

Ćwiczenie C13A

Sygnalizacja komórkowa

Pochodzenie szlaków sygnałowych

Komunikacja międzykomórkowa

Etapy transdukcji sygnału

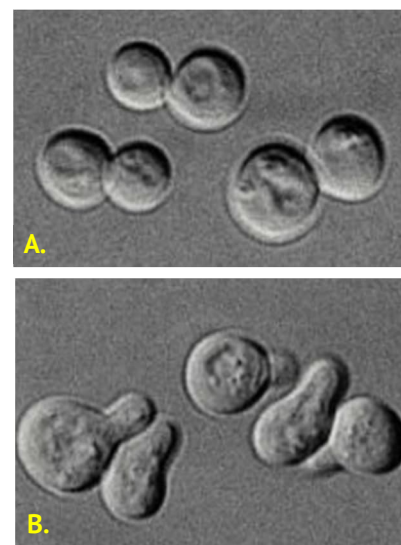
Choroby związane ze szlakami sygnałowymi

Prof. dr hab. Roman Zieliński

1. Pochodzenie szlaków sygnałowych

➔ Mechanizmy umożliwiające komórce wpływanie na zachowanie innych komórek istniały na długo przed pojawieniem się organizmów wielokomórkowych. Świadczy o tym zachowanie współczesnych organizmów jednokomórkowych. Przykładowo, komórki drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) zazwyczaj występują pojedynczo. Jednakże w niekorzystnych warunkach mogą się one komunikować ze sobą i wpływać na swoje zachowanie. Czynniki koniugacji (ang. mating factor) wydzielany przez niektóre komórki jest sygnałem dla innych komórek drożdży, aby przestać się dzielić i rozpocząć cykl płciowy. Dochodzi do fuzji haploidalnych komórek, powstania komórki diploidalnej, która w drodze mejozy produkuje nowe haploidalne komórki o zrekombinowanym układzie genów.

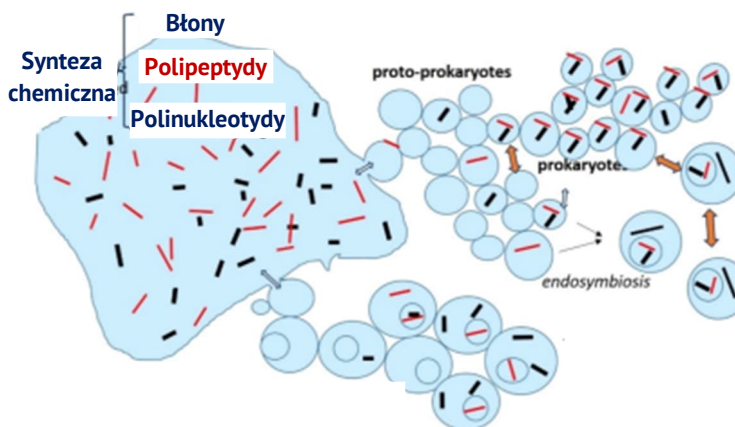
Aktywność komórek w organizmach wielokomórkowych jest koordynowana na poziomie organów oraz między organami. Umożliwia to odpowiedź organizmu jako całości na zmieniające się warunki środowiskowe. Komórki komunikują się ze sobą w obrębie organizmu oraz pomiędzy organizmami tego samego gatunku. Mechanizmy, które są zaangażowane w komunikację są zróżnicowane, ale wykazują konserwatyzm dotyczący podstawowych elementów szlaków sygnałowych, które wykazują wysoki stopień podobieństwa nawet między odległymi gatunkami. Przykładem jest szlak sygnałowy prowadzący do rozmnażania płciowego drożdży, w którym uczestniczą białka homologiczne do białek zwierzęcych.



Rys. 1. Komórki drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*). A. Wolno żyjące pojedyncze komórki są sferyczne. B. Pod wpływem czynnika koniugacji komórki wydłużają się w kierunku źródła czynnika i łączą się ze sobą.

1.1. Pochodzenie komunikacji międzykomórkowej

Tradycyjny pogląd zakłada pojawienie się komunikacji międzykomórkowej znacznie później niż pojawienie się komórek. Jednakże, sinice (Cyanobacteria), które stanowią jedną z najwcześniejszych form życia datowanych na 3,4-2,8 mld lat temu, tworzyły kolonie zwane stromalitami. Komórki w koloniach musiały się ze sobą komunikować. Dlatego



Rys. 1.1. Pochodzenie komunikacji międzykomórkowej.

nowsze teorie (Combarbus i Nyuyen 2020) zakładają istnienie komunikacji chemicznej wśród protokomórek, która była jednym z warunków ewolucji organizmów komórkowych. Zgodnie z tą koncepcją pierwsze komórki nie były izolowane, ale istniały w postaci „protokomórkowych” społeczności. Synchronizacja populacji protokomórek przez sygnalizację chemiczną mogła zapewniać lepszą ochronę przed środowiskiem zewnątrzpopulacyjnym.

1.2. Ewolucja komunikacji międzykomórkowej

Pierwotne przekaźniki (ligandy) prawdopodobnie pojawiły się jednocześnie z ich receptorami. Najstarszymi cząstkami sygnałowymi są nukleotydy (np. ATP) oraz metabolity, które pochodziły z uszkodzonych komórek. Rozróżnienie własnych związków od tych pochodzących ze środowiska zewnętrznego było czynnikiem promującym ewolucję receptorów zlokalizowanych w błonach komórkowych. Transmembranowe domeny powstawały z bogatych w pary AT, niekodujących sekwencji zlokalizowanych w pobliżu sekwencji kodujących białka. Zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych najbardziej podstawowym mechanizmem komunikacji między komórkami jest tzw. „wrażliwość na kworum”. Komplikacja tego podstawowego mechanizmu prowadzi do różnorodności cząsteczek sygnałowych i receptorów u organizmów wielokomórkowych. W trakcie ewolucji powstały liczne pary ligandów i receptorów, które pasują strukturalnie. Jednakże większość białek szlaków sygnałowych u odległych organizmów jest homologiczna.

1.2.1. „Wrażliwość na kworum”

„Wrażliwość na kworum” jest głównym mechanizmem komunikacji między komórkami bakteryjnymi. Umożliwia on monitorowanie środowiska zewnątrzkomórkowego. Cząstkami sygnałowymi są **autoinduktory**, czyli związki wydzielane przez bakterie w celu komunikacji z komórkami tego samego typu. Najczęściej wykorzystywany jest lakton N-acyl-homoserynowy (AHL). Wiąże się on z czynnikami transkrypcyjnymi, co prowadzi do zmiany ekspresji genów. „Wrażliwość na kworum” jest wykorzystywana przez bakterie podczas tworzenia biofilmów (złożone kolonie bakterii). Bakterie w ramach biofilmu wymieniają sygnały chemiczne. Umożliwia to koordynację wytwarzania np. toksyn, które atakują gospodarza. Bakteryjne biofilmy mogą powstawać na sprzęcie medycznym, a także implantach.

2. Komunikacja międzykomórkowa

➔ 2.1. Mosty cytoplazmatyczne

Mosty cytoplazmatyczne mogą mieć postać plazmodesmy w komórkach roślinnych. Ich odpowiednikami u zwierząt są połączenia szczelinowe (neksus) lub tunelowe nanorurki (ang. tunneling nanotubes). Powstają one w wyniku niepełnej cytokinezy i umożliwiają komunikację między komórkami organizmów wielokomórkowych.

