

©Borgis

*Mariusz Marciszek, Emilia Wojtera

Receptory β -adrenergiczne w sercu (na marginesie Nagrody Nobla z chemii w 2012 roku)

Cardiac β -adrenoreceptors (reference to the Nobel Prize in chemistry in 2012 year)

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Andrzej Beręsewicz

Słowa kluczowe

receptory sprzężone z białkiem G, receptory β -adrenergiczne, niewydolność serca

Key words

G-protein coupled receptors, β -adrenergic receptors, heart failure

Adres/address:

*Mariusz Marciszek
Zakład Fizjologii Klinicznej CMKP
ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa
tel. +48 (22) 569-38-40
fax +48 (22) 569-37-12
marciszem@cmkp.edu.pl

Streszczenie

W 2012 roku Kobilka i Lefkowitz otrzymali Nagrodę Nobla za całokształt prac nad receptorami sprzężonymi z białkiem G (GPCR). GPCR stanowią dużą rodzinę receptorów pośredniczących w przekazywaniu sygnału ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. Charakterystyczną cechą ich struktury jest siedem helis przenikających błonę komórkową. Łączy je także ogólny mechanizm transdukcji sygnału. Polega on na związaniu liganda w domenie zewnątrzkomórkowej receptora i przeniesieniu pobudzenia poprzez zmiany konformacyjne na białko G. Kaskada uruchamiana przez aktywację receptora powoduje zmianę metabolizmu komórki, wpływając na aktywność kinaz białkowych i kanałów jonowych. Do tej rodziny należą receptory β -AR obecne w sercu. Ich główną rolą w organizmie jest pośredniczenie w natychmiastowej regulacji układu krążenia w odpowiedzi na bodźce stresowe. Przewlekła stymulacja tych receptorów prowadzi do uaktywnienia ścieżek proprzerostowych w sercu. Niewydolność serca (NS) charakteryzuje się przewlekłą nadmierną stymulacją receptorów β -AR. Skutkuje to zmianą w składzie ilościowym receptorów β -AR w sercu i niesie za sobą zmianę w odpowiedzi serca na sytuacje stresowe. Poznanie struktury i sposobu funkcjonowania receptorów β -AR pozwoliło na wprowadzenie odpowiedniej terapii u osób dotkniętych NS. Artykuł podsumowuje aktualny stan wiedzy dotyczący budowy i funkcjonowania receptorów β -AR w sercu.

Summary

In 2012 Kobilka and Lefkowitz won the Nobel Prize in chemistry for their work on G-protein coupled receptors (GPCR). GPCRs comprise a large receptor family engaged in signal transduction from the external environment to the cell interior. The most characteristic feature of this family is a receptor structure that involves seven transmembrane helices arranged into a funnel. GPCRs have also common mode of signal transduction which consist in receptor rearrangement, caused by binded ligand, and as a result activation of G protein. The cascade started by receptor activation leads to changes in cellular metabolism through acting with protein kinases or ionic channels. Cardiac β -adrenergic receptors (β -AR) are the member of this family. Their main role is in immediate adaptation of the cardiovascular system to the external stressors. Heart failure (HF) is associated with chronic excessive β -AR stimulation that results in hypertrophic myocardial response and in quantitative changes in the cardiac β -AR expression and activity. Knowledge of the β -AR's structure and mechanism of action set the stage for the contemporary HF therapy with β -AR antagonists.

WPROWADZENIE

W 2012 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii otrzymali Brian K. Kobilka i Robert J. Lefkowitz. Autorzy ci od lat 70. XX w. pracowali nad izolacją, krystalizacją i badaniem struktury receptorów β -adrenergicznych. Nagroda została przyznana za całokształt prac oby-

dwu naukowców, które pozwoliły zrozumieć, w jaki sposób funkcjonują i jak są zbudowane receptory sprzężone z białkiem G (ang. *G-protein coupled receptor* – GPCR), w tym β -AR. Receptory GPCR są dużą rodziną receptorów błonowych, które: mają podobną strukturę, odbierają sygnały chemiczne z otoczenia

komórek niesione przez hormony, neurotransmitery, neuropeptydy, substancje parakrynnne, substancje odżywcze, zapachy, smaki oraz pośredniczą w przekazywaniu tych sygnałów do wnętrza komórki za pośrednictwem wewnątrzkomórkowego efektoru, jakim jest białko G (1, 2).

W sercu obecne są receptory adrenergiczne β_1 , β_2 i β_3 (β -AR) różniące się powinowactwem do agonistów, komórkowymi szlakami sygnalizacyjnymi i funkcją biologiczną. Stosunek gęstości β_1 -AR do β_2 -AR na powierzchni kardiomiocytów wynosi 3:1. W natychmiastowej regulacji układu krążenia (minuty), której istota polega między innymi na zmianie czynności serca, udział biorą głównie β_1 -AR poprzez aktywację szlaku kinazy białkowej A. Wynika to z ilościowej przewagi β_1 -AR nad β_2 -AR oraz faktu, że β_1 -AR mają większe powinowactwo do agonistów niż pozostałe β -AR. Wypadkowym efektem krótkotrwałej stymulacji współczulnej serca są: wzrost siły skurczu miokardium, przyspieszenie rozkurczu, przyspieszenie częstości rytmu zatokowego i zwiększenie szybkości przewodzenia w węzle AV. Aktywacja β_2 -AR i β_3 -AR służy głównie jako mechanizm ograniczający skutki nadmiernej aktywacji β_1 -AR, poprzez desensytyzację i tzw. down-regulację β_1 -AR. Przedłużająca się aktywacja współczulna skutkuje aktywacją dodatkowych ścieżek sygnalizacyjnych prowadzących do przerostu mięśnia sercowego. W przypadku regularnego treningu sportowego aktywowane są szlaki skutkujące blokowaniem apoptozy i tzw. przerostem fizjologicznym (poprzez aktywację β_2 -AR i szlaki „pro-life”), a w przypadku niewydolności krążenia (NS) dodatkowo szlaki skutkujące przyspieszoną apoptozą i tzw. przerostem patologicznym (poprzez aktywację β_1 -AR i szlaki „pro-death”). W NS ekspresja i aktywność β_1 -AR w sercu są obniżone, co z jednej strony chroni je przed nadmierną stymulacją współczulną, a z drugiej – ogranicza możliwość wzrostu rzutu minutowego serca podczas wysiłku i w różnych sytuacjach stresowych.

