

## Ćwiczenie 04

### Analiza szlaku sygnałowego cAMP. Choroby związane z zaburzeniem szlaków sygnałowych. Analiza ekspresji genów w odpowiedzi na stres.

Kornelia Polok

#### 1. Analiza szlaku sygnałowego cAMP

##### 1.1. Charakterystyka cAMP

Na podstawie materiałów zawartych w Internecie proszę podać:

- A. Pełną nazwę oraz budowę chemiczną cAMP. (1 punkt)
- B. Jak powstaje cAMP w komórce? (1 punkt)

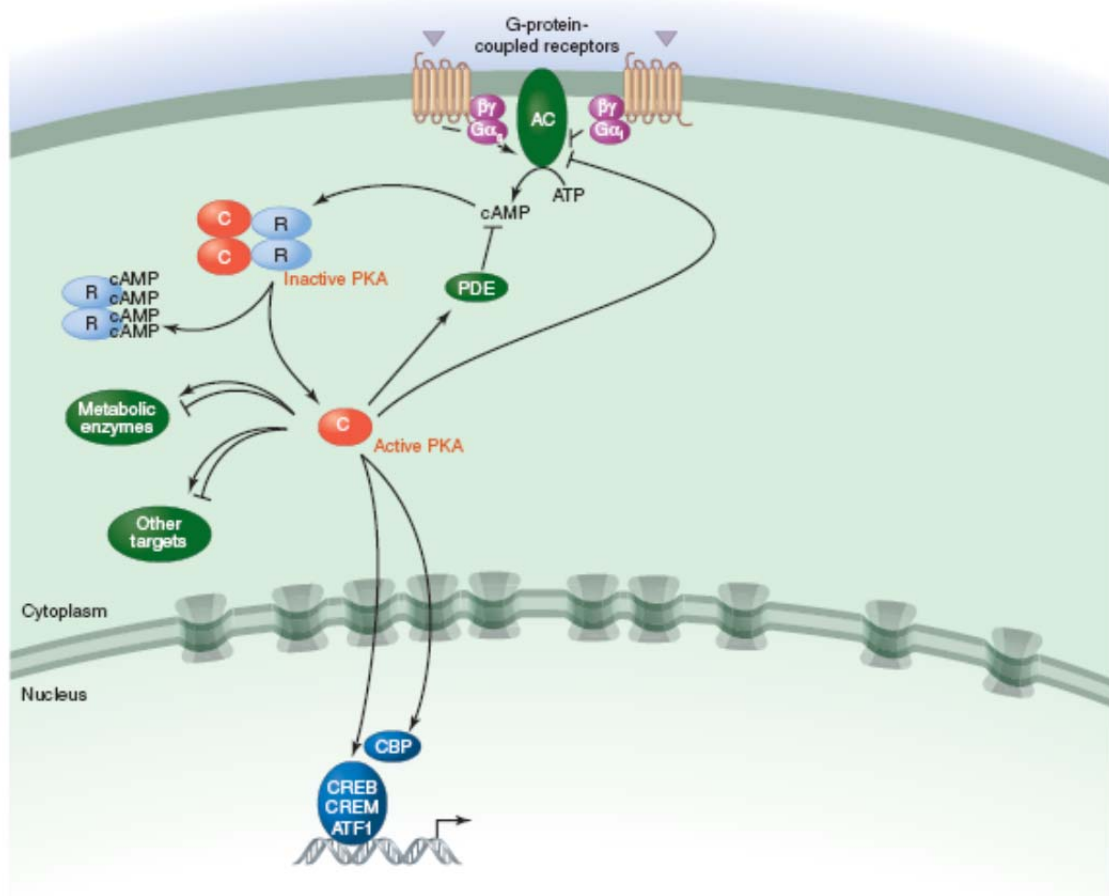
*Czas wykonania 15 minut.*

##### 1.2. Etapy sygnalizacji komórkowej

Sygnalizacja komórkowa jest jednym z ważniejszych procesów, który pozwala komórkom odbierać sygnały z zewnątrz oraz odpowiadać na nie. Proces przekazywania sygnału obejmuje najczęściej następujące etapy oraz cząsteczki.