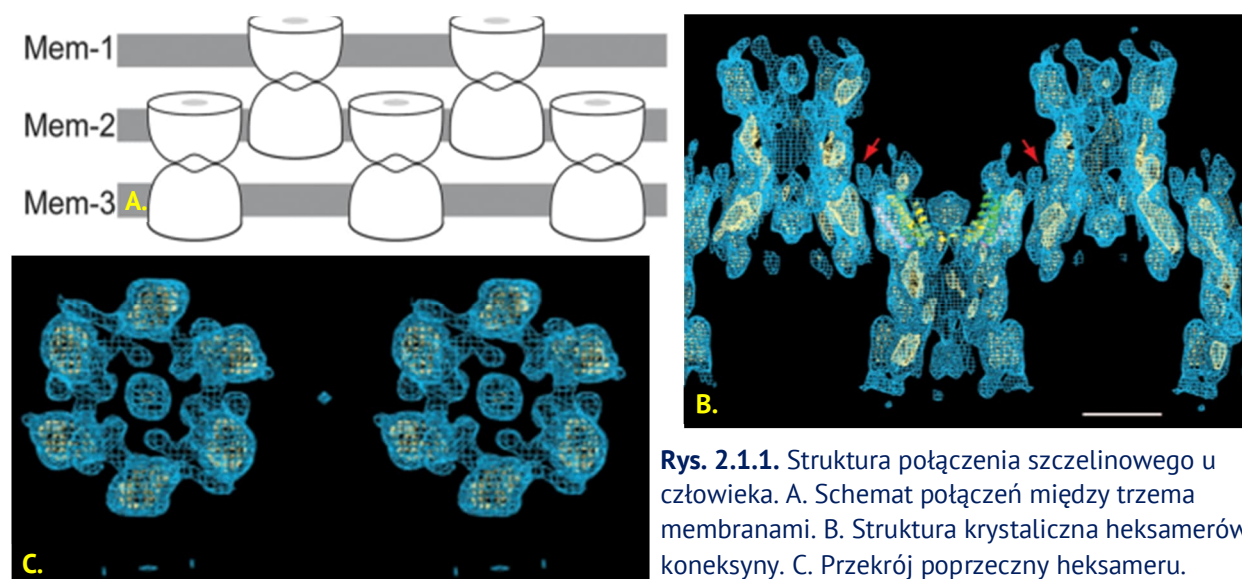
2.1.1. Połączenia szczelinowe (neksus)

Połączenie szczelinowe to połączenie międzykomórkowe zbudowane z hydrofilowego kanału oraz międzykomórkowej szczeliny. Umożliwia ono wymianę jonów (np. Ca^{2+} , IP_3) i małych cząstek (np. cyklicznych nukleotydów i oligonukleotydów). Białka budujące kanał nie są konserwatywne i mogą mieć różne pochodzenie.

U kręgowców połączenia szczelinowe zbudowane są z białek należących do rodziny koneksyn kodowanych przez geny *Gj*. U człowieka wyróżnia się 20 koneksyn. Kanał składa się z dwóch półkanałów, po jednym dla każdej komórki. W skład półkanału wchodzi sześć podjednostek tworzących heksamer, zwany koneksonem. Połączenia szczelinowe:

- umożliwiają komunikację elektryczną;
- umożliwiają komunikację chemiczną dzięki wymianie wtórnych przekaźników, w tym Ca^{2+} , IP_3 (trójfosforan inozytolu);
- umożliwiają przemieszczanie cząstek do 485 daltonów.

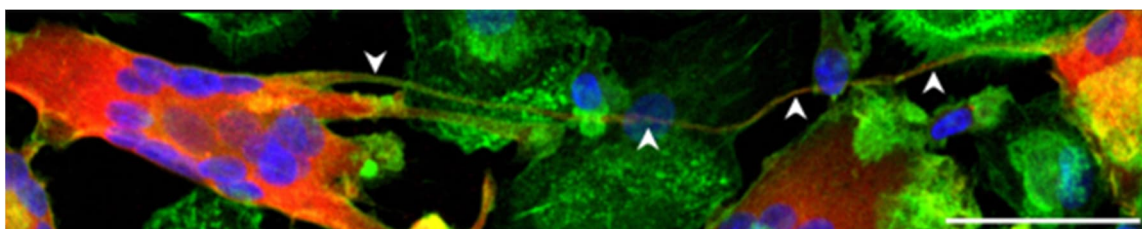
Zamykanie i otwieranie połączeń szczelinowych związane jest z rotacją podjednostek w heksamerach (półkanałach), w szczególności zaangażowane są aminokwasy w N-końcowym fragmencie koneksyn, które posiadają ładunek. Koneksyny występują w postaci izoform, które różnią się odpowiedzią na jony, pH i fosforylację. Dzięki temu kanały zbudowane z różnych izoform różnią się przepuszczalnością.



2.1.2. Tunelowe nanorurki (ang. tunneling nanotubes)

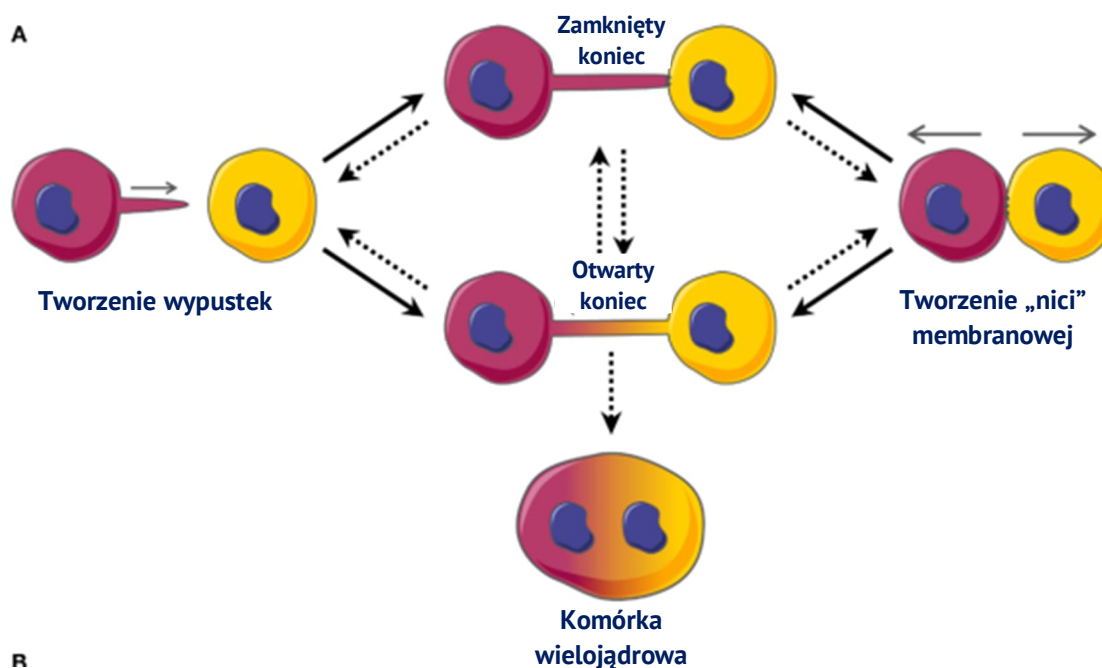
Tunelowe nanorurki (TNT) są dynamicznym połączeniem między komórkami, które mają wypustki plazmatyczne umożliwiające kontakt między odległymi komórkami. Najczęściej występują w komórkach nerwowych, nabłonkowych oraz komórkach układu immunologicznego.

