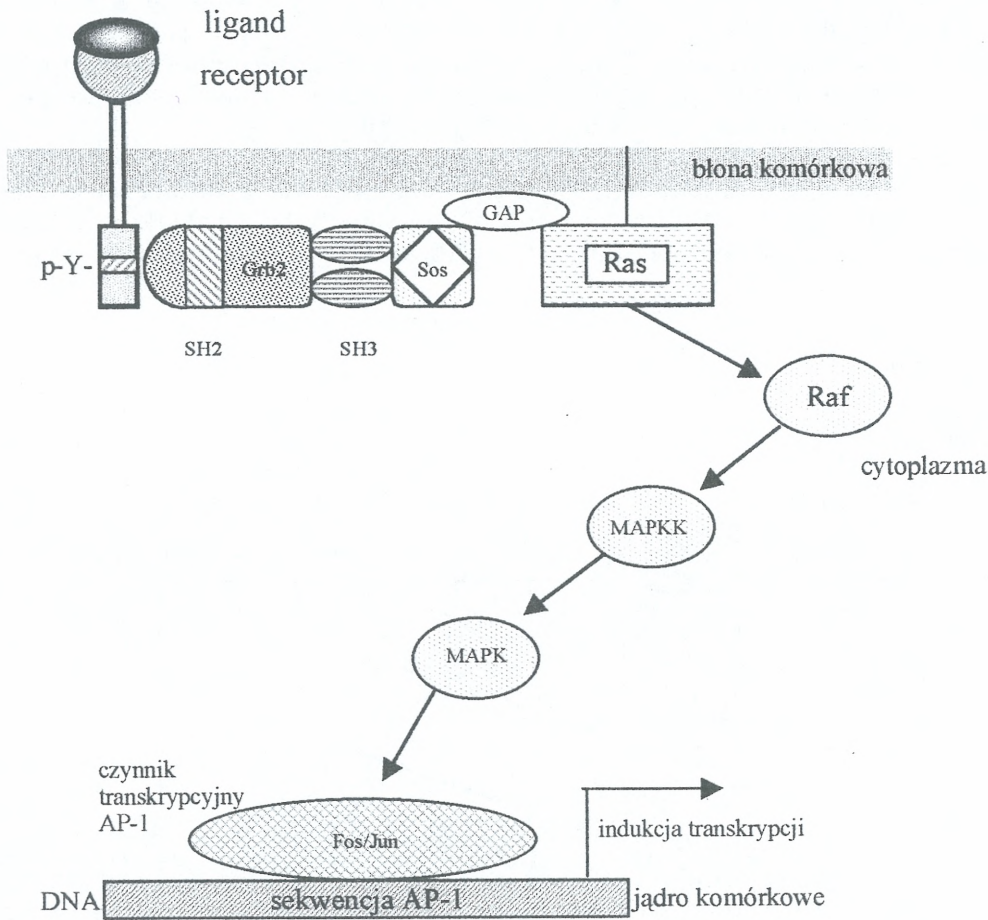
Ryc. 5. cAMP wywiera swoje działanie w komórce poprzez aktywację kinazy białkowej A (PKA) oraz poprzez bezpośrednią interakcję z białkiem kanału jonowego. VIP-R — receptor naczyniowoaktywnego peptydu jelitowego; SST-R — receptor somatostatyny; PDE — fosfodiesteraza; α , β , γ — podjednostki białka G (Nowak 1995).

wację zależnych od cAMP fosfotransferaz proteinowych nazywanych kinazami białkowymi A (PKA) (Ryc. 5). W świetle współczesnych badań uważa się, że kinazy te odgrywają zasadniczą rolę w powstawaniu odpowiedzi komórkowej. Enzymy te są odpowiedzialne za fosforylację białek, pełniących kluczową rolę w regulacji metabolizmu komórkowego. Najważniejszymi fizjologicznymi substratami dla PKA są: esteraza cholesterolowa, syntetaza glikogenowa, hi-

