



SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW  
KOMÓRKOWYCH  
XXI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN  
Mogilany 2004  
pod redakcją Ireny Nalepy  
129–136



Doc. dr hab. TERESA ZALEWSKA  
Zakład Neurobiologii Naprawczej,  
Instytut Centrum Medycyny  
Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego PAN,  
ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa  
tel. (+48)(22) 608-65-32  
e-mail: terezal@cmdik.pan.pl

## PRZEKAŹNICTWO SYGNAŁU Z MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ

TERESA ZALEWSKA, Małgorzata Ziemka-Nałęcz

Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa

Struktura tkanek organizmów wyższych wynika ze swoistej adhezji grup komórek, ich połączeń z cytoszkieletem wewnętrznym oraz z interakcji z macierzą zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix* – ECM). Macierz zewnątrzkomórkowa jest kompleksem sekrecyjnym, złożonym z oddziaływujących na siebie makromolekuł białkowych zanurzonych w uwodnionym żelu polisacharydowym. Strukturę macierzy formują trzy różne typy białek. Są to białka strukturalne (kolagen, elastyna), białka tworzące kompleksy z polisacharydami (proteoglikany) i glikoproteiny adhezyjne (fibronektyna, laminina, witronektyna, tenascyna). Własności fizyczne polisacharydów (hydrofilność, tendencja do tworzenia żeli) i białek włóknkowych (odporność na rozciąganie) zapewniają stabilność mechaniczną i utrzymanie przestrzennej organizacji tkanki. Molekuły adhezyjne pełnią jeszcze funkcje dodatkowe. Struktura molekularna

tych cząsteczek charakteryzuje się posiadaniem sekwencji RGD (arginina, glicyna, kwas asparaginy), odpowiedzialnej za wiązanie białka z receptorami powierzchni komórki.

Sygnaly z macierzy zewnątrzkomórkowej, przekazywane do wnętrza komórki przy udziale receptorów integrynowych, inicjują tworzenie złożonych kompleksów białkowych. W skład tych kompleksów wchodzi cytoplazmatyczne domeny integryn, białka cytoszkieletowe, białka adaptorowe oraz niereceptorowe białkowe kinazy tyrozynowe. Skoordynowane współdziałanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej i receptorów powierzchni komórki oraz aktywność cytoszkieletu są konieczne dla prawidłowego przebiegu podstawowych komórkowych procesów biologicznych włączając proliferację, różnicowanie i migrację.

Pomimo stałego postępu badań, szczególnie w ostatnim dziesięcioleciu, wiedza o mechanizmach

regulujących przekazywanie sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej jest nadal pełna luk i nieścisłości. Intencją tego opracowania jest przedstawienie aktualnych danych dotyczących tego tematu. Omówione zostaną także kluczowe elementy kompleksów sygnałowych zaangażowanych w przeniesienie sygnału z ECM.

## Integryny – charakterystyka ogólna

Integryny są heterodimerami złożonymi z dwóch podjednostek połączonych wiązaniem niekowalencyjnym – podjednostki  $\alpha$  liczącej około 1000 aminokwasów i nieco krótszej, złożonej z około 750 reszt aminokwasowych, podjednostki  $\beta$ . Do chwili obecnej opisano 16 różnych podjednostek alfa i 8 podjednostek beta. W każdej z podjednostek integrzyn wyróżnić można dużą domenę zewnątrzkomórkową, pojedynczy odcinek transbłonowy i krótką, liczącą około 50 aminokwasów domenę cytoplazmatyczną. Integryny należą do klasy glikoprotein. Oligosacharyd związany jest z resztą N-końcową.

Podjednostki integrzyn łączą się w różnych układach tworząc 22 rozpoznawalne heterodimery  $\alpha/\beta$ . Podjednostki  $\alpha$  na ogół tworzą dimer tylko z 1 specyficzną podjednostką  $\beta$ . Jedynie nieliczne ( $\alpha_4$  i  $\alpha_6$ ) wiążą się z dwoma podjednostkami  $\beta$ . Wyjątek stanowi podjednostka  $\alpha_5$  tworząca połączenia z 5 różnymi podjednostkami  $\beta$ . Integryny zostały podzielone na 3 główne klasy:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\alpha_v$ . Chociaż większość z nich obecna jest w wielu typach komórek, znane są także integryny komórkowo specyficzne. Przykładem może być limfocytarna integryna  $\alpha_L\beta_2$ , czy  $\alpha_v\beta_3$  – marker młodych naczyń krwionośnych.

Receptory integrynowe rozpoznają przede wszystkim białka macierzy zewnątrzkomórkowej, chociaż niektóre z nich mogą wiązać także ligandy rozpuszczalne (fibrynogen) lub receptory zlokalizowane na komórkach sąsiednich (tzw. counter-receptory). Zgodnie z panującą opinią, za specyficzność wiązania odpowiadać ma podjednostka  $\alpha$ .

Podejmowane próby klasyfikacji integrzyn na podstawie specyficzności wiązania liganda wykazały znaczną zmienność badanych układów. Podczas gdy niektóre integryny wiążą tylko jeden ligand, tak jak klasyczny receptor fibronektyny ( $\alpha_5\beta_1$ ), inne typy integrzyn współdziałają z kilkoma peptydami. Ponadto niektóre białka macierzy wiążą się z wieloma integrzynami. Taki system, aczkolwiek wydaje się paradoksalny, ma z pewnością znaczenie funkcjonalne. Integryny w odróżnieniu od receptorów powierzchniowych dla hormonów czy innych molekuł sygnałowych charakteryzują się niskim powinowactwem wiązania ligandów, natomiast jest ich 10–100 razy więcej. Taka aranżacja umożliwia

równoczesne wiązanie dużej liczby molekuł białkowych ECM, umożliwiając utrzymanie szerokiego kontaktu ze środowiskiem. Natomiast charakter wiązania, jego niskie powinowactwo, ułatwia migrację komórek.