STRUKTURA RECEPTORÓW GPCR

W ludzkim organizmie wykryto kilkaset receptorów GPCR. Białka te są zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o pofałdowanej strukturze, który siedmiokrotnie przenika błonę komórkową, tworząc w jej rdzeniu domenę hydrofobową oraz pozabłonowe domeny: zewnątrz- i wewnątrzkomórkową. Domena wewnątrzbłonowa zbudowana jest z α -helis (oznaczonych symbolami TM1-TM7, licząc od N-końca), których wzajemne ułożenie tworzy okrągły lub lejkowaty kształt. Helisy połączone są ze sobą pętlami wystającymi ponad błonę – do cytozolu i na zewnątrz komórki. Domena wewnątrzkomórkowa receptora tworzona jest przez pętlę ICL1-ICL3 (ang. *intracellular loop*) eksponowane do wnętrza komórki oraz C-koniec łańcucha polipeptydowego. Pętla ICL3, łącząca helisy błonowe TM5 z TM6, wspólnie z pętlą ICL2 oraz fragmentem C-końca tworzy miejsce wiązania i aktywacji białka G. Domena zewnątrzkomórkowa tworzona jest przez pętle ECL1-ECL3 znajdujące się poza cytozo-

lem (ang. *extracellular loop*) oraz przez N-koniec białka. W części zewnątrzkomórkowej receptora zachodzi wiązanie ligandów. Wejście dla nich znajduje się pomiędzy pętlą ECL3 a połączonymi pętlami ECL1 i ECL2 (które tworzą przykrywkę nad miejscem wiązania ligandu). Budowa domeny zewnątrzkomórkowej może różnić się w szczegółach pomiędzy różnymi receptorami, jednak ogólny schemat jest wspólny (1, 3-5).

Części wewnątrz- i zewnątrzkomórkowa receptora mogą ulegać modyfikacjom potranslacyjnym. W części zewnątrzkomórkowej mogą powstawać mostki siarczkowe stabilizujące strukturę przestrzenną receptora. W β -AR mostki spinające pętlę ECL3 otwierają większy dostęp ligandów do kieszeni receptora. Część wewnątrzkomórkowa może ulegać glikozylacji, mirystylacji i palmitynizacji lub może przyłączać cząsteczki cholesterolu. Modyfikacje te mają znaczenie w kierowaniu receptora do miejsc w błonie komórkowej bogatej w kaweole lub tratwy lipidowe. Dodatkowo, okolice C-końca bogate w serynę i treoninę mogą być fosforylowane przez odpowiednie kinazy, co skutkuje inaktywacją receptora (*vide* poniżej) (4).

MECHANIZM TRANSDUKCJI SYGNAŁU GPCR

Po przyłączeniu się liganda do receptora następuje zmiana konformacyjna całego receptora. Polega to na takiej zmianie ułożenia przestrzennego helis transbłonowych, że możliwe staje się związanie białka G z wewnętrzną domeną receptora. Następuje aktywacja białka G, która skutkuje zmianą aktywności wewnątrzkomórkowego białka efektorowego (najczęściej kinazy białkowej lub kanału jonowego) i zmiana komórkowego poziomu substancji pełniącej funkcję przekaźnika informacji drugiego rzędu (np. cAMP). Jednorazowa aktywacja receptora skutkuje aktywacją wielu kopii białka G, co powoduje wzmocnienie sygnału. Transmisję sygnału blokuje fosforylacja receptora przez odpowiednie kinazy (*vide* poniżej) (3, 4, 6, 7).

Białko G jest heterotrimerem i składa się z podjednostek α , β i γ (istnieją także białka G_0 o budowie monomerycznej). Podjednostka α wiąże nukleotyd guanylowy (GTP) i ma aktywność GTP-azy. Natomiast β i γ tworzą niepodzielny kompleks, który łączy się z nieaktywną podjednostką α . Zaktywowane białko G zmienia konformację i cząsteczka GDP związana z podjednostką α jest wymieniana na GTP z cytozolu, co umożliwia odłączenie podjednostki α od kompleksu $\beta\gamma$. Białko G podzielone na komponenty α i $\beta\gamma$ przekazuje sygnał na białko efektorowe (np. cyklazę adenylową), czemu towarzyszy hydroliza GTP do GDP i nieaktywna podjednostka α odnawia wiązanie z kompleksem $\beta\gamma$ (5, 7-9).