- **Pierwotny przekaźnik, ligand:** cząsteczka sygnałowa, nośnik informacji, związek, który łączy się z receptorem. Ligandami mogą być białka, peptydy, aminokwasy, lipidy, cukry. Ligandy mogą być gromadzone w błonie komórkowej, wydzielane na zewnątrz, przenoszone do odległych komórek. W przypadku cAMP ligandami są często hormony (adrenalina/epinefryna; kortykotropina, glukagon) i neuroprzekaźniki (acetylocholina).
- **Receptor:** przekaźnik sygnału. Po połączeniu z ligandem zmienia się konformacja receptora, co powoduje aktywację pierwotnego efektora. W szlakach związanych z cAMP receptorami są tzw. receptory sprzężone z białkiem G (ang. G protein coupled receptors, GPCR) np. receptory adrenergiczne  $\beta$ . Aktywacja receptorów sprzężonych z białkiem G może także pod wpływem inozytolu oraz może nastąpić na skutek uruchomienia innych szlaków sygnałowych, np. związanych z wapniem i działaniem kalmoduliny i kalcyneuryny.

- **Pierwotny efektor:** np. enzymy, które przenoszą sygnał do cytoplazmy. Pierwotnym efektem w szlaku cAMP jest cyklaza adenylowa aktywowana przez receptory sprzężone z białkiem G. Cyklazy adenylowe mają pochodzenie polifiletyczne. Wyróżnia się 6 klas cyklazy adenylowej. Klasy te tworzą odrębne rodziny genów o nieznanej homologii. U Eukariota występuje najczęściej klasa III.
- **Wtórny przekaźnik:** wewnątrzkomórkowy związek, który uczestniczy w transdukcji sygnału i tym samym generuje różne odpowiedzi komórki. Wtórny przekaźnikiem jest cAMP.
- **Wtórny efektor:** białko, najczęściej enzym, który uczestniczy w procesach biochemicznych. Wtórnymi efektorami dla cAMP są:
  - kinaza białkowa (ang. protein kinases, PKA),
  - czynnik wymiany nukleotydów guaninowych (ang. guaninę-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 MAP. Kinazy PKA regulują transkrypcję poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych.



Rys. 1.2. Szlak sygnałowy cAMP (G-protein coupled receptors: receptory sprzężone z białkiem G, AC: cyklaza adenylowa, PKA: kinaza białkowa, PDE: fosfodiesteraza).

### 1.3. 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 są allozymami? Proszę uzasadnić odpowiedź. (2 punkty)
- B. Czy wymienione izoenzymy dziedziczą się niezależnie czy mogą być sprzężone? Proszę uzasadnić odpowiedź. (2 punkty)
- C. Jeżeli matka ma nieaktywny enzym ADCY3 na skutek wystąpienia mutacji w stanie homozygotycznym, a ojciec ma nienatywny 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? (2 punkty).

*Czas wykonania: 15 minut*

## 2. Choroby związane z zaburzeniem szlaków sygnałowych

### 2.1. 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, wstrzykując jednostkę A do komórki. Toksyna przyczepia się do receptorów sprzężonych z białkiem G ( $G_{M1}$ ) w komórkach nabłonka jelita. Po wnikięciu do komórki jednostka A katalizuje powstanie cAMP, co uruchamia szlak sygnałowy związany z cAMP.

### 2.2. Migrena

Migrena: charakteryzuje się silnym bólem głowy w części przedniej lub z jednej strony. Często powiązana ze światłowstrętem. Jest efektem zmian w aktywności kanałów jonowych. Migrena wrodzona jest związana ze zmianą aktywności kanału  $Ca_v2.1$  P/Q na skutek mutacji lub kanału TRESK (Kanał  $K_2P$ ) 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.

### 2.3. Otyłość

Otyłość rozwija się w wyniku braku równowagi między 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 podwzgórz. Po połączeniu leptyny z receptorami neurony przestają wytwarzać

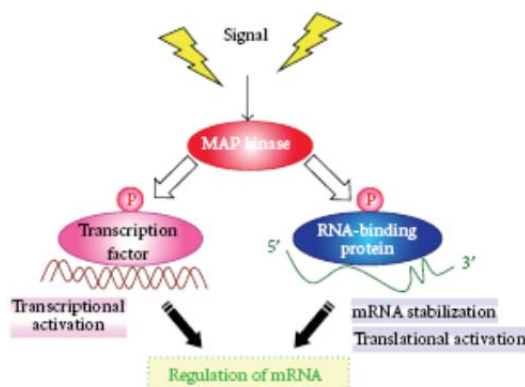
neuropeptydy Y, który jest stymulatorem apetytu. Gen leptyny jest zlokalizowany na chromosomie 7.