Warunkiem interakcji białko ECM-receptor integrynowy jest uprzednie związanie z podjednostką  $\alpha$  czterech dwuwartościowych kationów  $\text{Ca}^{2+}$  lub  $\text{Mg}^{2+}$ .

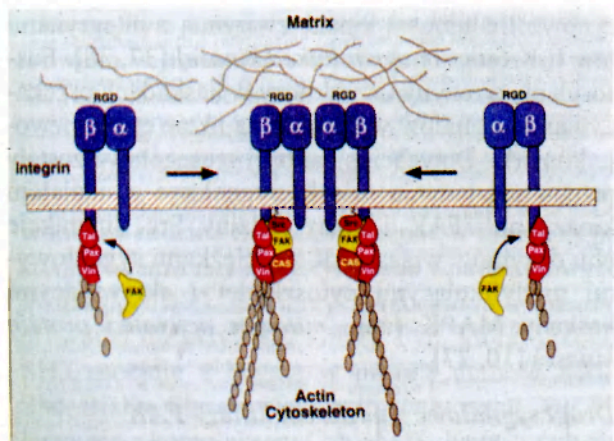
## Domeny cytoplazmatyczne integrzyn i cytoszkielet

Historycznie integryny uważane były wyłącznie za molekuły wiążące filamenty aktyny z macierzą zewnątrzkomórkową [5]. Wiązanie takie umożliwia przeniesienie do ECM napięcia generowanego w komórce przez interakcję aktyna/miozyna. Istnieje pełna zgodność, że przyłączenie liganda do receptora integrynowego jest sygnałem inicjującym asocjacje domen cytoplazmatycznych tego receptora z białkami cytoszkieletowymi (filamina, talina, alfa-aktynina, paksylina). W ten sposób po obu stronach błony tworzą się agregaty złożone z białka macierzy, integryny i białka cytoszkieletowego. Powstawanie takich agregatów obserwowano w kulturach komórek nabłonka i fibroblastów. Noszą one nazwę miejsc kontaktu lub przylegania (adhezji). Tworzenie złożonych kompleksów integrzyn z białkami cytoszkieletowymi może być molekularnym wykładnikiem mechanizmu regulacji kształtu komórki i jej architektury wewnętrznej.

W ośrodkowym układzie nerwowym nie stwierdzono obecności struktur przypominających „klasyczne” miejsca adhezyjne. Miejscem kontaktu pomiędzy komórkami neuronalnymi a substancją zewnątrzkomórkową są błony postsynaptyczne. Na błonach tych zlokalizowane są dynamiczne kompleksy białek sygnałowych, adaptorowych i cytoszkieletowych, uczestniczących w przekazywaniu sygnałów z macierzy [13].

Funkcja receptorów integrynowych jako przekazników sygnału z ECM została odkryta kilka lat później. Okazało się, że wiązaniu białek macierzy do integrzyn towarzyszy fosforylacja niereceptorowej białkowej kinazy tyrozynowej pp<sup>125</sup>FAK (ang. *focal adhesion kinase*) oraz asocjacja tej kinazy z białkami cytoszkieletowymi [12, 14] (Ryc. 1).

Nie został natomiast w sposób jednoznaczny wyjaśniony mechanizm odpowiedzialny za przeniesienie informacji z ECM do komórki. Krótkie domeny cytoplazmatyczne podjednostek integrzyn są pozbawione aktywności enzymatycznych – cech charakterystycznych dla receptora generującego sygnał wewnątrzkomórkowy i nie posiadają sek-



Ryc. 1. Wiązanie białek macierzy inicjuje połączenie podjednostek integrzyn oraz ich asocjacje z cytoszkieletem komórki. Kompleksy te stymulują dalszą dimeryzację integrzyn i organizację macierzy (pozytywne sprzężenie zwrotne). RGD, Arg-Gly-Asp – motyw wiążący integrzynę. Tal, talina; Pax, paksylina; Vin, winkulina; Cas, p130<sup>CAS</sup>. Wg. [10]

wencji umożliwiających interakcję z białkami G. Dopiero ostatnie lata przyniosły częściowe wyjaśnienie tego problemu. Zastosowanie jądrowego rezonansu magnetycznego oraz techniki rezonansowego przeniesienia sygnału emisji fluorescencji (ang. *fluorescence resonance energy transfer* – FRET) potwierdziło wcześniejszą hipotezę, że aktywacja integrzyn w żywych komórkach jest związana ze zmianami konformacyjnymi zarówno zewnątrzkomórkowej [33] jak i wewnątrzkomórkowej domeny integrzyn [16].

## Białkowa kinaza tyrozynowa – FAK

Kinazę pp<sup>125</sup>FAK opisano po raz pierwszy w roku 1992 jako niereceptorową białkową kinazę tyrozynową, aktywowaną wiązaniem białek macierzy zewnątrzkomórkowej z integrzynami. Zaakceptowano również jej kluczową rolę w przekazywaniu sygnału integrynowego. [12, 24].