Istnieje kilka izoform białka G (G_s , G_i , G_t , $G_{q(p)}$, G_0) różniących się białkiem efektorowym, z którym wchodzi w interakcję. Białko G_s aktywuje cyklazę adenylową, która produkuje cAMP (7-10). G_i hamuje cyklazę adenylową i zmniejsza produkcję cAMP (7-10). $G_{q(p)}$ aktywuje fosfolipazę C, której produktami są diacyloglicerol (DAG) i trifosforan inozytolu (IP_3). G_t aktywuje fosfodiesterazę, a białko G_0 hamuje kanały wapniowe (7, 9).

Obok podjednostki α także kompleks $\beta\gamma$ ma działanie sygnalizacyjne. Aktywuje mianowicie kinazę receptorów GPCR (GRK), która fosforylując białko receptorowe, skutkuje zahamowaniem aktywności receptora, co jest mechanizmem zabezpieczającym przed nadmierną aktywacją receptora (*vide* poniżej) (7, 11). Kompleks $\beta\gamma$ bierze również udział w receptorowej aktywacji kanałów wapniowych i niektórych potasowych (7-9).

WPŁYW LIGANDÓW NA AKTYWNOŚĆ RECEPTORA

Receptory GPCR są często przedstawiane w ujęciu bimodalnym. Zakłada ono, że receptor może występować tylko w jednym z dwóch stanów – może być w stanie aktywnym, w którym miejsce wiązania białka G jest odsłonięte, albo w stanie nieaktywnym, w którym miejsce wiązania białka G jest zakryte. Wbrew tej koncepcji, niektóre receptory GPCR, w tym β -AR, wykazują pewną podstawową aktywność nawet pod nieobecność agonisty. Okazuje się ponadto, że podstawowa aktywność receptorów może być regulowana przez ligandy. W tym kontekście wyróżnia się: a) pełnych agonistów – czyli ligandy skutkujące maksymalną aktywacją receptora, b) częściowych agonistów – czyli ligandy, które nawet w stężeniach wysycających receptor skutkują jedynie submaksymalną aktywacją białka G oraz c) odwrotnych agonistów – czyli ligandy, które hamują podstawową aktywność receptora. Natomiast antagoniści nie modyfikują aktywności samego receptora, a jedynie kompetencyjnie blokują wiązanie z nim innych ligandów (2, 4, 12). Interakcja liganda z receptorem może odbywać się na dwa sposoby. Agonista może skutkować zmianą konformacji receptora poprzez proste zakłócenie oddziaływań istniejących wewnątrz jego cząsteczki i kreując zestaw oddziaływań stabilizujących nowy stan konformacyjny lub też może służyć jako mostek, który bierze udział w powstawaniu nowych interakcji pomiędzy domenami transbłonowymi i stabilizuje bardziej aktywną konformację receptora (2, 12).

SERCOWE EFEKTY NATYCHMIASTOWEJ AKTYWACJI β -AR

W sercu obecne są receptory adrenergiczne β_1 , β_2 i β_3 (β -AR). Agonistami β -AR w sercu są mediatorzy układu współczulnego: noradrenalina – uwalniana z zakończeń nerwowych sercowych włókien współczulnych, oraz adrenalina – uwalniana z rdzenia nadnerczy. W zdrowym sercu stosunek gęstości β_1 -AR do β_2 -AR wynosi 70-80%/20-30%. Dodatkowo, największe powinowactwo do agonistów mają β_1 -AR, a najmniejsze β_3 -AR (około 100 razy mniejsze). Razem wzięwszy, oznacza to, że przy umiarkowanym poziomie aktywacji współczulnej pobudzeniu ulegają głównie β_1 -AR i że dwa pozostałe β -AR włączają się dopiero w stanach znacznie zwiększonej aktywacji współczulnej.

Receptory β -adrenergiczne są (ryc. 1):

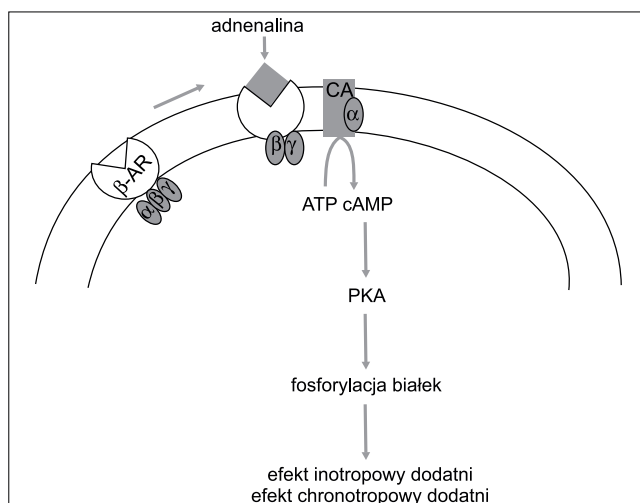
1. Sprzężone z białkiem G_s (heterotrimer $\alpha_s\beta\gamma$) i/lub białkiem G_i (heterotrimer $\alpha_i\beta\gamma$); podjednostka α_s

aktywuje cyklazę adenylową i produkcję cAMP, a podjednostka α_i enzym ten hamuje.