Wyróżnia się dwa typy nanorurek. Pierwszy typ ma średnicę 700 nm i zawiera głównie aktynę oraz fragmenty błony komórkowej łączącej komórki. Drugi typ ma średnicę 50-200 nm, zawiera aktynę i mikrotubule. Typ ten przenosi składniki cytoplazmy, w tym mitochondria, kwasy nukleinowe, a także patogeny. Długość TNT u człowieka może dochodzić do 200 μm w makrofagach. Koniec TNT tworzy graniczne połączenie z docelową komórką lub cytoplazma dwóch połączonych komórek ulega zmieszaniu (Dupont et al. 2019).



Rys. 2.1.2a. Ludzkie makrofagi połączone TNT (Dupont et al. 2019).

Tunelowe nanorurki powstają podczas cytokinezy. Początkowo połączone komórki oddzielają się, przy czym niewielka „nić” membranowa nadal je łączy i może rozciągać się na znaczne odległości. Mechanizm ten wykorzystywany jest przez komórki limfoidalne. Drugi mechanizm obejmuje tworzenie wypustek (filopodia) przez jedną komórkę. Wypustki rozciągają się aż natrafią na drugą komórkę. Mechanizm ten jest charakterystyczny dla komórek dendrytycznych. Makrofagi wykorzystują oba mechanizmy.



Rys. 2.1.2b. Mechanizm powstawania TNT (Dupont et al. 2019).

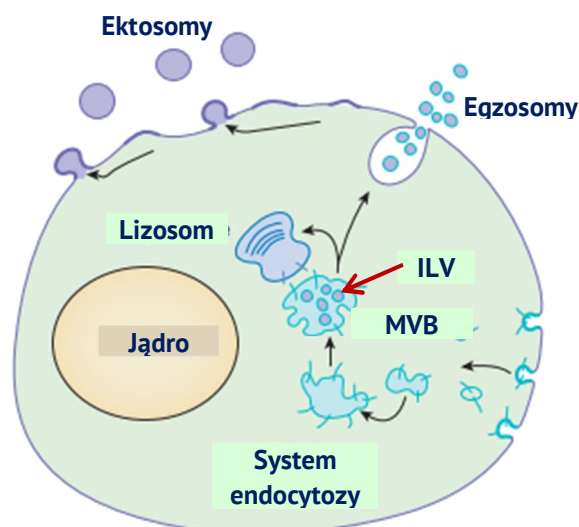
2.2. Egzosomy i ektosomy

Egzosomy i ektosomy są pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi wytwarzanymi przez wszystkie typy komórek. Odgrywają one istotną rolę w komunikacji komórkowej, ponieważ przenoszą białka i różne typy RNA. Tworzenie egzosomów i ektosomów zależy od obecności mikrodomen, które uczestniczą w akumulacji białek i RNA. Następnie dochodzi do wgłębienia błony do wnętrza komórki i uwolnienia egzosomów lub pączkowania błony komórkowej na zewnątrz i uwolnienia ektosomów (Rys. 2.2). Egzosomy i ektosomy różnią się rozmiarami, mechanizmem powstawania i regulacją. Natomiast oba typy pęcherzyków mają heterogenną zawartość. Zawierają one związki rzadko występujące w innych strukturach komórkowych, krążą w macierzy pozakomórkowej przez zróżnicowany czas oraz podlegają fuzji w komórce docelowej. W egzosomach i ektosomach zidentyfikowano 2 216 białek, z czego 193 było specyficznych dla egzosomów, a 371 było specyficznych dla ektosomów.

2.2.1. Egzosomy

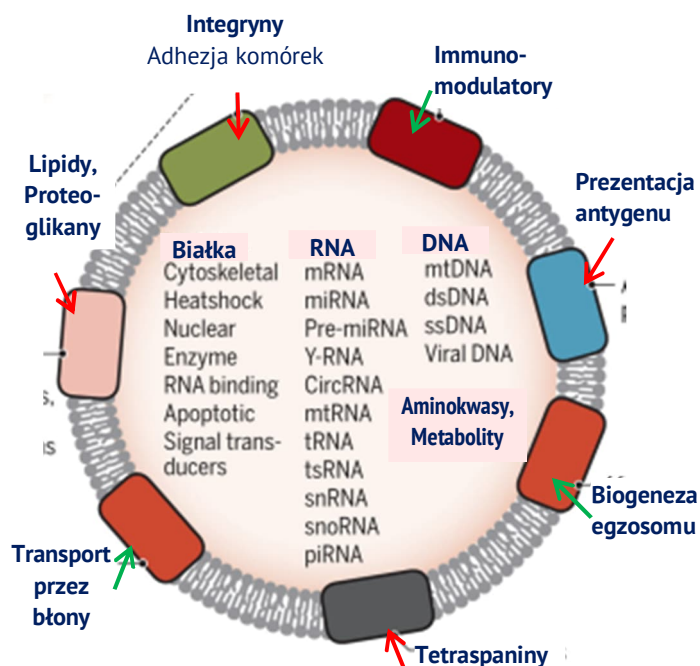
Egzosomy mają średnicę 50-150 nm i są pochodzenia endosomalnego. Wczesne endosomy (struktury biorące udział w sortowaniu materiału pobranego w endocytozie) wędrują w głąb cytoplazmy. Błona endosomów ulega wgłębieniu (inwazji do środka), co prowadzi do powstania wewnętrznych pęcherzyków zwanych ciałkami „wewnątrz światła” endosomu (ang. intraluminal vesicles, ILV). Endosomy z ILV określane są mianem ciałek wielopęcherzykowatych (ang. multivesicular bodies, MVB). Egzosomy to wydzielane na zewnątrz ILV (Rys. 2.2). Powstawanie egzosomów regulowane jest przez endosomalny kompleks sortujący niezbędny do transportu (ESCRT), który zbudowany jest z czterech białkowych kompleksów aktywnych w remodelowaniu błon komórkowych, pączkowaniu wirusów, cytokinezie, autofagii i wielu innych procesach.

Błona egzosomów zawiera wysokie stężenie cholesterolu oraz sfingomieliny. Ponadto występują tu ceramidy będące produktem przemian sfingomieliny i stanowiące istotny element biogenezy ILV. W błonie egzosomów występuje kwas lizobifosfatydowy, niekonwencjonalny lipid, na ogół nieobecny w błonach innych organelli. Może pełnić funkcje cząstki sygnałowej. Tetraspaniny są białkami membranowymi zbudowane z czterech transmembranowych α -helis. Tetraspaniny współdziałają z białkami cytosolowymi i uczestniczą w wypełnianiu światła ILV. Ponadto stanowią rodzaj „pułapki” dla wewnątrzkomórkowych cząstek sygnałowych. Razem z białkami światła ILV, tetraspaniny uczestniczą w akumulacji RNA, białek wiążących się z RNA i modyfikujących jego funkcję (np. białko Argonauta 2, AGO2).