Kinazę pp<sup>125</sup>FAK zidentyfikowano u ludzi, myszy, kurcząt i żaby (*Xenopus*). Enzymy znalezione u tych gatunków prezentowały około 90% homologii sekwencyjnej. Kinaza pp<sup>125</sup>FAK jest produktem pojedynczego genu, natomiast izoforma zlokalizowana w ośrodkowym układzie nerwowym, oznaczana symbolem FAK+, jest wynikiem alternatywnego złożenia RNA. Izofoma kinazy posiada 3 dodatkowe reszty aminokwasowe (Pro-Trp-Arg) w pobliżu reszty tyrozyny w pozycji 397. Funkcja tych aminokwasów nie jest jasno określona. Być może ta forma kinazy jest w inny sposób aktywowana przez specyficzne bodźce komórkowe aniżeli forma natywna a wstawienie dodatkowych amino-

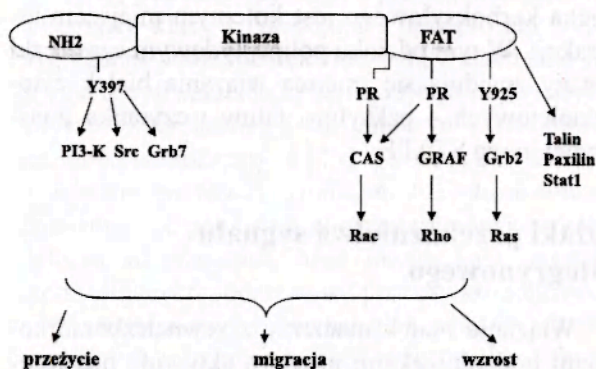
kwasów może przyczynić się do wzrostu aktywności kinazowej.

Kinaza pp125FAK, podobnie jak inne kinazy niereceptorowe, nie posiada domeny zewnątrzkomórkowej. W molekularnej strukturze enzymu można wyróżnić położoną centralnie domenę katalityczną, obudowaną dużymi, liczącymi około 400 aminokwasów, domenami bocznymi – N- i C-końcową. W wyniku interakcji domeny N-końcowej z domeną katalityczną lub C-końcową enzym jest utrzymywany w stanie nieaktywnym. Przyjęcie aktywnej konformacji zależy od związania końca aminowego z  $\beta$  integrzyną. Dotychczas brakuje dowodów wskazujących na bezpośrednią interakcję tych molekuł *in vivo* [25]. Być może pośrednikami tej interakcji są białka cytoszkieletowe (talina, paksylina) [35].

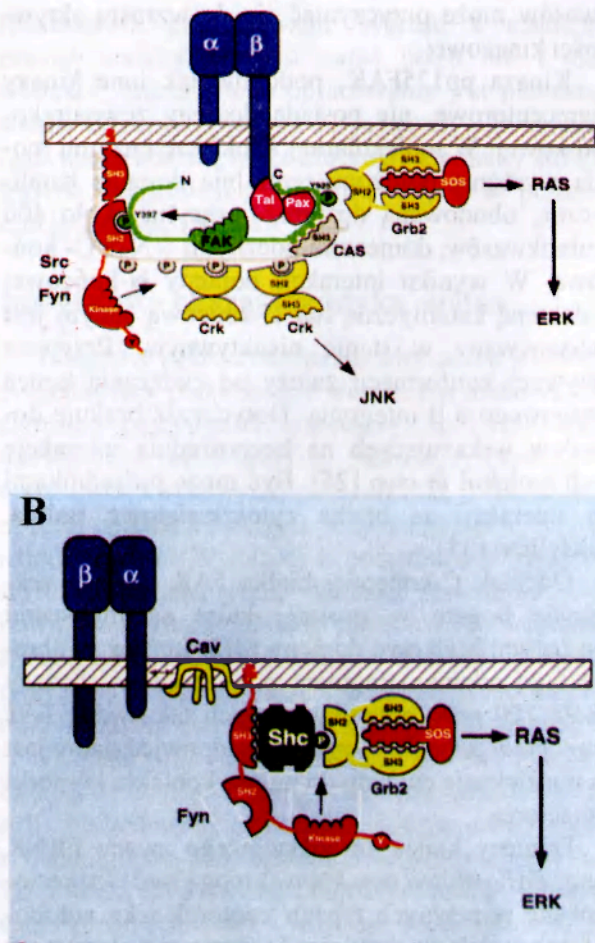
Odcinek C-końcowy białka FAK posiada sekwencje bogate w prolinę, które są miejscami wiążącymi białkowe domeny SH3. Leżący w obrębie tego odcinka fragment polipeptydowy liczący około 100 reszt aminokwasowych tak zwany FAT (ang. *focal adhesion targeting*), odpowiedzialny jest za translokację enzymu do miejsc kontaktu komórki z macierzą.

Domeny końca karboksylowego zwane FRNK (ang. *FAK related non kinase*) mogą być ekspresjonowane w pewnych typach komórek jako autonomiczne molekuly, regulujące negatywnie aktywność kinazową [34].