że zmiana ta była pierwotną reakcją komórkową, występującą przed wzrostem stężenia cAMP, co świadczy o tym, że jony Ca^{2+} pełnią rolę drugiego informatora. Hipoteza ta została poparta przez wykrycie białka nazwanego kalmodulina, które po przyłączeniu Ca^{2+} jest zdolne do aktywowania kluczowych enzymów związanych z odpowiedzią komórkową (KLEE i współaut. 1980). Wykazano, że hormony zwierzęce i roślinne, światło oraz inne czynniki śro-

dowiskowe stymulują przejściowy wzrost stężenia niezwiązanego cytoplazmatycznego wapnia ($[Ca^{2+}]_c$). Po okresie pobudzenia komórki obserwuje się spadek $[Ca^{2+}]_c$ do wartości wyjściowej. Podwyższenie $[Ca^{2+}]_c$ spowodowane jest wzro-

jej postać β , jest odpowiedzialna za powstawanie diacyloglicerolu (DAG) oraz inozytolo(1,4,5)trifosforanu (IP_3) z fosfatydylo-inozytolo(4,5)bisfosforanu (PIP_2) (BERRIDGE i IRVINE 1984, BARAŃSKA 1995, AHN i współaut. 1998).



Ryc. 6. Współdziałanie receptorowych kinaz tyrozynowych z białkami Ras w przekazywaniu sygnałów od błony komórkowej do jądra komórkowego. W wyniku aktywacji receptorów przez czynniki wzrostu (ligand) i autofosforylacji kompleks białek Grb2-Sos wiąże się z ufosforylowaną tyrozyną (p-Y) w C-końcowej części receptora. Przemieszczenie Sos do błony komórkowej umożliwia interakcje z zakotwiczonym w błonie białkiem Ras i jego aktywację. Aktywacja Ras pozwala na uruchomienie kaskady kinaz: Raf, MAPKKK, MAPKK, MAPK, które fosforylują składniki kompleksu transkrypcyjnego AP-1 (białka Fos i Jun) i regulują zależną od tego kompleksu ekspresję genów.

stem przepuszczalności błony komórkowej dla jonów wapnia oraz ich uwalnianiem z wnętrza siateczki śródplazmatycznej, mitochondrium i jądra. Obydwa procesy zachodzą w wyniku stymulacji kanałów wapniowych. Podwyższeniu $[Ca^{2+}]_c$ towarzyszy aktywacja procesów wewnątrzkomórkowych, prowadzących do powstania odpowiedzi komórkowej (DE JESUS FERREIRA i współaut. 1998, KOZIEL i współaut. 1998; MONS i współaut. 1998, NAOR i współaut. 1998).

Rolę enzymu efektorowego, obok AC, pełni również fosfolipaza C (PLC), która występuje w wielu izoformach (WANG i współaut. 1998, 1999, YANG i współaut. 1998). PLC, zwłaszcza

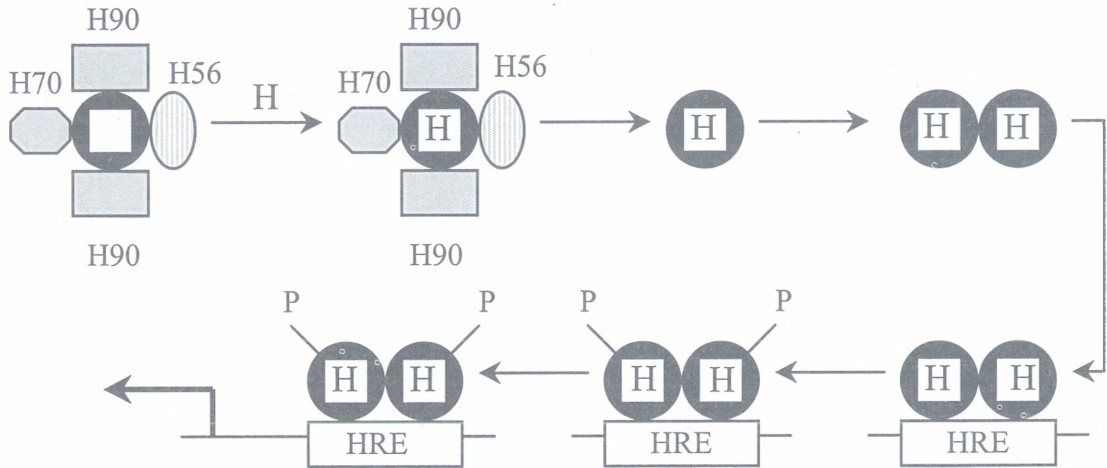
Wykazano, że za przeniesienie informacji z receptora na PLC β odpowiedzialne jest białko G $_q$, pełniące rolę czynnika sprzęgającego.