- Mutacje w genie POMC (2 p23.3), który koduje pro-opiomelanokortynę, prekursora  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanokortyna), prowadzą do wczesnej otyłości. Ekspresji POMC zachodzi w przednim i środkowym płacie przysadki. MSH to hormon melanotropowy. Poziom hormonu zwiększa się pod wpływem leptyny.

### 3. Analiza ekspresji genów w odpowiedzi na stres

#### 3.1. Białka wiążące mRNA

➔ Odpowiedź komórek na wiele stresów środowiskowych jest związana ze zmianą ekspresji genów. Biorąc pod uwagę złożoność i różnorodność szlaków sygnałowych prowadzących do zmiany ekspresji genów, brak ich koordynacji prowadzi do zaburzeń i stanów chorobowych włącznie z nowotworami. W regulacji ekspresji genów nie tylko jest ważna ich aktywacja, ale także kontrola po-translacyjna obejmująca kontrolę degradacji mRNA. Białka wiążące się z RNA: są to białka, które kontrolują ekspresję licznych genów poprzez przyłączanie się do mRNA genów kodujących 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 wiążącym mRNA prowadzi do degradacji danej cząsteczki mRNA. Stabilność mRNA w komórce jest kontrolowana przez wiele szlaków sygnałowych.



Rys. 3.1.1. 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 powoduje stabilizację mRNA co umożliwia translację.

## Odpowiedzi

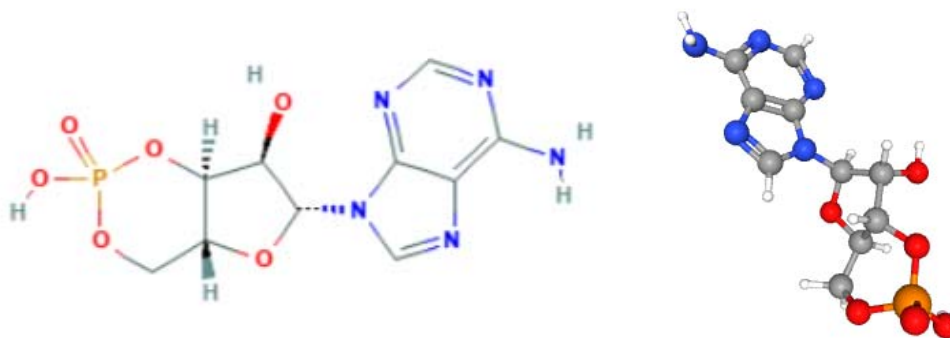
### 1. Analiza szlaku sygnałowego cAMP

#### 1.1. Charakterystyka cAMP

Na podstawie materiałów zawartych w Internecie proszę podać:

**A.** Pełną nazwę oraz budowę chemiczną cAMP. (1 punkt)

- **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. 1.1. Struktura chemiczna (po lewej) i przestrzenna cAMP (po prawej).

**B.** Jak powstaje cAMP w komórce? (1 punkt)

- Powstaje w wyniku cyklizacji czyli przekształcenia związku łańcuchowego w cykliczny.
- Dochodzi do odsczepienia 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).

#### 1.2. Etapy sygnalizacji

### 1.3. Geny kodujące cyklazę adenylową

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

C. Czy wymienione izoenzymy są allozymami? Proszę uzasadnić odpowiedź. (2 punkty)

Wymienione izoenzymy kodowane są przez różne geny i dlatego nie można wśród nich wyróżnić allozymów. 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

Allozomy to formy enzymu kodowane przez różne allele danego genu. Z taką sytuacją nie mamy do czynienia w tym wypadku. Geny dla poszczególnych izoenzymów zlokalizowane są na różnych chromosomach za wyjątkiem genów dla ADCY7 i ADCY9. Te ostatnie zlokalizowane są na jednym chromosomie, ale w różnych miejscach – gen dla ADCY7 na ramieniu krótkim, a gen dla ADCY9 na ramieniu długim.

D. Czy wymienione izoenzymy dziedziczą się niezależnie czy mogą być sprzężone? Proszę uzasadnić odpowiedź. (2 punkty)

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 krótkim i długim) i jest prawdopodobne, że częstość crossing-over pomiędzy tymi loci jest zbliżona do 50%, co oznaczałoby dziedziczenie niezależne.

E. 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? (2 punkty).

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.