Unikalna budowa molekularna kinazy pp125FAK umożliwia interakcję z licznymi molekułami białkowymi – adaptorowymi, strukturalnymi i enzymatycznymi. Białka te mogą aktywować liczne szlaki przekazywania sygnałów wpływając na wzrost, migrację czy różnicowanie komórek (Ryc. 2) [30]. Fosforylacja reszty tyrozyny w pozycji 397 (P-Tyr397) wiąże białka posiadające domeny SH2 (ang. *Src homology domain 2*). Są to przede wszystkim kinazy należące do rodziny Src, podjednostka p85 kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K), fosfolipaza  $C\gamma$  (PLC  $\gamma$ )



Ryc. 2. Asocjacje kinazy pp<sup>125</sup>FAK z białkami strukturalnymi, adaptorowym i sygnałowymi



Ryc. 3. Ścieżki transdukcji sygnałów z macierzy zewnątrzkomórkowej. A) z włączeniem kinazy pp<sup>125</sup>FAK; B) z włączeniem kinazy Fyn i białka Shc. N – koniec aminowy; C – koniec karboksylowy; Y397, Tyr<sup>397</sup>; Y, tyrozyna; Cav, kaweoлина

i białko adaptorowe Grb-7 (ang. *growth factor receptor bound protein-7*). Natomiast P-Tyr w pozycji 925 rozpoznaje białko Grb2. Bogate w prolinę sekwencje łańcucha karboksylowego, asocjują z domenami SH3 (ang. *Src homology domain 3*) białka p130 Cas i białka aktywującego GTPazę – GRAF. Sekwencja aminokwasowa umieszczona w pobliżu końca łańcucha karboksylowego jest kolejnym miejscem interakcji. W tym odcinku polipeptydowym cząsteczki kinazy znajdują się miejsca wiązania białek cytoszkieletowych – paksyliny, taliny i czynnika transkrypcyjnego STAT1.

### Szlaki przekazywania sygnału integrynowego

Wiązanie białek macierzy z zewnątrzkomórkowymi podjednostkami integrzyn aktywuje niereceptorowe tyrozynowe kinazy białkowe m.in. kinazę pp<sup>125</sup>FAK, kinazy należące do rodziny Src oraz se-

rynowo-treoninową kinazę związaną z integrzynami tzw ILK (ang. *integrin linked kinase*) [37, 38]. Fosforylacja tyrozyny uczestniczy w kaskadach przekazywania sygnałów wpływając na różne etapy rozwoju komórki. Dotychczas bardziej szczegółowo zostały przebadane jedynie ścieżki sygnałowe z udziałem kinazy pp<sup>125</sup>FAK i kinaz rodziny Src. Interakcje obu enzymów wiążą FAK ze ścieżkami sygnałowymi modyfikującymi cytoszkielet i aktywującymi kaskady MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*) [10, 27].

### Drogi sygnałowe z udziałem kinazy FAK

Model przekazywania sygnałów integrzyn z udziałem kinazy FAK opracowany na podstawie badań *in vitro* przedstawia ryc. 3A. Zgodnie z przedstawioną sekwencją zdarzeń, wiązanie ligandów macierzy z receptorami integrzynowymi prowadzi do autofosforylacji tyrozyny 397 (Tyr 397) cząsteczki białka FAK. Zgodnie z aktualnymi poglądami jest to etap kluczowy, determinujący aktywację dalszych szlaków przekazywania. Ufosforylowana tyrozyna jest rozpoznawana przez domenę SH2 kinaz z rodziny Src (Src lub Fyn). Najnowsze dane eksperymentalne z zastosowaniem inhibitora kinazy Src wskazują, że asocjacja obu kinaz jest warunkiem ich aktywacji [26]. Następnie ufosforylowane zostają reszty tyrozynowe w pozycji 576/577 cząsteczki FAK. Jest to warunek konieczny, aby enzym osiągnął aktywność maksymalną.

Aktywne kinazy mogą fosforylować białka cytoszkieletowe i białko adaptorowe p130Cas. Ufosforylowane białko p130cas, oryginalnie zidentyfikowane jako substrat fosforylacji przez onkoproteinę v-Crk, wiąże kolejne białka – kinazę Crk i białko adaptorowe Nck. Zgodnie z uzyskanymi danymi eksperymentalnymi białko Nck stymuluje kaskadę kinaz prowadząc do aktywacji JNK (ang. *Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase*). Natomiast fosforylacja następnej reszty tyrozyny 925 przez Src staje się miejscem wiązania kompleksu złożonego z białka adaptorowego Grb2 i czynnika wymieniającego GDP na GTP (ang. *GTP-exchange factor*) – SOS. Ten szlak transdukcji sygnałów prowadzi do aktywacji kaskady kinaz MAP (26). Należy podkreślić, że fosforylacja reszt tyrozynowych kinazy pp<sup>125</sup>FAK jest możliwa jedynie przy zachowaniu integralnego cytoszkieletu aktywny [18].

### Drogi sygnałowe z udziałem kinazy Fyn

Niektóre integryny należące do klasy  $\beta_1$  i  $\alpha_v$  aktywują także tyrozynową kinazę Fyn i białko adaptorowe Shc [10] (Ryc. 3B). W tym przypadku rolę błonowego białka adaptorowego ma pełnić kaweoлина -1, która wiąże podjednostkę integryny

z kinazą Fyn. Asocjację integrzyn z kaweoliną obserwowano w hodowlach komórek pierwotnych [38]. Ta funkcja kaweoliny-1 pozostaje w zgodzie z jej zdolnością wiązania cholesterolu i glikosfingolipidów oraz z organizowaniem wyspecjalizowanych miejsc na błonie plazmatycznej wzbogaconych w kinazy rodziny Src zakotwiczone w błonie za pośrednictwem reszt mirystylowych i palmitylowych. Wiązanie białek macierzy z receptorami integrzyn prowadzi do aktywacji kinazy Fyn, której domena SH3 asocjuje z bogatą w prolinę domeną białka Shc. Białko Shc po ufosforylowaniu reszty Tyr 317 łączy się z kompleksem Grb2-SOS. Końcowym etapem jest aktywacja kaskady kinaz MAP.