Na podstawie wielu badań wiadomo, że aktywacja PLC może być spowodowana nie tylko przez podjednostkę białka G $_q$, ale także przez kompleks $\beta\gamma$ (PANCHENKO i współaut. 1998). Jednakże stężenie tych podjednostek musi być 1000x większe ($\mu\text{mol/l}$) niż podjednostek α_q , aby mogły wywołać podobny efekt w komórce. Oba związki, tzn. DAG i IP_3 , zostały uznane za drugie informatory komórkowe. DAG wywiera swój efekt poprzez aktywację serynowo-treoninowej kinazy białkowej C (PKC), podczas gdy IP_3 , łącząc się z receptorem w siateczce

śródpłazmatycznej, powoduje gwałtowny wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie (BERRIDGE 1993). Obok wspomnianych substancji z fosfolipidów mogą powstawać także: kwas fosfatydowy (w wyniku działania fosfolipazy D) i arachidonowy (pod wpływem fosfolipazy A₂), które uważane są za drugie informatory (KODAKI i YAMASHITA 1997, KAFOURY i współaut. 1998, LUKOWSKI i współaut. 1998, VAN-DIJK i współaut. 1998).

Poza omówionym trójskładnikowym systemem transdukcji sygnału istnieje również

na wyróżnić trzy domeny: zewnątrzkomórkową, śródbłonową i cytoplazmatyczną. Domenę zewnątrzkomórkową charakteryzuje wysoki poziom glikozylacji; jest utworzona przez N-koniec łańcucha białkowego i zawiera miejsce wiążące ligand. Domenę śródbłonową stanowi część cząsteczki przechodząca przez plazmolemę i wykazująca silne właściwości hydrofobowe, natomiast domena cytoplazmatyczna zawiera miejsce wiążące ATP oraz miejsce akceptorowe dla tyrozynowych reszt substratów. Na podstawie badań receptora EGF powstała hipoteza



TRANSKRYPCJA

Ryc. 7. Model aktywacji genu przez hormony przy udziale receptora hormonów steroidowych (BAGCHI i współaut. 1990).

HSP — białka szoku cieplnego, H — hormon, \boxed{H} — kompleks hormon/receptor, $\boxed{H}-\boxed{H}$ — dimer receptorów, P — fosforan, HRE — element odpowiedzi hormonalnej.

układ jednoskładnikowy, tworzony tylko przez jedną cząsteczkę białkową przechodzącą przez plazmolemę (KLEIN 1993). Jedną z części tego białka, wychodzącą na zewnątrz z błony komórkowej, ma właściwości receptorowe. Druga natomiast, będąca tyrozynowo-specyficzną kinazą białkową (TK), występuje na wewnętrznej powierzchni plazmolemy i pełni funkcję efektorową. Taką wieloczynnikową cząsteczkę można z jednej strony uważać za receptor związany z kinazą tyrozynową, a z drugiej za enzym mający domenę regulatorową wysuniętą poza obręb komórki i aktywującą go po związaniu ligandu. Do chwili obecnej dobrze poznano budowę sześciu receptorów tego typu dla czynników takich jak: insulina, EGF (czynnik wzrostowy naskórka), PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostowy), CSF-1 (czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagowych), TGF (transformujący czynnik wzrostowy), IGF-I (insulinopodobny czynnik wzrostowy). Analiza budowy wymienionych receptorów wskazuje na ich podobieństwo strukturalne i czynnościowe. W każdym z nich moż-