Rys. 2.2. Powstawanie egzosomów i ektosomów (Meidolesi 2018). Powstawanie egzosomów zależy od endocytozy. Ektosomy powstają na błonie komórkowej.

Skład światła egzosomów jest zróżnicowany (Rys. 2.2.1) i zależy od typu komórki. Światło egzosomów zawiera białka odzwierciedlające na ogół proteom komórki. Istnieją także dane wskazujące na sortowanie do egzosomów białek pełniących funkcje cząstek sygnałowych w komórkach docelowych, w których indukują szlaki związane z rozwojem, odpowiedzią immunologiczną oraz pojawianiem się chorób przewlekłych. W świetle egzosomów występują także kwasy nukleinowe, RNA oraz DNA, jedno i dwuniciowe.



Rys. 2.2.1. Budowa i skład egzosomów (Kalluri i LeBleu 2020).

Egzosomy wykazują tropizm. Badania na myszach wykazały, że egzosomy mogą czasami wprowadzać do komórek docelowych mRNA. Częstość tego procesu wzrastała pod wpływem aktywacji układu immunologicznego, zwłaszcza w przewlekłych stanach zapalnych (Kalluri i LeBleu 2020). Potwierdzone funkcje egzosomów u człowieka dotyczą szeregu procesów fizjologicznych.

- Rozród, ciąża i embriogeneza – egzosomy dostarczają miRNA z łożyska do komórek niełożyskowych. Egzosomy są jednym z mechanizmów ochrony płodu przed infekcjami wirusowymi.
- Egzosomy uczestniczą w indukcji wrodzonej i nabytej odporności dzięki transportowi i prezentacji antygenów, wydzielaniu stymulatora syntetazy cGMP-AMP dla szlaku interferonu, zmianie ekspresji genów przez miRNA oraz indukcji szlaków sygnałowych przy pomocy powierzchniowych ligandów.
- Egzosomy uczestniczą w wymianie miRNA pomiędzy komórkami trzustki, tłuszczowymi, mięśni szkieletowych oraz wątroby. Zaburzenia tego procesu mogą prowadzić do chorób metabolicznych.
- W mózgu egzosomy uczestniczą w pozbywaniu się białek o nieprawidłowej strukturze II i III-rzędowej.

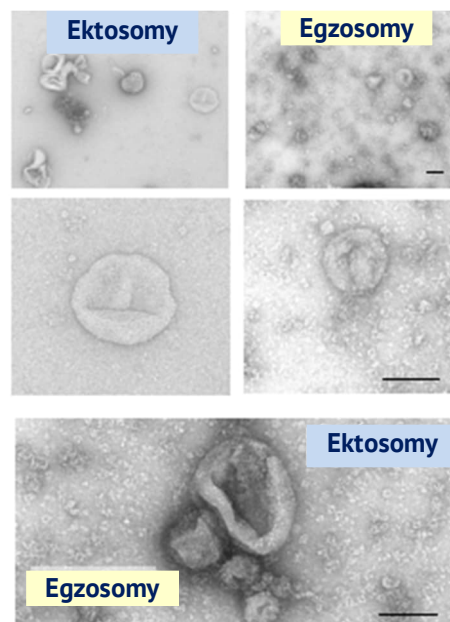
2.2.2. Ektosomy

Ektosomy mają średnicę 100-500 nm. Powstają przez „pączkowanie” błony komórkowej na zewnątrz. Ich tworzenie wynika z remodelowania warstwy fosfolipidowej błony komórkowej pod wpływem enzymów zależnych od jonów Ca^{2+} , flipaz oraz flofaz. Ponadto powstawanie ektosomów jest regulowane przez GTPazę Arf6, która wpływa na ruch pęcherzyków oraz GTPazy z rodziny Rho, RhoA, Cdc42 i Rac1, które wpływają na aktyny w pobliżu błony komórkowej.

Błony ektosomów są bogate w cholesterol, zawierają integryny i tetraspaniny podobnie jak błony egzosomów. Ponadto zawierają metaloproteiny, receptory glikoproteinowe oraz białko P-selektynę.

Światło ektosomów zawiera białka typowe dla cytosolu. Stężenia białek szoku termicznego w ektosomach mogą być podobne do ich stężeń w cytosolu. Jednakże większość białek występuje w wyższych stężeniach niż w cytosolu.

Wydzielanie ektosomów jest szybsze niż egzosomów, co związane jest z ich krótszą biogenezą. Makrofagi oraz komórki mikroglejowe wydzielają znaczne ilości ektosomów, nawet w czasie spoczynku. W innych komórkach wydzielanie wzrasta pod wpływem różnych czynników, w tym Ca^{2+} , ATP.

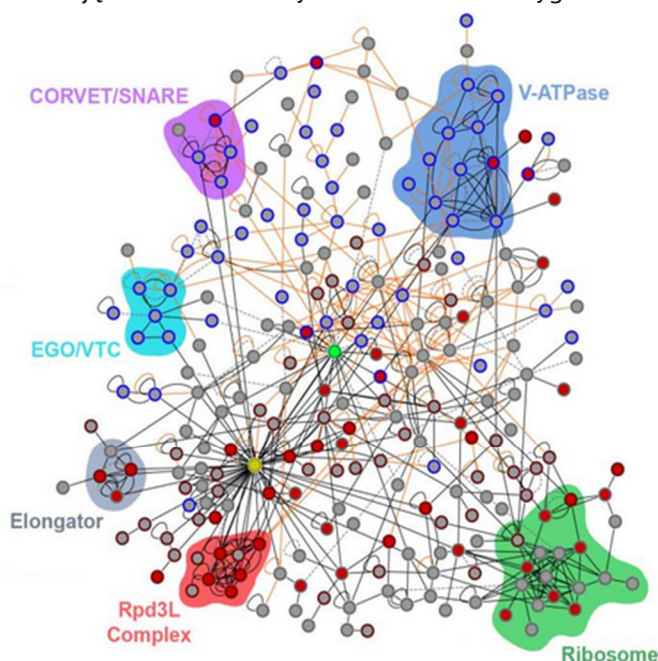


Rys. 2.2.2. Ektosomy i egzosomy wydzielane przez komórki neuronowe. Linia odpowiada 100 nm (Bras et al. 2022).

2.3. Komunikacja za pomocą cząstek sygnałowych

Prawie wszystkie komórki organizmów wielokomórkowych wytwarzają cząstki sygnałowe zdolne do wpływania na odległe komórki. U zwierząt, w tym człowieka, do cząstek sygnałowych należą hormony, neuroprzekaźniki, cytokiny, czynniki wzrostu i inne. Cząstki sygnałowe (ligandy) rozpoznawane są przez receptory zlokalizowane w błonie komórkowej lub przez receptory jądrowe (czynniki transkrypcyjne). Ligandy uruchamiają wieloetapowy proces transdukcji sygnału, który umożliwia reakcję komórki. Każdy element szlaku sygnałowego prowadzi do zmiany konformacji elementu następnego.

Zmiana ta najczęściej związana jest z działaniem kinaz dodających grupy fosforanowe (fosforylacja) lub fosfataz, które usuwają grupy fosforanowe.