Jest zatem prawdopodobne, że zarówno kinaza pp <sup>125</sup>FAK jak i białko Shc mają udział w aktywacji kaskady kinaz MAP. Postuluje się, że wybór danej ścieżki sygnałowej zależy od typu komórki oraz od stopnia adhezji. Zbyt ubogie dane eksperymentalne uniemożliwiają jednak wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

Uzyskane wyniki doświadczalne sugerują, że w niektórych typach komórek ścieżka przekaźnictwa sygnałów z udziałem białka Shc jest odpowiedzialna za początkowy, znaczący wzrost aktywacji ERK (ang. *extracellular signal regulated kinase*) indukowanej adhezją komórek do macierzy. Natomiast FAK, aktywowany znacznie wolniej, miałby odpowiadać za przedłużenie aktywacji kinazy ERK [27]. Za hipotezą tą przemawia fakt, że integryny, które nie aktywują białka Shc są słabymi aktywatorami ERK i proliferacji [37, 21]. Zdolność integrzyn do aktywacji kinazy ERK może mieć szczególne znaczenie w warunkach ograniczonego dostępu czynników wzrostu.

Prawidłowy kontakt komórek z macierzą zewnątrzkomórkową jest warunkiem przeżycia wielu typów komórek [22]. Efektem funkcjonalnym aktywacji kaskady kinaz MAP może być ukierunkowanie losu komórek w stronę ich śmierci lub przeżycia. Wyniki badań wskazują, że aktywacja kinazy ERK związana jest z przeżyciem komórki. Natomiast zmiana interakcji komórka/ECM oraz aktywacja alternatywnej drogi sygnałowej JNK z nadmiernym ufosforylowaniem cJun i zmianą funkcji transkrypcyjnej AP1 może stać się w pewnych warunkach sygnałem apoptotycznym. Innym efektywnym szlakiem neuroprotektynowym aktywowanym przez pp <sup>125</sup>FAK jest szlak inicjowany przez PI3K i aktywujący kinazę Akt. Zależne od adhezji i fosforylacji tyrozyny 397 kinazy FAK formowanie kompleksu z podjednostką katalityczną p85 PI3K obserwowano w niektórych typach komórek.

Drogi sygnałowe aktywowane przez asocjację kinazy pp125FAK z licznymi białkami (Ryc. 2) nie zostały jeszcze precyzyjnie zbadane. Postuluje się ich udział w regulacji procesu migracji i progresji cyklu komórkowego. Badania *in vitro* dostarczyły wprawdzie dowodów wskazujących na włączenie aktywnej kinazy FAK w proces migracji fibroblastów i komórek CHO (ang. *chinese hamster ovary*), natomiast udział poszczególnych efektorów kinazy zależał od warunków eksperymentalnych. Sugeruje się zarówno rolę ścieżki sygnałowej włączającej PI-3K, jak i kompleksu FAK/p130Cas/Crk oraz białka Grb7 [30].

Udział transdukcji sygnału integrzynowego w ekspresji genów wiązany jest z aktywacją kinazy ERK. Interakcja białka ECM z receptorem integrzynowym zwiększa ekspresję niektórych zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych (kolagenazy, stromielizyny 1 i żelatynazy MMP9). Nie wiadomo jednak, czy ekspresja tych genów jest związana z aktywacją kaskady MAPK przez kinazę FAK.

### Współdziałanie integryny – receptory czynników wzrostu

Aktywacja integrzyn może modulować odpowiedzi receptorów czynników wzrostu. Istnieją dane eksperymentalne, że receptory dla insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. *insulin-like growth factor* – IGF), czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (ang. *platelet derived growth factor* – PDGF), naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor* – EGF) i czynnika wzrostu komórek nabłonka naczyń (ang. *vascular endothelial cell growth factor* – VEGF) są optymalnie aktywowane przez specyficzne dla nich ligandy jedynie w warunkach zachowania kontaktu komórek z podłożem [36, 28]. Pewne integryny wydają się być preferencyjnie asocjowane z określonymi czynnikami wzrostu. I tak integryna  $\alpha_v\beta_3$  może immunoprecypitować w kompleksach z receptorami: IGF, PDGF i VEGF, podczas gdy  $\alpha_5\beta_1$  i prawdopodobnie inne integryny klasy  $\beta_1$  asocjują z receptorem VEGF. Agregacja podjednostek integrzyn, a następnie asocjacja z cytoszkieletem stymuluje prawdopodobnie powstawanie kompleksów integrzyn z receptorami czynników troficzych [19]. Skoordynowana aktywacja receptorów czynników wzrostu i integrzyn niewątpliwie pełni rolę w przemodelowaniu kompleksów adhezyjnych oraz inicjowaniu sygnałów kontrolujących podstawowe procesy komórkowe.