allosteryczno-oligomeryzacyjna, tłumacząca przenoszenie sygnału w obrębie jednoskładnikowego układu transdukcji. Zgodnie z tym modelem, monomeryczne receptory EGF są w stanie równowagi dynamicznej z receptorami dimerycznymi. Forma dimeryczna ma większe powinowactwo do ligandu, a jego związanie stabilizuje stan dimeryzacji. Prowadzi to w konsekwencji do aktywacji domeny kinazowej poprzez bezpośrednią interakcję cytoplazmatycznych części dimeru. Odpowiedzi komórkowe wywołane przez różne receptory związane z kinazą tyrozynową mają podobny charakter (KAMIŃSKA-KACZMAREK 1995, DIKIC i BLAUKAT 1999). Wszystkie powodują zwiększoną wymianę Na^+/H^+ , wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, zwiększoną przemianę fosfatydyloinozytoli, fosforylację białka rybosomowego 86 oraz ekspresję protoonkogenów *c-fos* i *c-myc*. Niektóre efekty tłumaczy się aktywacją kinazy białkowej C (WANG i współaut. 1998). Inicjowanie wzrostu komórkowego przez receptory dla hormonów i czynników wzrostowych, związane

z kinazą tyrozynową, uruchamia cały łańcuch reakcji prowadzących do fosforylacji kolejnych białek. Kinaza tyrozynowa fosforyluje białko Shc, które wpływa na białko Grb2 warunkujące aktywność Sos. To ostatnie białko jest odpowiedzialne za przyspieszenie dysocjacji GDP od białka p21^{ras} (małe białko G) i przyłączenie na jego miejsce GTP. Kompleks p21^{ras}-GTP aktywuje kaskadę MAP-kinaz i w konsekwencji powoduje fosforylację czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za proliferację komórkową (BARBACID 1987, BRUNET i POUYSSEUR 1997) (Ryc. 6).

Obok receptorów zewnątrzkomórkowych, występujących na powierzchni plazmolemy, istnieją receptory zlokalizowane wewnątrz komórki. W tym przypadku konieczne jest wniknięcie liganda do wnętrza komórki w celu związania się z białkiem receptorowym i wywołania specyficznej odpowiedzi komórkowej. Wśród hormonów działających na tej drodze należy wymienić hormony steroidowe i hormony tarczycy. Hormony te regulują ekspresję specyficznych genów i dzięki temu mają wpływ na wzrost, rozwój i różnicowanie się komórek na wyższych Eucaryota. Od ponad 20 lat znany jest molekularny mechanizm działania hormonów steroidowych (JENSEN i współaut. 1966, RINGOLD 1985, YAMA-

MOTO 1985, EVANS 1988, BEATO 1989). Uważa się, że niezwiązany receptor występuje w nieaktywnym czynnościowo kompleksie z niereceptorowymi białkami szoku cieplnego (ang. heat shock protein): HSP90, HSP70, HSP56, które blokują biologiczną aktywność receptora. Związanie hormonu przez receptor powoduje oddysocjowanie białek HSP i bezpośrednią allosteryczną modulację struktury receptora. Tak zaktywowany receptor ulega dimeryzacji, wiąże się do elementu odpowiedzi hormonalnej w promotorze genu docelowego, następnie ulega hormonozależnej fosforylacji i uczestniczy w aktywacji genu przez rekrutację czynników transkrypcyjnych na promotorze tego genu (Ryc.7).

Podsumowując należy zaznaczyć, że procesy zachodzące w komórce po związaniu hormonu z receptorem, prowadzące do określonej odpowiedzi komórkowej, są bardzo złożone i najczęściej związane z aktywacją kilku dróg transdukcji sygnału (ang. cross talks).

Serdecznie dziękuję Pani Profesor dr hab. Barbarze Bilińskiej z Pracowni Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanki Zakładu Fizjologii Zwierząt Instytutu Zoologii UJ za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi krytyczne.