Rys. 2.3. Sieć sygnałowa TORC1. TORC1 to tzw. cel rapamycyny. Głównym składnikiem kompleksu jest kinaza TOR. Reguluje ona wzrost i proliferację komórek eukariotycznych. Sygnały aminokwasowe są transmitowane przez GTPazy do TOR. Sieć reguluje także odpowiedź na stres, np. głód.

Typowa komórka w wielokomórkowym organizmie podlega wpływom setek różnych sygnałów. Komórki odpowiadają na sygnały selektywnie, gdyż każda komórka jest wyspecjalizowana w odpowiedzi na specyficzną kombinację sygnałów. W efekcie dana cząstka sygnałowa może mieć różny wpływ na poszczególne komórki. Przykładowo, acetylocholina stymuluje skurcz mięśni szkieletowych, ale obniża częstość i siłę skurczu mięśnia sercowego. Różnica wynika z różnych receptorów w mięśniach szkieletowych i w mięśniu sercowym.

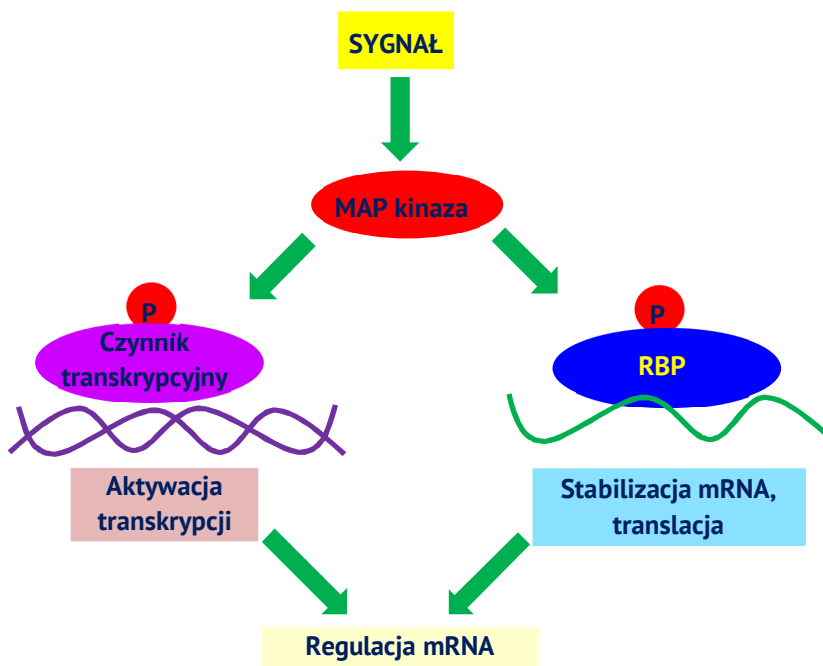
➔ 3. Etapy transdukcji sygnału

3.1. Elementy transdukcji sygnału

- **Pierwotny przekaźnik** (ligand) to cząsteczka sygnałowa, nośnik informacji. Sygnały mogą mieć charakter mechaniczny, elektryczny lub chemiczny. Sygnał chemiczny to związek, który łączy się z receptorem. Ligandami mogą być białka i peptydy (np. hormony peptydowe, cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu), aminokwasy, lipidy (np. prostaglandyny, steroidy), kwasy nukleinowe, złożone cukry (np. β -glukan) i inne związki (np. tlenek azotu). Ligandy mogą być gromadzone w błonie komórkowej, wydzielane na zewnątrz, przenoszone do odległych komórek. Przykładowo, dla cAMP ligandami są często hormony (adrenalina/epinefryna; kortykotropina, glukagon) i neuroprzekaźniki (acetylocholina).
- **Receptor** to cząstka, najczęściej białko, która odbiera sygnał docierający do komórki. Po połączeniu z ligandem zmienia się konformacja receptora, co powoduje aktywację pierwotnego efektoru. W szlakach związanych z cAMP receptorami są tzw. receptory sprzężone z białkiem G (ang. G protein coupled receptors, GPCR) np. receptory adrenergiczne β . Aktywacja receptorów sprzężonych z białkiem G może także nastąpić pod wpływem inozytolu oraz może nastąpić na skutek uruchomienia innych szlaków sygnałowych, np. związanych z wapniem i działaniem kalmoduliny i kalcyneuryny. Mechanizm aktywacji pierwotnego efektoru może różnić się w zależności od receptora.
- **Pierwotny efektor** to najczęściej enzymy, które syntetyzują kolejne cząstki sygnałowe, dzięki czemu przenoszą sygnał do cytoplazmy. Pierwotnym efektoru w szlaku cAMP jest cyklaza adenylova aktywowana przez receptory sprzężone z białkiem G. Cyklazy adenylova mają pochodzenie polifiletyczne. Wyróżnia się 6 klas cyklazy adenylova. Klasy te tworzą odrębne rodziny genów o nieznannej homologii. U Eukariota występuje najczęściej klasa III.
- **Wtórny przekaźnik** to wewnątrzkomórkowy związek, który uczestniczy w transdukcji sygnału i tym samym generuje różne odpowiedzi komórki. Wtórny przekaźnikiem jest cAMP, Ca^{2+} .
- **Wtórny efektor** to najczęściej enzym, który uczestniczy w procesach biochemicznych. Wtórnymi efektorami są:
 - ▶ kinaza białkowa (ang. protein kinase, PKA),
 - ▶ czynnik wymiany nukleotydów guaninowych (ang. guanine-nucleotide-exchange factor, GEF);
 - ▶ kanały jonowe cyklicznych nukleotydów.
- **Odpowiedź na poziomie komórkowym** – kinazy przeprowadzają proces fosforylacji np. białek z motywem Arg-Arg-X-Ser, do których należy szereg cytoplazmatycznych i jądrowych białek, w tym syntetaza glikogenu, acetylo-CoA karboksylaza. Kinazy PKA regulują transkrypcję poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych.

Kinazy MAP biorą udział w regulacji poziomu mRNA w komórce. W regulacji ekspresji genów nie tylko jest ważna aktywacja genów, ale także kontrola po-translacyjna obejmująca kontrolę degradacji mRNA. Białka wiążące się z RNA (RBP) kontrolują ekspresję licznych genów poprzez przyłączanie się do mRNA genów kodujących np. protoonkogeny, czynniki wzrostu, czynniki transkrypcyjne.

Białka wiążące mRNA są fosforylowane przez kinazy MAPK. Fosforylacja białek wiążących mRNA prowadzi do przyłączenia mRNA i jego stabilizację, a następnie translację. Defosforylacja białek wiążących mRNA prowadzi do degradacji danej cząsteczki.



Rys. 3.1. Regulacja mRNA w szlaku kinazy MAP. Kinazy MAP regulują ekspresję genów na poziomie transkrypcji i translacji. Fosforylacja czynników transkrypcyjnych prowadzi do syntezy mRNA. Fosforylacja białek wiążących mRNA (RBP) powoduje stabilizację mRNA, co umożliwia translację.

3.2. Szlak sygnałowy cAMP



3.2.1. Charakterystyka cAMP

Na podstawie materiałów zawartych w Internecie proszę podać:

- A. Pełną nazwę oraz budowę chemiczną cAMP.
- B. Jak powstaje cAMP w komórce?