Transbłonowe i zewnątrzkomórkowe domeny niektórych integrzyn mają również zdolność do asocjowania z innymi białkami transbłonowymi, które mogą pełnić funkcję białek adaptorowych zaangażowanych

zowanych w transdukcję sygnałów. Zidentyfikowany został kompleks integryny  $\beta_3$  z białkiem transbłonowym należącym do rodziny immunoglobulin tzw. IAP (ang. *integrin associated protein*). Kompleks ten aktywuje inhibitorowe białko wiążące GTP (Gi) (ang. *inhibitory trimeric guanine nucleotide-binding*) [31]. Integryny  $\alpha_3\beta_1$  i  $\alpha_6\beta_1$  asocjują z białkami transbłonowymi i prawdopodobnie ułatwiają wiązanie integryn z drogami sygnałowymi fosfotydyloinozytolu [3]. Istnieje także połączenie pomiędzy integrynami i kanałami jonowymi, jednak znaczenie fizjologiczne tych połączeń nadal nie jest wyjaśnione [29]. Wiadomo jedynie, że aktywacja integryn indukuje wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego. Jest to odpowiedź specyficzna dla integryny, liganda i typu komórki. Natomiast nie wyjaśnionym pozostaje czy jest to mobilizacja wapnia z siateczki endoplazmatycznej czy transport przez kanały jonowe.

### Regulacja szlaków przekazywania sygnałów integrynowego

Jednym z podstawowych mechanizmów regulacji szlaków przekazywania sygnałów integrynowego wydaje się być defosforylacja przy udziale specyficznych fosfataz tyrozynowych. Aktualna wiedza odnośnie tego tematu ma jedynie charakter fragmentaryczny. Wiadomo, że niektóre fosfatazy, takie jak tyrozynowa fosfataza białkowa typu receptorowego – fosfataza  $\alpha$  czy fosfataza cytosolowa SHP-2, defosforylują negatywne miejsca regulatorowe kinaz rodziny Src, umożliwiając przyjęcie przez tę kinazę konformacji aktywnej [20]. Do negatywnych regulatorów szlaków sygnalizacji integrynowej zalicza się dwie cytoplazmatyczne fosfatazy tyrozynowe: PTP-1B i PTP-PEST, związane z defosforylacją białka adaptorowego p130Cas, oraz fosfataza PTEN. Ten ostatni enzym wykazuje powinowactwo zarówno do lipidów inozytolowych jak i substratów białkowych [11].

Kolejnym, znacznie lepiej poznanym mechanizmem regulacji przekazywania sygnałów z receptorów integrynowych jest proteoliza. Istnieje pełna zgodność, że najbardziej znaczące wydarzenia proteolityczne mają miejsce w przedziale zewnątrzkomórkowym. Przemodelowanie struktur macierzy zewnątrzkomórkowej jest nieodzownym warunkiem rozwoju układu nerwowego, a więc procesów proliferacji, różnicowania i migracji.

Do najlepiej poznanych zewnątrzkomórkowych układów proteolitycznych należą metaloproteinazy (MMPs), proteinyzacji rodziny ADAM oraz proteazy serynowe. Proteinyzacji należące do rodziny ADAM charakteryzują się posiadaniem zarówno domeny dezintegryny jak i metaloproteinazy, łącząc cechy

powierzchniowych molekuł adhezyjnych i proteinaz. Budowa molekularna sugeruje znaczącą rolę tych enzymów w degradacji komponent ECM. Dotychczasowe badania wykazały podobieństwo pewnych typów tych proteinaz do sekretazy  $\alpha$  [2], natomiast brak jest wyczerpujących informacji na temat degradacji przez te enzymy białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Dowód eksperymentalny udziału proteinyzacji ADAM 13 w degradacji fibronektyny uzyskano w badaniach prowadzonych na gatunku żaby *Xenopus* [1].

Z grupy proteaz serynowych wyróżnić należy aktywatory plazminogenu – urokinazowy i tkankowy. Proteolizują one plazminogen do aktywnej plazminy. Właśnie plazminę, w przeciwieństwie do aktywatorów plazminogenu, charakteryzuje specyficzność w stosunku do licznych substratów – fibryny, oraz białek ECM – fibronektyny i lamininy. Związany z receptorem aktywator plazminogenu znaleziono w stożkach wzrostu nerwów oraz w migrujących białych ciałkach krwi.

Ogólnie akceptuje się pogląd, że kluczową rolę w przemodelowaniu ECM pełnią związane z błoną oraz rozpuszczalne metaloproteinazy. Biochemiczne własności oraz mechanizmy regulacji aktywności tych enzymów zostały szeroko omówione w publikowanych pracach przeglądowych [32, 41].

Ekspresję licznych MMPs obserwuje się w czasie rozwoju układu nerwowego. Ekspresja poszczególnych MMPs może być związana ze specyfiką budowy ECM w różnych etapach dojrzewania. Badania *in vitro* wykazały, że migracja komórek progenitorowych oligodendrocytów wymaga aktywacji MMP-2 [39]. Podwyższony poziom MMP-2 stwierdzono także w kulturach neuronalnych komórek macierzystych oraz w komórkach progenitorowych różnicujących się w astroglię i neurony [9, 39]. Natomiast w migrację transplutowanych do mózgu komórek zarodka królika zaangażowana jest MMP-1 [8]. Sugerowany jest także udział MMPs (MMP-2, -3, -9) we wzroście neurytów w czasie rozwoju ontogenetycznego [39].