MOLECULAR MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION

Summary

Information from the extracellular environment of the cell is received by the receptors — special proteins which enable to receive and recognize information carried by various signals such as: hormones, neurotransmitters, cytokines, and light pulses. The hormone/receptor interaction starts the cascade of events that lead to a specific cell response. The primary signal, recognized by a specific receptor on the cell membrane, is drafted on the one of the enzymes called effectors, which catalyses the production of secondary messengers. The effectors are: adenyl cyclase, guanylyl cyclase, phospholipase C, A₂, D. Secondary mess-

engers are: cyclic AMP, cyclic GMP, diacylglycerol (DAG), trisphosphoinositol (IP₃), Ca²⁺ ions, arachidonic acid, phosphatidylic acid. These messengers change the activity of kinases and protein phosphatases, the important regulators of many processes in the cells. Apart from these receptors there are also intracellular receptors. In this case the ligand/receptor interaction influences the specific regulatory sequence in DNA in target gene called the hormone response elements (HRE). The receptors facilitate the formation of hormone complexes with different transcription factors and stimulate transcription.

LITERATURA

- ADLER G., 1995. *Białka wiążące GTP jako uniwersalny przekaznik sygnałów*. Post. Biol. Kom. 22, 103–111.
- AHN S. J., HAN S. J., MO H. J., CHUNG J. K., HONG S. H., PARK T. K., KIM C. G., 1998. *Interactions of phospholipase C gamma 1 via its COOH-terminal SRC homology 2 domain with synaptotagmin*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244, 62–67.
- BARAŃSKA J., 1994. *Białka G — Nagroda Nobla 1994*. Post. Biol. Kom. 4, 479–488.
- BARAŃSKA J., 1995. *Udział pochodnych inozytoli w przekazywaniu informacji*. [W:] *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*. KONARSKA L., (red.). PWN, Warszawa, 104–116.
- BARAŃSKA J., 1999. *Cross-talk between signal transduction pathways in the cell — the role of G proteins in these processes*. Post. Hig. Med. Dośw. 53, 133–146.
- BARBACID M., 1987. *Ras genes*. Annu. Rev. Biochem. 56, 779–827.
- BEATO M., 1989. *Gene regulation by steroid hormones*. Cell 56, 335–344.
- BERRIDGE M. J., 1993. *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature 361, 315–325.
- BERRIDGE M. J., IRVINE R. F., 1984. *Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction*. Nature 312, 315–321.
- BOURNE H. R., 1994. *The importance of being GTP*. Nature 369, 611–612.
- BOURNE H. R., SANDERS D. A., MCORMICK F., 1991. *GTPase superfamily: a conserved structure and molecular mechanisms*. Nature 349, 117–127.