3.2.2. Elementy szlaku sygnałowego cAMP

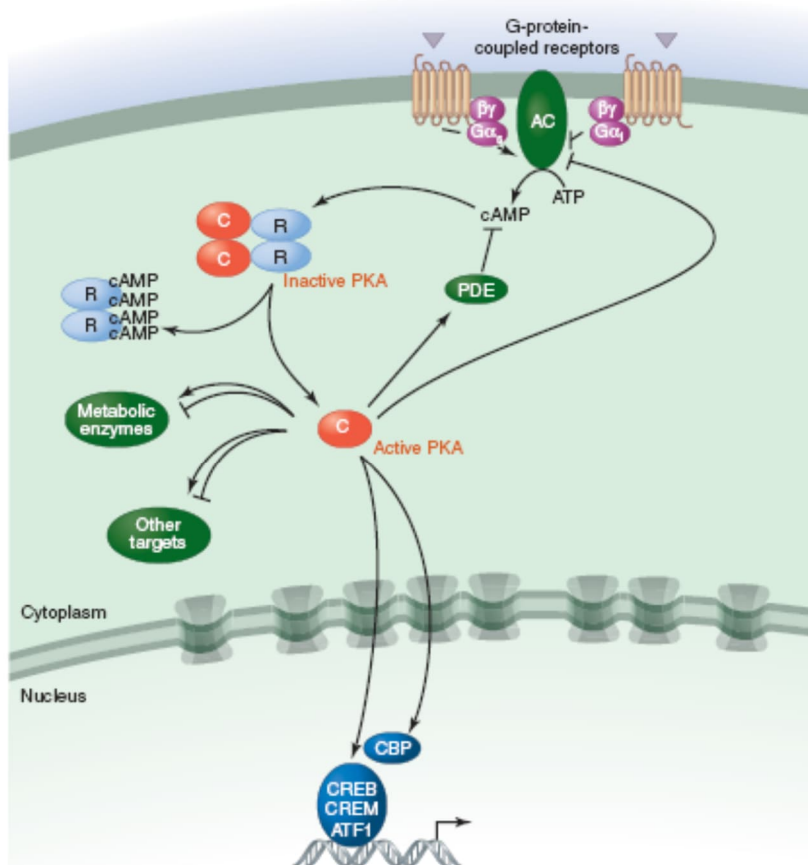
Na rysunku 3.2.2 przedstawiono elementy szlaku sygnałowego cAMP. Korzystając z tego rysunku proszę przedstawić ciąg zdarzeń, gdy na komórkę ludzką działa epinefryna.

3.2.3. Geny kodujące cyklazę adenylową u człowieka

U człowieka występuje 10 izoenzymów cyklazy adenylowej oznaczonych odpowiednio ADCY1, ADCY2, ADCY3, ADCY4, ADCY5, ADCY6, ADCY7, ADCY8, ADCY9, ADCY10.

- A. Czy wymienione izoenzymy dziedziczą się niezależnie, czy mogą być sprzężone? Proszę uzasadnić odpowiedź.

B. Jeżeli matka ma nieaktywny enzym ADCY3 na skutek wystąpienia mutacji w stanie homozygotycznym, a ojciec ma nieaktywny enzym ADCY10, również na skutek mutacji w stanie homozygotycznym, to jakie jest prawdopodobieństwo, że dziecko tych rodziców będzie zdrowe. Zakładamy, że matka jest homozygotą w locus *adcy10*, wytwarzającą aktywny enzym, a ojciec homozygotą w locus *adcy3*, również wytwarzającą aktywny enzym. Jaki będzie genotyp tego dziecka w obu loci?



Rys. 3.2.2. Szlak sygnałowy cAMP (G-protein coupled receptors: receptory sprzężone z białkiem G, AC: cyklaza adenylowa, PKA: kinaza białkowa, PDE: fosfodiesteraza, CBP: regulowany sygnałem aktywator transkrypcji, CREB: czynnik transkrypcyjny skojarzony z odpowiedzią na cAMP, CREM: czynnik transkrypcyjny związany z odpowiedzią na cAMP, modulator transkrypcji, ATF1: czynnik transkrypcyjny, aktywator).

3.3. Szlak sygnałowy kinaz MAP (MAPK)

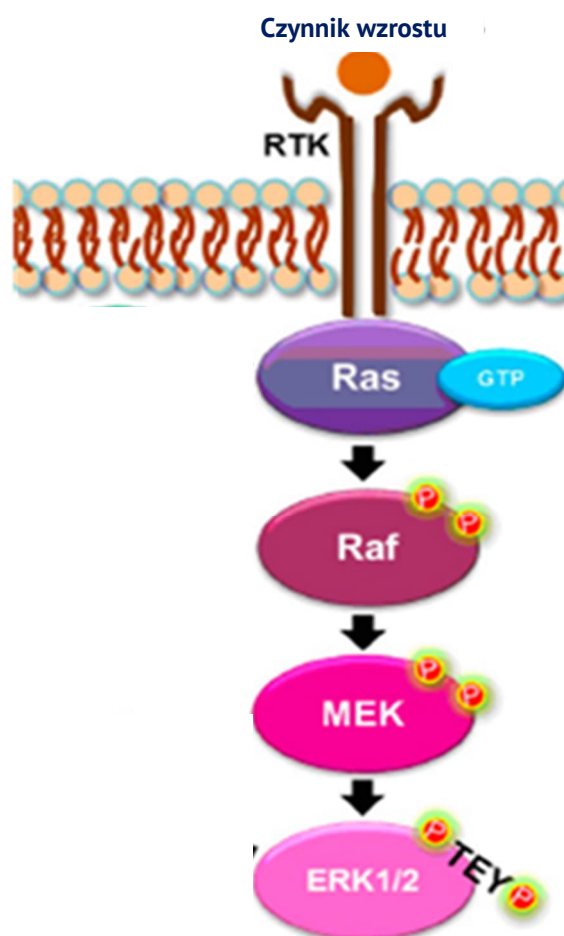
Kinazy MAP to kinazy aktywowane mitogenami (związki indukujące mitozę). Stanowią one grupę kinaz serynowo-treoninowych, które mają zdolność fosforylacji własnych aminokwasów (seryn i treonin) oraz aminokwasów w białkach będących ich substratami.

Kinazy MAP są konserwatywne ewolucyjnie i regulują wiele procesów komórkowych, w tym podział, odpowiedź na stres, odpowiedź immunologiczną i apoptozę. Mają one strukturę hierarchiczną, co oznacza, że aktywacja pierwszej kinazy na skutek jej fosforylacji prowadzi do serii fosforylacji aż do aktywacji białka, które wpływa na regulację ekspresji genów. Zaburzenia w szlakach MAPK prowadzą często do nowotworów. U ssaków występują co najmniej cztery szlaki sygnałowe MAPK.

- Szlak ERK1/2 uczestniczy w podziałach komórkowych. Jest on aktywowany czynnikami wzrostu, hormonami i czynnikami prozapalnymi.
- Szlak JNK jest aktywowany przez stresy środowiskowe i czynniki prozapalne. Jest on związany z różnicowaniem komórek i apoptozą.
- Szlak p38 związany jest z izoformami białka p38, aktywowany podobnie jak JNK.
- ERK5 jest także związany ze stresami środowiskowymi, ale może być również aktywowany przez czynniki wzrostu.