Aktywność układów proteolitycznych w warunkach fizjologicznych podlega ścisłej, wielopoziomowej regulacji – zarówno na etapie syntezy enzymów, aktywacji proenzymów jak i aktywności specyficznych inhibitorów. Zaburzenie tych mechanizmów prowadzące do nadmiernej aktywacji czy inhibicji procesu proteolizy towarzyszy licznym stanom patologicznym. Wzrost aktywności metaloproteinaz prowadzi do osłabienia lub nawet utraty prawidłowego kontaktu między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową, a dalej do apoptozy, określanej w tym przypadku terminem „anoikis” [22]. Generowane w wyniku proteolizy fragmenty macierzy zewnątrzkomórkowej mogą wiązać się z innymi receptorami in-

tegrynowymi i aktywować inne ścieżki sygnałowe. Np. natywny kolagen wiąże się z integryną  $\alpha_1\beta_2$ , podczas gdy jego fragment wykazuje powinowactwo do integryny  $\alpha_5\beta_3$ . Znaczącą aktywację metaloproteinaz obserwowano w patologii niedokrwiennej mózgu i rdzenia, arteriosklerozie, artretyzmie i w przewlekłych chorobach zwyrodnieniowych – stwardnieniu rozsianym (SM) i w chorobie Alzheimer’a, a przede wszystkim w chorobach nowotworowych [7, 23, 40]. Według aktualnych hipotez, popartych wynikami badań biochemicznych, proteolityczna przebudowa ECM umożliwia migrację komórek nowotworowych. Ponadto podwyższona aktywność MMPs stymuluje proces angiogenezy w okolicy guza. Podwyższony poziom MMPs (MT-MMP1, MMP2 i MMP9), przy znacząco niskiej ekspresji inhibitorów tkankowych, obserwowano w wielu typach nowotworów, szczególnie w nowotworach neuroektodermalnych – w glejaku i rdzeniaku, charakteryzujących się wysoką inwazyjnością. Niestety, podejmowane próby ingerowanej regulacji aktywności proteolitycznej przez podanie inhibitorów metaloproteinaz w licznych modelach schorzeń neurologicznych nie dawały zadowalających wyników [17]. Również wprowadzone do kliniki leki hamujące aktywność MMPs, skuteczne w terapii pewnych typów guzów, zostały wycofane ze względu na wysoki stopień toksyczności.

Obok opisywanych zewnątrzkomórkowych procesów proteolitycznych, w mechanizm regulacji transdukcji sygnałów z ECM może być włączona także proteoliza wewnątrzkomórkowa. Ograniczona proteoliza jednego tylko wiązania peptydowego może skutkować usunięciem istotnego funkcjonalnie peptydu lub zmianą konformacji białka, a więc aktywności bądź funkcji fizjologicznej. Kluczową rolę wydają się pełnić dwie klasy proteaz cysteinowych – kaspazy i wapniowo-zależne proteiny – kalpains. Doświadczalnym poparciem roli kalpains jest proteoliza białka cytoszkieletowego – taliny – inicjowana wiązaniem integryn do ligandów [15]. Ograniczona proteoliza białek cytoszkieletu może zmieniać jego organizację, geometrię błony komórkowej, a więc kształt komórki i rozmieszczenie organeli, co może prowadzić do zaburzenia wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów, utraty integralności i śmierci komórki. Jedną z intrygujących własności kalpains jest zdolność do proteolitycznego cięcia niektórych białek enzymatycznych między domeną regulatorową i katalityczną. Taki wzór degradacji proteolitycznej demonstruje kinaza pp125 FAK w warunkach stymulacji wapniowo-zależnej proteolizy w obecności lub przy braku inhibitorów. Odcięcie katalitycznej domeny enzymu od sekwencji FAT

uniemożliwia przemieszczenie enzymu do kompleksów adhezyjnych i fosforylację białek specyficznych. Skutkiem zaburzenia sygnalizacji wewnątrzkomórkowej może być patologiczne pofałdowanie błon komórkowych, rozpad kompleksów adhezyjnych i połączeń komórka-macierz. Dane literatury sugerują, że proteoliza tej kinazy wpisana jest w program prowadzący do śmierci komórki [6]. Jakkolwiek wiedza nasza na temat regulacji sygnału integrynowego przez kalpains ma charakter fragmentaryczny, można przypuszczać że w podobny sposób mogą być modulowane inne kluczowe kinazy i fosfatazy. Niektórzy autorzy podkreślają rolę kaspaz w proteolizie kinazy FAK jak i białka adaptorowego p130Cas. Ze względu na wzajemne interakcje obu klas enzymów, skutkujące aktywacją niektórych kaspaz przez kalpains czy proteolizą endogennego inhibitora kalpains przez kaspazy, trudno określić jednoznacznie, który z enzymów pełni kluczową rolę [4].

Liczne dane doświadczalne wskazują, że substratami kalpains są błonowe receptory czynników wzrostu – EGF i PDGF. Nie są znane funkcjonalne konsekwencje działania kalpains na te substraty, ale mogą one zmienić stopień interakcji szlaków sygnałowych aktywowanych przez integryny i czynniki troficzne.

## Piśmiennictwo

1. Alfandari D., Cousin H., Gaultier A., Smith K., White J.M., DeSimone D.W.: Xenopus ADAM 13 is metalloprotease required for cranial neural crest cell migration. *Curr. Biol.*, 2001, 11, 918–930.
2. Allinson T.M.J., Parkin E.T., Turner A.J., Hooper N.M.: ADAMs family members as amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretases. *J. Neurosci. Res.*, 2003, 74, 342–352.
3. Berditchevski F., Tolias KF, Wong K, Carpenter CL, Hemler ME. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 2595–2598.
4. Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J.-O., Leverk A.-N., Bahr B.A., Mallard C., Hagberg H.: Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia. A mechanism of „pathological apoptosis”? *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 10191–10198.
5. Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C.: Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1988, 4, 487–525.
6. Cooray P., Yuan Y., Schoenwaelder S.M., Mitchell C.A., Salem H.H., Jackson S.P.: Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain. *Biochem. J.*, 1996, 318, 41–47.
7. Cuzner M.L., Opdenakker G.: Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J. Neuroimmunol.*, 1999, 1, 1–14.