- BROWN A. M., BIRNBAUMER L., 1990. *Ionic channels and their regulation by G protein subunits*. Annu. Rev. Physiol. 52, 197–213.
- BRUNET A., POUYSSEUR J., 1997. *Mammalian MAP kinase modules: how to transduce specific signals*. Assays Biochem. 32, 1–16.
- DE JESUS FERREIRA M. C., HELIES TOUSSAINT C., IMBERT TEBOUL M., BAILLY C., VERBAVATZ J. M., BELLANGER A. C., CHABARDES D., 1998. *Co-expression of Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase and of a Ca²⁺-sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. Inhibition of hormone-dependent cAMP accumulation by extracellular Ca²⁺*. J. Biol. Chem. 273, 15192–15202.
- DESSAUER C. W., SCULLY T. T., GILMAN A. G., 1997. *Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase*. J. Biol. Chem. 272, 22272–22277.
- DESSAUER C. W., TESMER J. J., SPRANG S. R., GILMAN A. G., 1998. *Identification of a G α binding site on type V adenylyl cyclase*. J. Biol. Chem. 273, 25831–25839.
- DIKIC I., BLAUKAT A., 1999. *Protein tyrosine kinase-mediated pathways in G protein-coupled receptor signaling*. Cell Biochem. Biophys. 30, 369–387.
- DOLPHIN A. C., 1998. *Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins*. J. Physiol. 506, 3–11.
- EVANS R. M., 1988. *The steroid and thyroid hormone receptor*. Science 240, 889–895.
- EXTON J. H., 1998. *Small GTPases minireview series*. J. Biol. Chem. 273, 19923 (abstract).
- FIorentini C., GAUTHIER M., DONELLI G., BOQUET P., 1998. *Bacterial toxins and the GTP-binding protein: what microbes teach us about cell regulation*. Cell Death Differentiation. 5, 720–728.
- GILMAN A. G., 1984. *G-protein and dual control of adenylyl cyclase*. Cell 36, 577–579.
- HALL A., 1999. *Signal transduction pathways regulated by the Rho family of small GTPases*. Br. J. Cancer 80 (Supl. 1), 25–27.
- HEPLER J. R., 1999. *Emerging roles for RGS proteins in cell signalling*. Trends Pharmacol. Sci. 20, 376–382.
- HEPLER J. R., GILMAN A. G., 1992. *G Proteins*. Trends Biochem. Sci. 17, 383–387.
- HILDENRANDT J. D., SEKURA R. D., CODINA J., IYENGAR R., MANCLARK C. R., BIRNBAUMER L., 1983. *Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins*. Nature 302, 706–709.
- HO I. H., MURRELL-LAGNADO R. D., 1999. *Molecular mechanisms for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels*. J. Physiol. 520, 645–51.
- HOLMGREN J., 1981. *Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera*. Nature 292, 413–417.
- JENSEN E. V., JACOBSEN H. I., FLESHER J. W., SAHA N. N., GUPTA G. N., SMITH S., COLUCCI V., SHIPLACOFF D., NEUMAN H. G., DESOMBRE E. R., JUNGBLUT P. W., 1966. *Estrogen receptors in target tissues* [W:] Steroid Dynamics. PINCUS G., NAKAO T., TAIT J. R., (red.). Academic Press New York, 133–156.
- KAFOURY R. M., PRYOR W. A., SQUADRITO G. L., SALGO M. G., ZOU X., FRIEDMAN M., 1998. *Lipid ozonation products activate phospholipases A₂, C and D*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 150, 338–49.
- KAMIŃSKA-KACZMAREK B., 1995. *Receptory czynników wzrostu — struktura i funkcje*. [W:] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. KONARSKA L., (red.). PWN, Warszawa, 104–116.
- KAWANO T., CHEN L., WATANABE S. Y., YAMAUCHI J., KAZIRO Y., NAKAJIMA Y., NAKAJIMA S., ITOH H., 1999. *Importance of the G protein gamma subunit in activating G protein-coupled inward rectifier K⁺ channels*. FEBS Letters 463, 355–359.
- KHOSRAVI-FAR R., CAMPBELL S., ROSSMAN K. L., DER C. J., 1998. *Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins*. Adv. Cancer Res. 72, 57–107.
- KLEE C. B., CROUCH T. H., RICHMAN P. G., 1980. *Calmodulin*. Annu. Rev. Biochem. 49, 489–515.
- KLEIN A., 1993. *Peptydowe czynniki wzrostowe. Rodzina hormonów plejotropowych*. Post. Biol. Kom. 20 (Supl. 1), 41–48.
- KODAKI T., YAMASHITA S., 1997. *Cloning, expression and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain*. J. Biol. Chem. 272, 11408–11413.
- KOZIEL E., FILIPIAK K., BUTOWSKA W., BILIŃSKA B., WARCHOŁ J. B., 1998. *Badanie immuno-endokrynnych zależności w gonadzie męskiej: udział jonów wapniowych w stymulacji komórek Leydiga in vitro*. Ginek. Pol. 69, 441–446.
- KURLANDZKA A., FRONK J., 1995. *Nobel 1994 za białka G z medycyny i fizjologii*. Post. Biochem. 41, 3–4.
- KWIATKOWSKA J., 1988. *Białka G jako uniwersalny łącznik w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы*. Post. Biochem. 34, 123–130.
- KWIATKOWSKA-KORCZAK J., 1995. *Białka G - budowa i rola w przekazywaniu sygnałów*. [W:] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. KONARSKA L., (red.). PWN, Warszawa, 104–116.
- LUKOWSKI S., MIRA J. P., ZACHOWSKI A., GENY B., 1998. *Fodrin inhibits phospholipases A₂, C and D by decreasing polyphosphoinositide cell content*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 248, 278–284.
- MONS N., DECORTE L., JAFFARD R., COOPER D. M., 1998. *Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling*. Live Sci. 62, 1647–1652.
- MORRIS A. J., SCARLATA S., 1997. *Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes*. Biochem. Pharmacol. 54, 429–435.
- NAOR Z., HARRIS D., SHACHAM S., 1998. *Mechanism of receptor signalling: combinatorial cross-talk of Ca²⁺ and protein kinase C*. Front. Neuroendocrinol. 19, 1–19.
- NOWAK J. Z., 1995. *Układy generujące cykliczny AMP i cykliczny GMP: różnicowanie form, regulacja i rola w przekazywaniu sygnałów*. [W:] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. KONARSKA L., (red.). PWN, Warszawa, 104–116.
- PANCHENKO M. P., SAXENA K., LI Y., CHARNECKI S., STERNWEIS P. M., SMITH T. F., GILMAN A. G., KOZASA T., NEER E. J., 1998. *Sites important for PLCbeta2 activation by the G protein betagamma subunit map to the sides of the beta propeller structure*. J. Biol. Chem. 273, 28298–28304.
- REUTER H., SIGEL E., 1991. *Ionic channels: modulations by G proteins and by phosphorylation*. Curr. Opin. Neurobiol. 1, 27–31.
- RIDLEY A. J., 1997. *Signalling by Rho family proteins*. Biochem. Soc. Transact. 25, 1005–1010.
- RINGOLD G., 1985. *Steroid hormone regulation of gene expression*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 529–566.
- RODBELL M., 1992. *The role of GTP-binding proteins in signals transduction: from the sublimely simple to the conceptually complex*. Curr. Top. Regul. 32, 1–49.
- RODBELL M., 1997. *The complex regulation of receptor-coupled G-proteins*. Adv. Enz. Regul. 37, 427–435.
- SAITO Y., 1998. *Structures and functions of small GTPase and heterotrimeric G proteins*. Jap. J. Clin. Med. 56, 1750–1755.
- TAUSSIG R., TAUSSIG G., 1998. *Type-specific regulation of mammalian adenylyl cyclases by G protein pathways*. Adv. Sec. Mess. Phosphoprot. Res. 32, 81–98.
- TAYLOR C. W., 1990. *The role of G proteins in transmembrane signalling*. Biochem. J. 272, 1–13.