2. Białkiem efektorowym szlaku β -AR w sercu są: a) enzym cyklaza adenylowa, który przekształca ATP w cykliczny adenozyjno-mono-fosforan (cAMP) oraz b) kanał wapniowy typu L.
3. Drugorzędowymi przekąźnikami w ścieżce sygnalizacyjnej β -AR w sercu są cAMP oraz jony Ca^{2+} .
4. Kinazami aktywowanymi przez ścieżkę β -AR są: a) kinaza białkowa A (PKA) aktywowana przez cAMP; PKA przenosi resztę fosforanową z ATP na serynę, treoninę lub tyrozynę różnych białek i w ten sposób zmienia ich właściwości, w tym właściwości białek zaangażowanych w skurcz bądź rozkurcz kardiomiocytów, częstość pobudzeń wytwarzanych w węźle zatokowo-przedsionkowym, szybkość przewodzenia w łączu AV oraz metabolizm komórki (ryc. 2) oraz b) kinaza aktywowana przez kompleks Ca^{2+} -kalmodulina (CaMKII). Kinaza ta fosforyluje niektóre białka komórkowego obiegu jonów Ca^{2+} i w ten sposób uczestniczy w natychmiastowej regulacji pracy serca. Aktywuje także proprzerostowy szlak kalcyneuryny (ryc. 3).

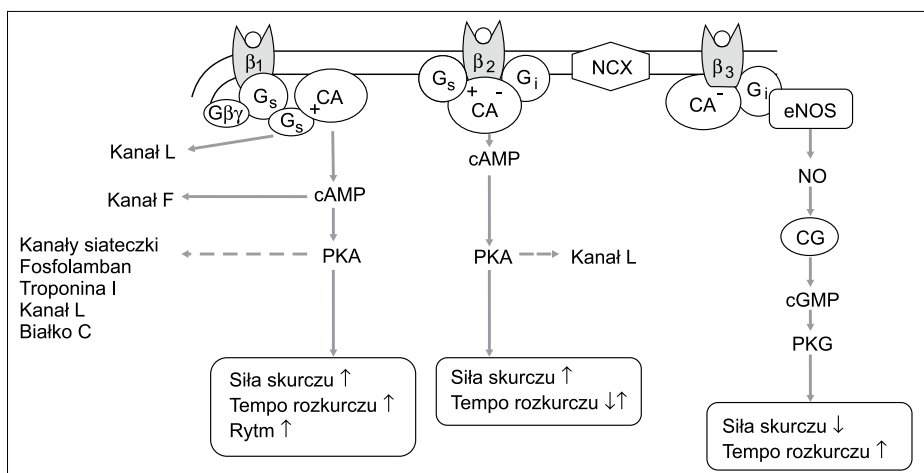
Receptory β_1

β_1 -AR są sprzężone wyłącznie z białkiem G_s , co oznacza, że podjednostka $G\alpha_s$ tego białka aktywuje cyklazę adenylową. Pobudzenie β_1 -AR prowadzi do wzrostu komórkowego poziomu cAMP, aktywacji PKA i fosforylacji różnych białek. Efektem czynnościowym tej fosforylacji w sercu jest przyspieszenie akcji serca (efekt dromotropowy dodatni) i przewodzenia AV (efekt dromotropowy dodatni), wzrost siły skurczu (efekt inotropowy dodatni), przyspieszenie rozkurczu mięśnia sercowego (efekt lusitropowy dodatni) oraz szereg efektów metabolicznych. Wszystkie te efekty zwiększają sprawność hemodynamiczną serca jako

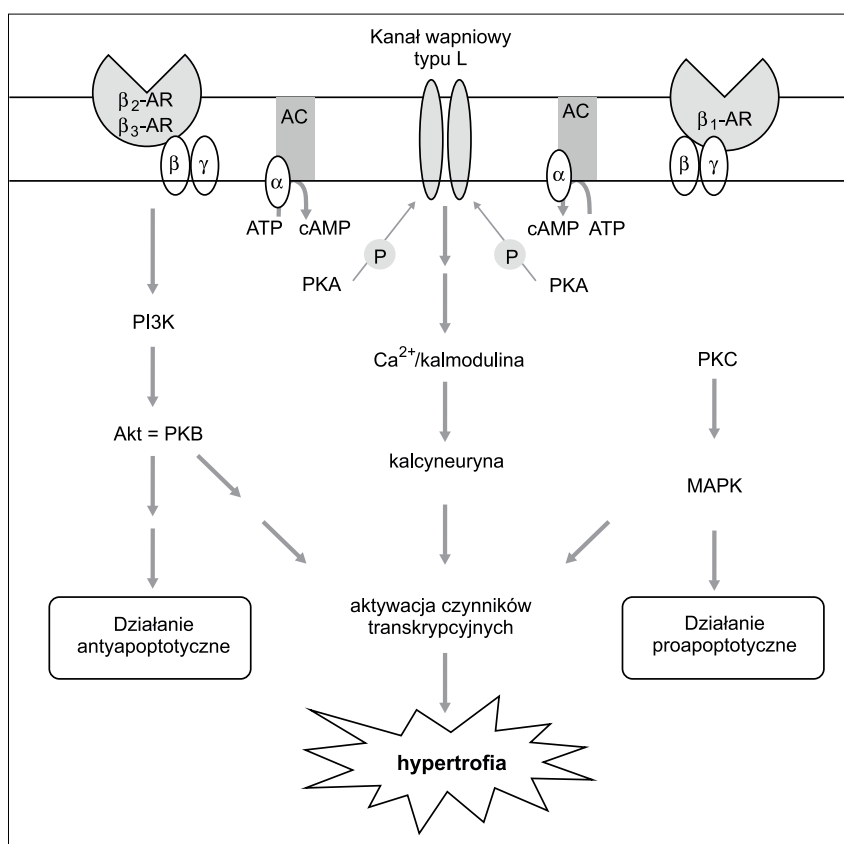


Ryc. 1. Schemat przekazywania sygnału przez receptory β -adrenergiczne.