8. Del Bigio M.R., Tchelingierian J.L., Jacque C.M.: Expression of extracellular matrix degrading enzymes during migration of xenografted brain cells. *Neuropathol. Appl. Neurol.*, 1999, 25, 54–62.
9. Frolichsthal-Schoeller P., Vescovi A.L., Krekoski C.A., Murphy G., Edwards D.R., Forsyth P.: Expression and modulation of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human embryonic CNS stem cells. *NeuroReport*, 1999, 10, 345–351.
10. Giancotti F.G., Ruoslahti E.: Integrin signaling. *Science*, 1999, 285, 1028–1032.
11. Gu J., Tamura M., Yamada K.M.: Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J. Cell Biol.*, 1998, 143, 1375–1383.
12. Hanks S.K., Calalb M.B., Harper M.C., Patel S.K.: Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 8487–8491.
13. Husi H., Grant S.G.: Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J. Neurochem.*, 2001, 77, 281–291.
14. Hynes R.O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, 69, 11–25.
15. Inomata M., Hayashi M., Ohno-Iwashita Y., Tsubuki S., Saido T.C., Kawashima S.: Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996, 328, 129–134.
16. Kim M., Carman C.V., Springer T.A.: Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*, 2003, 301, 1720–1725.
17. Leung D., Abbenante G., Fairlie D.P.: protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 305–340.
18. Lipfert L., Haimovich B., Schaller M.D., Cobb B.S., Parsons J.T., Brugge J.S.: Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein kinase pp125FAK in platelets. *J. Cell. Biol.*, 1992, 119, 905–912.
19. Miyamoto S., Teramoto H., Gutkind J.S., Yamada K.M.: *J. Cell Biol.*, 1996, 135, 1633–
20. Oh L.Y., Larsen P.H., Krekoski C.A., Edwards D.R., Donovan F., Werb Z., Yong V.W.: Matrix metalloproteinase 9/gelatinase B is regulated for process outgrowth by oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 1999, 19, 8463–8475.
21. Pozzi A., Wary K.K., Giancotti F.G., Gardner H.A.: Integrin alpha1beta1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway *in vivo*. *J. Cell Biol.*, 1998, 142, 587–594.
22. Raff M.C.: Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992, 356, 397–400.
23. Rooprai H.K., McCormick D.: Proteases and their inhibitors in human brain tumors: a review. *Anticancer Res.*, 1997, 17, 4151–4162.
24. Schaller M.D., Borgman C.A., Cobb B.S., Vines R.R., Reynolds A.B., Parsons J.T.: pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89, 5192–5196.
25. Schaller M.D., Otey C.A., Hildebrand J.D., Parsons J.T.: Focal adhesion kinase and paxilin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.*, 1995, 130, 1181–1187.
26. Schlaepfer D., Hanks S., Hunter T., van der Geer P.: Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by Grb2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 1994, 372, 786–791.
27. Schlaepfer D., Hunter T.: Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.*, 1998, 8, 151–157.
28. Schneller M., Vuori K., Ruoslahti E.: Alphav beta3 integrin associates with activated insulin and PDGF beta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.*, 1997, 16, 5600–5607.
29. Schwartz M.A.: Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium. *J. Cell Biol.*, 1993, 120, 1003–1010.
30. Schwartz M.A.: Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.*, 2001, 11, 466–470.
31. Shimizu Y., Rose D.M., Ginsberg M.H.: Integrins in the immune system. *Adv. Immunol.*, 1999, 72, 325–380.
32. Sternlicht M.D., Werb Z.: How matrix metalloproteinases regulate behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001, 17, 463–516.
33. Takagi J., Petre B.M., Walz T., Springer T.A.: Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 2002, 110, 599–611.
34. Taylor J.M., Mack C.P., Nolan K., Regan C.P., Owens G.K., Parsons J.T.: Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell Biol.*, 2001, 21, 1565–1572.
35. Turner C.E.: Paxilin interactions. *J. Cell Sci.*, 2000, 113, 4139–4140.
36. Vuori K., Ruoslahti E.: Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science*, 1994, 266, 1576–1588.
37. Wary K.K., Mainiero S., Isakoff S.J., Marcantonio E.E., Giancotti F.G.: The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell*, 1996, 87, 733–743.
38. Wary K.K., Mariotti A., Zurzolo C., Giancotti F.G.: A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*, 1998, 94, 625–634.
39. Yong V.W., Power C., Forsyth P.A., Edwards D.R.: Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001, 2, 502–511.
40. Zalewska T, Ziemka-Nałęcz M, Samowska A, Domańska-Janik K. Transient forebrain ischemia modulates signal transduction from extracellular matrix in gerbil hippocampus. *Brain Res.*, 2003, 977, 62–69.
41. Ziemka-Nałęcz M.: Metaloproteazy w fizjologii i patologii ośrodkowego układu nerwowego. *Postepy Biol. Komórki*, 2003, 30, 721–734.