3.3.1. Elementy szlaku ERK1/2 (Rys 3.3)

- **Czynnik wzrostu:** np. EGF aktywuje szlak ERK1/2.
- **RTK:** receptor dla kinazy tyrozynowej w błonie komórkowej. Przyłączenie czynnika wzrostu prowadzi do zmiany konformacji błony i aktywacji białka Ras.



Rys. 3.3. Szlak sygnałowy MAPK: ERK1/2 (Soares-Silva i inni, 2016).

- **Ras: małe białko G**, które jest aktywowane przez przyłączenie GTP. Nieaktywne białko połączone jest z GDP. Aktywne białko G-Ras łączy się i aktywuje Raf.
- **Raf**: kinaza serynowo-treoninowa, jest aktywowana przez interakcję z aktywnym G-Ras. Aktywacja Raf polega na fosforylacji. Aktywna kinaza Raf aktywuje MEK.
- **MEK (MAP3K1)**: kinaza aktywowana przez mitogeny. Ma podwójną specyfikę, gdyż działa jak kinaza tyrozynowa oraz kinaza seryno-treoninowa. MEK aktywuje (fosforyluje) kinazę ERK 1/2.
- **ERK1 (MAPK3) i ERK2(MAPK1)**: kinaza MAP, która występuje w postaci dwóch izoform, ERK1 i ERK2. ERK1/2 jest fosforylowana w obrębie treoniny i tyrozyny (motyw TEY). Aktywne formy ERK wpływają na transkrypcję przez fosforylację czynników transkrypcyjnych oraz na translację przez fosforylację rybosomalnej kinazy S6 i fosforylację czynnika TCF regulującego inicjację translacji. Tym samym, ERK może wpływać na białka zarówno w cytoplazmie jak i jądrze.



3.3.2. Proszę scharakteryzować szlak sygnałowy ERK1/2

- A. Na podstawie przedstawionego opisu elementów szlaku ERK1/2 oraz rysunku 3.3 proszę podać, które elementy są ligandami, receptorami, pierwotnymi i wtórnymi efektorami, wtórnymi przekaźnikami zgodnie z kolejnością działania.
- B. Dla białek Ras, Raf, MEK, ERK1 i ERK2 proszę podać lokalizację na chromosomach z uwzględnieniem ramion i prążków. Proszę skorzystać z OMIM.
- C. ERK1 i ERK2 są izoenzymami. Proszę podać czy są one allozymami. Proszę uzasadnić.

Samodzielne wykonanie 3.3.2: 5 punktów

Termin: 25.05.2023., 23:59

4. Choroby związane ze szlakami sygnałowymi

4.1. Cholera

Cholera jest wywoływana Gram ujemną bakterią, *Vibrio cholerae*, która wydziela toksynę CT, zbudowaną z dwóch katalitycznych jednostek, A i B. Jednostka B przyczepia się do powierzchni komórki, na której funkcjonuje jako białko penetrujące membranę, wstrzykujące jednostkę A do komórki. Toksyna przyczepia się do receptorów sprzężonych z białkiem G (GM1) w komórkach nabłonka jelita. Po wnikięciu do komórki jednostka A katalizuje powstanie cAMP, co uruchamia szlak sygnałowy związany z cAMP.

4.2. Migrena

Migrena: charakteryzuje się silnym bólem głowy w części przedniej lub z jednej strony głowy. Często jest powiązana ze światłowstrętem. Jest efektem zmian w aktywności kanałów jonowych. Migrena wrodzona jest związana ze zmianą aktywności kanału Cav2.1 P/Q na skutek mutacji lub zmianą aktywności kanału TRESK (kanał K2P) związanego z transportem jonów potasu, K⁺. Kanał TRESK kodowany jest przez gen na chromosomie 10. Mutacja zmiany ramki odczytu, F139WfsX24 prowadzi do wcześniejszego zakończenia translacji i krótszego produktu TRESK. Wykazano, że mutacja ta jest skorelowana z migreną wraz z aurą, na podstawie badań wielopokoleniowej rodziny. W badaniach populacyjnych obejmujących 504 osoby stwierdzono korelację między migreną a mutacją zmiany sensu, A34V. TRESK funkcjonuje jako aktywator bólu.

4.3. Otyłość

Otyłość rozwija się w wyniku braku równowagi w sieci powiązań metabolicznych. Niektóre typy otyłości są prawdopodobnie związane z zaburzeniami szlaku sygnałowego dotyczącego dostarczania pokarmu i ośrodka łaknienia. Istnieje kilka mutacji, które mogą odpowiadać za genetycznie uwarunkowaną otyłość.

- Mutacje w genach leptyny lub receptora leptyny prowadzą do silnej otyłości. Leptyna jest wydzielana przez komórki tłuszczowe. Działa na receptory leptynowe w podwzgórzu. Po połączeniu leptyny z receptorami neurony przestają wytwarzać neuropeptyd Y, który jest stymulatorem apetytu. Gen leptyny jest zlokalizowany na chromosomie 7.
- Mutacje w genie POMC (2 p23.3), który koduje pro-opiomelanokortynę, prekursora α -MSH (α -melanokortyna), prowadzą do wczesnej otyłości. Ekspresja POMC zachodzi w przednim i środkowym płacie przysadki. MSH to hormon melanotropowy. Poziom hormonu zwiększa się pod wpływem leptyny.

Odpowiedzi

3. Etapy transdukcji sygnału

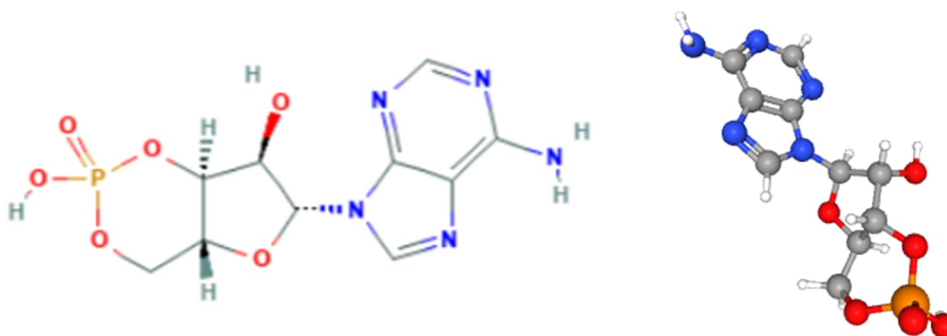
3.2. Szlak sygnałowy cAMP

3.2.1. Charakterystyka cAMP

Na podstawie materiałów zawartych w Internecie proszę podać:

A. Pełną nazwę oraz budowę chemiczną cAMP.

- cAMP: cykliczny adenozylo 3,5'-monofosforan.
- Jest to nukleotyd składający się z adeniny, rybozy oraz reszty kwasu ortofosforowego.
- Jest to pochodna ATP.
- Masa molowa: 329 g/mol
- $C_{10}H_{12}N_5O_6P$



Rys. 3.2.1. Struktura chemiczna (po lewej) i przestrzenna cAMP (po prawej).