β -AR – receptor adrenergiczny β ; α , β , γ – podjednostki białka G; CA – cyklaza adenylowa; ATP – adenozyjno-trifosforan; cAMP – cykliczny adenozyjno-monofosforan; PKA – kinaza białkowa A



Ryc. 2. Szlaki aktywowane stymulacją typów receptorów adrenergicznych β_1 , β_2 i β_3 (objaśnienia skrótów w tekście).



Ryc. 3. Mechanizmy zabezpieczające komórkę przed nadmierną stymulacją katecholaminową. Sekwencja wydarzeń obejmuje: (1) aktywację β -AR; (2) fosforylację β -AR przez β -ARK; (3) blokowanie interakcji β -AR-białko Gs przez β -arrestynę; (4) internalizację β -AR w mechanizmie ich endocytozy oraz (5) β -ARK zamknięty w endosomie jest albo magazynowany w cytoplazmie, albo wraca na powierzchnię błony, albo ulega degradacji w lizosomach.

pompy i umożliwiają skuteczne dostosowywanie jej pracy do zwiększonych potrzeb związanych z sytuacjami stresowymi (13). Dodatkowo fosforylacji ulegają same β -AR, co jest mechanizmem ochronnym komórek przed nadmierną stymulacją współczulną.

Efekt inotropowy dodatni β_1 -AR jest związany z fosforylacją czterech różnych białek. Są to:

1. Fosforylacja kanałów wapniowych typu L przez PKA – powoduje zwiększony napływ jonów Ca^{2+} do kardiomiocytów w czasie potencjału czynnościowego i większą aktywację aparatu kurczliwego. Do aktywacji kanału wapniowego dochodzi

dodatkowo w wyniku bezpośredniego oddziaływania podjednostki G_{α_s} z kanałem. W węzle AV aktywacja kanału wapniowego skutkuje ponadto przyspieszeniem przewodnictwa. Ca^{2+} napływający do kardiomiocytów w wyniku aktywacji β_1 -AR i kanału wapniowego pełni również rolę aktywatora różnych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnalizacyjnych skutkujących aktywacją genów, a następnie przerostem miokardium, a w patologicznych sytuacjach – apoptozą kardiomiocytów i rozwojem tzw. fenotypu niewydolnego serca (vide poniżej).

2. Fosforylacja fosfolambanu – powoduje aktywację ATP-azy wapniowej w siateczce śródplazmatycznej (SERCA). Skutkuje to szybszym usuwaniem Ca^{2+} z cytoplazmy i szybszym rozkurczem kardiomiocytów, a także większym gromadzeniem się Ca^{2+} w siateczce i silniejszym skurczem.
3. Fosforylacja kanałów wapniowych w siateczce śródplazmatycznej (receptorów rianodynowych – RyRs) – ułatwia ich otwarcie i prowadzi do wydzielania z siateczki większej ilości Ca^{2+} i wzrostu siły skurczu. Nadmierna fosforylacja RyRs jest źródłem nieszczelności tych kanałów, co osłabia skurcz, a dodatkowo skutkuje powstawaniem arytmogennych depolaryzacji następczych późnych.
4. Fosforylacja białka C na filamencie miozynom – ułatwia tworzenie się połączeń pomiędzy miozyną a aktyną i sprzyja aktywacji skurczu. W aparacie kurczliwym fosforylowana jest także troponina I, co obniża powinowactwo troponiny C do Ca^{2+} , powodując szybsze odłączanie się miozyny od aktyny i szybszy rozkurcz komórki.

Efekt chronotropowy dodatni aktywacji β_1 -AR jest związany częściowo z fosforylacją i aktywacją kanału wapniowego typu L, a częściowo kanału jonowego F bezpośrednio przez cAMP (z pominięciem fosforylacji). Zmiany w obu tych kanałach skutkują zwiększeniem automatyzmu w komórkach węzła zatokowego.

Receptory β_2

β_2 -AR są sprzężone zarówno z białkiem G_s , jak i G_i . Oznacza to, że aktywacja β_2 -AR może skutkować zarówno aktywacją, jak i zahamowaniem aktywności cykazy adenylowej i równoczesnym pobudzeniem i hamowaniem klasycznego szlaku AC-cAMP-PKA. W zdrowym sercu przewagę mają efekty związane z aktywacją cykazy adenylowej i zwiększoną produkcją cAMP – świadczy o tym fakt, że wybiórcza aktywacja β_2 -AR (w obecności blokerów β_1 -AR i β_3 -AR) ma w sercu ssaków i ludzi efekt inotropowy dodatni spowodowany fosforylacją kanałów wapniowych typu L (14).

Analizę efektów aktywacji β_2 -AR na siłę skurczu mięśnia sercowego komplikuje fakt, że receptory te, poprzez białko G_i , a właściwie poprzez kompleks $\beta\gamma$ białka G_i , aktywują dodatkowo szlak kinazy trójfosforanu inozytoli (PI3K) i kinazy białkowej Akt (ryc. 3), co na wiele sposobów antagonizuje działanie klasycznego szlaku aktywacji β -AR. Aktywacja szlaku PI3K-Akt między innymi przeciwdziała fosforylacji fosfolambanu i troponiny przez PKA, a także prowadzi do aktywacji wymiennika $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), który usuwa jony Ca^{2+} z kardiomiocytów, co razem wzięwszy, zmniejsza ich siłę skurczu (ryc. 2).