- TRETYN A., 1994. *Wapń w komórkach eukariotycznych*. PWN, Warszawa.
- TSUNODA Y., 1993. *Receptor-operated Ca^{2+} signalling and crosstalk in stimulus secretion coupling*. *Biochem. Biophys. Acta* 1154, 105–156.
- VAN-DIJK M. C., POSTMA F., HILKMANN H., JALINK K., VAN-BLIT-TERSWIJK W. J., MOOLENAAR W. H., 1998. *Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca^{2+} signalling pathways*. *Curr. Biol.* 8, 386–392.
- WANG T., PENTYALA S., ELLIOTT J. T., DOWAL L., GUPTA E., REBECCHI M. J., SCARLATA S., 1999. *Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and -beta2 with activated Galphaq subunits: an alternative function for C2-signalling modules*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7843–6.
- WANG Z., GLUCK S., ZHANG L., MORAN M. F., 1998. *Requirement for phospholipase C-gamma 1 enzymatic activity in growth factor — induced mitogenesis*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 590–597.
- WARCHOŁ J., 1997. *Receptory komórkowe*. [W:] *Podstawy cytofizjologii*. KAWIAK J., MIRECKA J., OLSZEWSKA M., WARCHOŁ J., (red.). PWN, Warszawa, 448–485.
- YAMAMOTO K. R., 1985. *Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene network*. *Annu. Rev. Genet.* 19, 209–252.
- YANG H., SHEN F., HERENYIOVA M., WEBER G., 1998. *Phospholipase C (EC 3.1.4.11): a malignancy linked signal transduction enzyme*. *Anticancer Res.* 18, 1399–1404.
- ZAWILSKA J. B., VETULANI J., 1997. *Receptory – uwagi wstępne*. [W:] *Receptory – struktura, charakterystyka, funkcja*. NOWAK J.Z., ZAWILSKA J.B., (red.). PWN, Warszawa, 19–27.