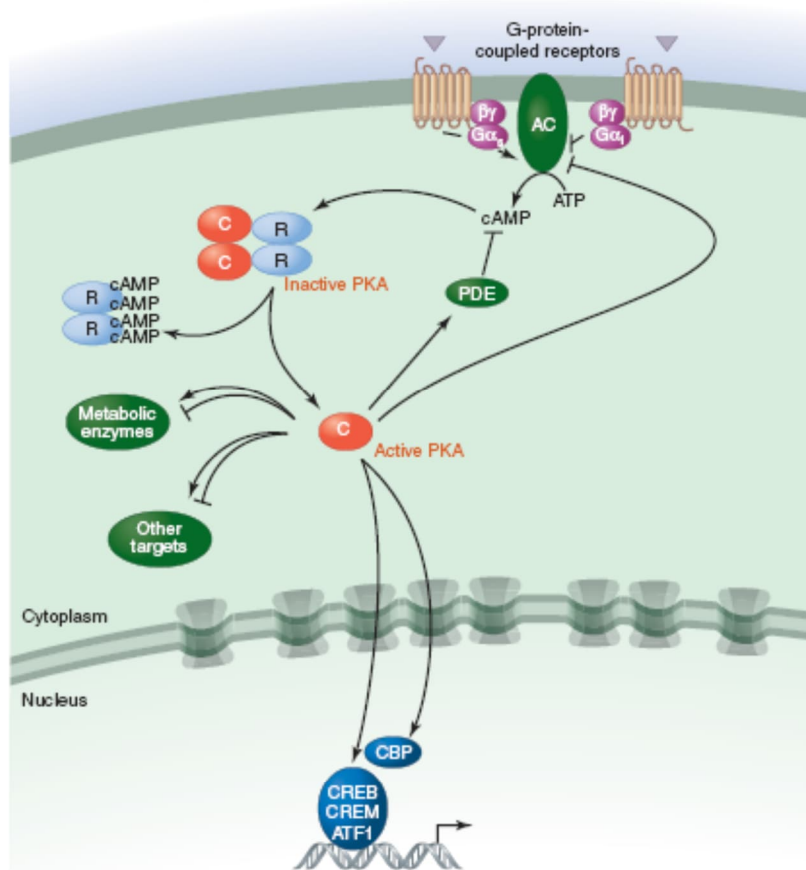
B. Jak powstaje cAMP w komórce?

- Powstaje w wyniku cyklizacji, czyli przekształcenia związku łańcuchowego w cykliczny.
- Dochodzi do odszczepienia reszty kwasu ortofosforowego w ATP, grupa 3'OH rybozy atakuje grupę fosforanową tworząc wiązanie fosfodiesterowe z uwolnieniem fosforanu.
- Reakcja jest katalizowana przez enzym cyklazę adenylową (ang. adenyl cyclase, AC).
- cAMP jest rozkładane (hydrolizowane) przez fosfodiesterazę (ang. cyclic nucleotide phosphodiesterase, PDE).

3.2.2. Elementy szlaku sygnałowego cAMP

Na rysunku 3.2.2 przedstawiono elementy szlaku sygnałowego cAMP. Korzystając z tego rysunku proszę przedstawić ciąg zdarzeń, gdy na komórkę ludzką działa epinefryna.

- Epinefryna jest ligandem rozpoznawanym przez receptory sprzężone z białkiem G.
 - Receptor sprzężony z białkiem G zmienia konformację, co prowadzi do aktywacji pierwotnego efektor – cyklazy adenylowej.
 - Pierwotny efektor, cyklaza adenylowa syntetyzuje wtórny przekaźnik, cAMP.
 - Wtórny przekaźnik, cAMP aktywuje kinazę białkową – wtórny efektor. cAMP łączy się z jednostką regulacyjną (R) kinazy.
- Odblokowuje to jednostkę katalityczną kinazy (C), która fosforyluje aktywator transkrypcji, CBP oraz czynniki transkrypcyjne CREB, CREM i ATF1.



Rys. 3.2.2. Szlak sygnałowy cAMP (G-protein coupled receptors: receptory sprzężone z białkiem G, AC: cyklaza adenylowa, PKA: kinaza białkowa, PDE: fosfodiesteraza, CBP: regulowany sygnałem aktywator transkrypcji, CREB: czynnik transkrypcyjny skojarzony z odpowiedzią na cAMP, CREM: czynnik transkrypcyjny związany z odpowiedzią na cAMP, modulator transkrypcji, ATF1: czynnik transkrypcyjny, aktywator.

3.2.3. Geny kodujące cyklazę adenylową u człowieka

U człowieka występuje 10 izoenzymów cyklazy adenylowej oznaczonych odpowiednio: ADCY1, ADCY2, ADCY3, ADCY4, ADCY5, ADCY6, ADCY7, ADCY8, ADCY9, ADCY10.

A. Czy wymienione izoenzymy dziedziczą się niezależnie czy mogą być sprzężone? Proszę uzasadnić odpowiedź.

- Aby odpowiedzieć na to pytanie należy sprawdzić lokalizację genów kodujących cyklazę adenylową. Wykorzystujemy OMIM lub NCBI. Geny dla poszczególnych izoenzymów leżą odpowiednio:

- ▶ ADCY1: chromosom 7
- ▶ ADCY2: chromosom 5

- ▶ ADCY3: chromosom 2
 - ▶ ADCY4: chromosom 14
 - ▶ ADCY5: chromosom 3
 - ▶ ADCY6: chromosom 12
 - ▶ ADCY7: chromosom 16, q12.1
 - ▶ ADCY8: chromosom 8
 - ▶ ADCY9: chromosom 16, p13.3
 - ▶ ADCY10: chromosom 1
- Wszystkie izoenzymy za wyjątkiem ADCY7 i ADCY9 dziedziczą się niezależnie, gdyż kodujące je geny leżą na różnych chromosomach.
 - Geny dla ADCY7 i ADCY9 leżą na jednym chromosomie, 16 i potencjalnie mogą być sprzężone. Jednakże leżą one na dwóch ramionach (odpowiednio długim i krótkim) i jest prawdopodobne, że częstość rekombinacji pomiędzy tymi loci wynosi 50%, co oznaczałoby dziedziczenie niezależne.
- B.** Jeżeli matka ma nieaktywny enzym ADCY3 na skutek wystąpienia mutacji w stanie homozygotycznym, a ojciec ma nieaktywny enzym ADCY10, również na skutek mutacji w stanie homozygotycznym, to jakie jest prawdopodobieństwo, że dziecko tych rodziców będzie zdrowe. Zakładamy, że matka jest homozygotą w locus *adc10* wytwarzającą aktywny enzym, a ojciec homozygotą w locus *adc3* również wytwarzającą aktywny enzym. Jaki będzie genotyp tego dziecka w obu loci?
- Prawdopodobieństwo urodzenia zdrowego dziecka wyniesie 100%.
 - Wszystkie dzieci będą heterozygotami w obu loci. W odniesieniu do ADCY3, każde dziecko otrzyma od matki allel warunkujący nieaktywny enzym oraz allel warunkujący aktywny enzym od ojca. W odniesieniu do ADCY10 każde dziecko otrzyma allel warunkujący aktywny enzym od matki oraz allel warunkujący nieaktywny enzym od ojca. W efekcie wszystkie dzieci będą miały aktywne formy enzymu w obu loci i będą zdrowe.