Sens biologiczny równoczesnych oddziaływań β_2 -AR z białkami G_s i G_i nie jest do końca wyjaśniony. Do aktywacji β_2 -AR potrzebne są wyższe stężenia agonistów niż do aktywacji β_1 -AR. Ten fakt oraz coraz liczniejsze fakty eksperymentalne i kliniczne wskazują, że rola biologiczna stymulacji β_2 -AR, a specyficznie rola aktywacji szlaku β_2 - G_i polega na antagonizowaniu efektów nadmiernej aktywacji szlaków β_2 - G_s i β_1 - G_s po-

przez szlak β_2 - G_i . Na efekt ten prawdopodobnie składają się:

- a) hamowanie aktywności cykazy adenylowej i na tej drodze antagonizowanie natychmiastowych efektów aktywacji szlaków β_2 - G_s i β_1 - G_s ,
- b) aktywacja szlaku PI3K-Akt i związane z tym, wymienione powyżej, modyfikacje białek obiegu komórkowego Ca^{2+} , co jest prawdopodobnie działaniem bardziej odległym w czasie,
- c) aktywacja szlaku PI3K-Akt i związana z tym aktywacja tzw. prożyciowych ścieżek sygnalizacyjnych (szlaki „pro-life”) (m.in. inhibicja apoptozy, aktywacja przerostu fizjologicznego).

Dwa pierwsze działania zabezpieczyłyby serce przed arytmiami i utratą zasobów energetycznych komórek spowodowanych nadmierną stymulacją katecholaminową. Efekt trzeci ma prawdopodobnie dwa korzystne aspekty. Po pierwsze szlak PI3K-Akt może być odpowiedzialny za tzw. przerost fizjologiczny miokardium, który jest reakcją adaptacyjną serca na zwiększone obciążenie. Po drugie, aktywacja szlaku β_1 -AR prowadzi do rozwoju fenotypu niewydolnego serca, w tym do aktywacji apoptozy (szlaki „pro-death”), aktywacja β_2 - G_i częściowo zabezpiecza przed tymi odległymi konsekwencjami stymulacji katecholaminowej (*vide* poniżej). W próbach klinicznych znajduje się obecnie lek o właściwościach blokera β_1 -AR i agonisty β_2 -AR (clenbuterol). Dotychczasowe obserwacje pokazują, że działa on korzystnie na przebudowę mięśnia sercowego u pacjentów z NS (obieg wapnia, wrażliwość miofilamentów na wapń, morfologię komórek, wywiera efekt antyapoptotyczny).

Receptory β_3

β_3 -AR są sprzężone jedynie z białkiem G_i . Obecność β_3 -AR stwierdzono zarówno w przedsiódkach, jak i w komorach u ludzi i wielu ssaków. Wybiórcza stymulacja β_3 -AR (na tle blokady β_1 -AR i β_2 -AR) działa inotropowo ujemnie, lusitropowo dodatnio i skraca potencjał czynnościowy. Efekt inotropowy jedynie częściowo ma związek z hamowaniem cykazy adenylowej przez białko G_i . Ważniejsza dla tego efektu jest prawdopodobnie aktywacja szlaku PI3K-Akt i wtórna do tego aktywacja syntazy tlenu azotu (NO) w kardiomiocytach i zwiększona produkcja NO. Tak powstały NO działa następująco: NO aktywuje cyklastę guanylową (CG) i rośnie poziom komórkowy cyklicznego GMP (cGMP). cGMP aktywuje kinazę białkową G (PKG) oraz fosfodiesterazę typu drugiego (PDEII). PKG fosforyluje białka odpowiedzialne za skurcz kardiomiocytów – kanał wapniowy typu L – oraz troponinę I, przyspieszając rozkurcz. PDEII z kolei jest enzymem rozkładającym cAMP, dochodzi zatem do zmniejszenia aktywności PKA i stopnia fosforylacji jej substratów. Ponadto podjednostka $\beta\gamma$ białka G_i aktywuje kanały potasowe, powodując skrócenie czasu trwania potencjału czynnościowego. Obecność receptorów β_3 może prowadzić do zmniejszenia efektów działania katecholamin przez szlaki β_1 - G_s i β_2 - G_s , szczególnie przy wysokim stężeniu katecholamin (powinowactwo

β_3 -AR zarówno do adrenaliny, jak i noradrenaliny jest najniższe spośród wszystkich typów β -AR). Dodatkowo receptory β_3 nie ulegają odczuleniu pod wpływem stymulacji katecholaminowej, ponieważ nie są fosforylowane przez kinazy β -ARK i PKA, jak ma to miejsce w przypadku β_1 -AR i β_2 -AR (ryc. 2).

AUTOREGULACJA WRAŻLIWOŚCI β -AR NA KATECHOLAMINY

W wyniku aktywacji β -AR fosforylacji ulegają także same β -AR (β_1 -AR oraz β_2 -AR, ale nie β_3 -AR), co jest elementem mechanizmu obronnego komórek przed nadmierną stymulacją katecholaminową (13). W procesie fosforylacji β -AR uczestniczą trzy kinazy: PKA, β -arrestyna oraz tzw. kinaza β -AR (β -ARK), znana także jako kinaza receptorów związanych z białkiem G typu 2 (GRK2). W miarę przedłużania się aktywacji współczulnej i postępującej fosforylacji β -AR zachodzą kolejno trzy procesy obronne. Są to (ryc. 4):

1. Zmniejszenie wrażliwości szlaku β -AR-Gs-cAMP-PKA na stymulację katecholaminową (desensytyzacja β -AR). Proces rozpoczyna się natychmiast po ekspozycji β -AR na katecholaminy. Kompleks agonista- β -AR aktywuje białko G. To rozpada się na podjednostkę α (działa na cyklazę adenylową) oraz dimer $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$). $G\beta\gamma$ aktywuje β -ARK, a ta fosforyluje β -AR. Ufosforylowany β -AR wiąże β -arrestynę, która uniemożliwia łączenie się β -AR z białkiem G_s . Ostatecznie zmniejszają się: aktywacja cykazy adenylowej, produkcja cAMP i aktywacja PKA. Proces jest dodatkowo wzmacniany poprzez fosforylację β -AR za pośrednictwem PKA, gdyż fosforylacja ta zwiększa wiązanie β -AR do białka G_i .
2. Zmniejszenie gęstości β -AR obecnych na powierzchni błony komórkowej poprzez magazynowanie ich w pęcherzykach podbłonowych (internalizacja β -AR). Usuwanie β -AR z błony następuje

na drodze endocytozy i trwa od kilku minut do kilku godzin. W proces są zaangażowane białka klatryna i AP2, a β -arrestyna działa jako adaptor mocujący β -AR do wyścielonych klatryną wpukleń błony komórkowej (endosomów). Proces ten jest odwracalny: β -arrestyna oddysocjuje od β -AR, kwaśne środowisko endosomów umożliwia defosforylację β -AR przy udziale fosfatazy GPCR i β -AR albo jest magazynowany w tej postaci w endosomach, albo wraca na powierzchnię błony komórkowej.

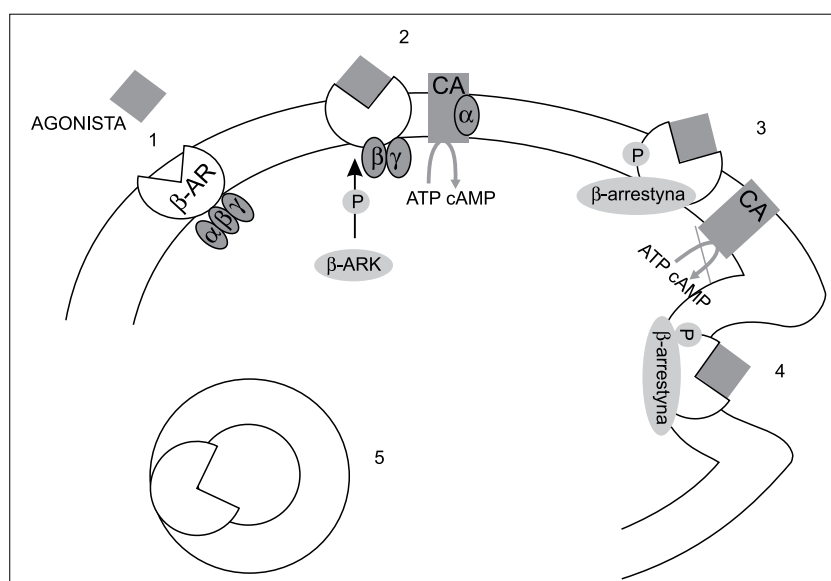
3. Zmniejszenie ogólnej liczby β -AR w komórkach poprzez zwiększoną degradację i zmniejszoną syntezę białka receptorowego (ang. *downregulation*). Endosomy z β -AR mogą ulec degradacji w lizosomach i dochodzi do spadku nie tylko ich gęstości, ale także ilości (internalizacja nieodwracalna).

Komórki bronią się przed przedłużającym się brakiem stymulacji katecholaminowej, np. spowodowanej długotrwałym stosowaniem β -blokerów, w ten sposób, że zwiększają liczbę β -AR na powierzchni komórki (ang. *upregulation*).

ZMIANY W UKŁADZIE β -AR W NIEWYDOLNOŚCI SERCA

W przewlekłej NS występują liczne zmiany w układzie β -AR, które są prawdopodobnie wynikiem nadmiernej i długotrwałej stymulacji układu współczulnego, jaka towarzyszy NS. Ich sens biologiczny, jak się wydaje, polega na ograniczeniu aktywacji szlaku β_1 -AR- G_s i β_2 -AR- G_s (szlak „pro-death”) i równoczesnym zwiększeniu aktywacji szlaku β_2 -AR- G_i (szlak „pro-life”). Można je wobec tego traktować jako reakcję obronną układu przed skutkami nadmiernej stymulacji katecholaminowej. Najczęstsze zmiany w układzie β -AR w NS to:

- a) bezwzględny spadek ekspresji i gęstości β_1 -AR w kardiomyocytach bez zmiany gęstości β_2 -AR.



Ryc. 4. Szlaki aktywowane w wyniku długotrwałej stymulacji receptorów β -AR (objaśnienia skrótów w tekście).

W zdrowym sercu stosunek gęstości β_1 -AR do β_2 -AR wynosi 70-80%/20-30%, a w NS może spadać nawet do 50%/50%, co oznacza, że w NS względna gęstość i znaczenie czynnościowe β_2 -AR rośnie,

- b) spadek wrażliwości β_1 -AR i β_2 -AR na katecholaminy, mierzony mniejszą zdolnością katecholamin do zwiększania komórkowej produkcji cAMP i stymulacji PKA,
- c) wzrost ekspresji i aktywności kinazy β -AR (β -ARK),
- d) wzrost ekspresji i aktywności białka G_i , który sprawia, że większa frakcja β_2 -AR sprzęga się właśnie z tym białkiem, a nie białkiem G_s ,
- e) wzrost powinowactwa β_2 -AR do białka G_i ,
- f) wzrost gęstości β_3 -AR. Receptory te nie są fosforylowane i nie ulegają internalizacji, a dodatkowo rośnie ich ekspresja, co sugeruje, że rośnie ich znaczenie czynnościowe, np. związane z aktywacją białka G_i i aktywacją prożyciowych szlaków sygnalizacyjnych, jak w przypadku β_2 -AR.

Oslabienie szlaków β_1 -AR w NS jest korzystne, ponieważ sygnały aktywujące szlaki przerostu patologicznego są osłabione, a ponadto spada zużycie energii przez mięsień sercowy i maleje predyspozycja do arytmii (w mechanizmie depolaryzacji następczych późnych). Równocześnie jednak osłabienie szlaku β_1 -AR ogranicza zdolność mięśnia sercowego do odpowiedzi na aktywację współczulną w sytuacjach stresowych wymagających zwiększonego rzutu minutowego serca. Wyeksponowanie szlaku β_2 -AR jest korzystne, ponieważ wzmocnione zostają sygnały aktywujące szlaki przerostu fizjologicznego. Równocześnie jednak osłabia się odpowiedź serca na stymulację współczulną, zwłaszcza że NS towarzyszy zwykle wzrost ekspresji wymiennika Na^+/Ca^{2+} .

Mechanizm, w jakim β -bloker zmniejszają umiarkowanie w NS i mają korzystny wpływ na proces przebudowy w NS, nie jest w pełni zrozumiały. Najpewniej wynika z blokowania toksycznych efektów nadmiernej aktywacji współczulnej, w tym z blokowania proarytmicznego działania tej stymulacji. W wyniku leczenia β -blokerami częściowo normalizuje się gęstość β_1 -AR oraz proporcja gęstości β_1 -AR/ β_2 -AR, a także ekspresja β -ARK i białka G_i . Możliwe, że pomimo blokady β -AR, przywrócenie właściwej proporcji β_1 -AR/ β_2 -AR umożliwia bardziej elastyczne dostosowywanie rzutu minutowego serca do aktualnych potrzeb hemodynamicznych związanych z sytuacjami stresowymi dnia codziennego.

SZLAKI „PRO-LIFE” I „PRO-DEATH” AKTYWOWANE PRZEWLEKŁĄ STYMULACJĄ β -AR

Długotrwała stymulacja β -AR powoduje aktywację trzech szlaków sygnalizacyjnych skutkujących zmianą aktywności kodu genetycznego kardiomiocytów i zmianą ich struktury (ryc. 3). Z jednej strony są to szlaki skutkujące blokowaniem apoptozy i tzw. przerostem fizjologicznym (tzw. szlaki prożyciowe, „pro-life”). Z drugiej strony są to szlaki skutkujące przyspieszoną apoptozą, ekspresją licznych genów typowych dla

serc płodowych (tzw. fenotyp płodowy miokardium) i tzw. przerostem patologicznym miokardium (szlaki „pro-death”). Omawiane szlaki to:

1. Szlak kinazy trójfosforanu inozytolu (PI3K) i kinazy białkowej Akt o działaniu „pro-life”. Aktywacja szlaku jest wynikiem aktywacji β_2 -AR i β_3 -AR, a właściwym aktywatorem PI3K jest podjednostka $\beta\gamma$ białka G_i . Aktywacja β_2 -AR i szlaku PI3K-Akt ma silne działanie antyapoptotyczne i proprzerostowe. Antyapoptotyczne działanie stymulacji β_2 -AR noszą blokery białka G_i i jego podjednostek $\beta\gamma$ oraz kinazy PI3K. Zablockowanie G_i powoduje, że antyapoptotyczne działanie stymulacji β_2 -AR zmienia się na proapoptotyczne, co pokazuje, że szlak związany z białkiem G_s jest proapoptotyczny, a z G_i antyapoptotyczny (15). Innym aktywatorem tego PI3K-Akt jest IGF1 (insulinopodobny czynnik wzrostowy), o którym wiadomo, że jest produkowany w sercu pod wpływem treningu sportowego i że, przynajmniej częściowo, jest aktywatorem rozwoju fizjologicznego przerostu serca spowodowanego treningiem.
2. Szlak kalcyneuryny – proprzerostowy i przynajmniej w początkowej fazie aktywacji antyapoptotyczny („pro-life”). Konsekwencją aktywacji β_1 -AR, a następnie aktywacji kaskady cykloz adenylowa-cAMP-PKA jest aktywacja kanału wapniowego, napływ Ca^{2+} do komórki, aktywacja kinazy CaMKII, aktywacja kalcyneuryny, wejście do jądra komórkowego czynnika transkrypcyjnego NFAT i indukcja programu genetycznego proprzerostowego.
3. Szlak kinazy białkowej C i MAP-kinaz o działaniu proapoptotycznym i promującym przerost patologiczny („pro-death”). Aktywacja tego szlaku jest wtórna do obciążenia komórki jonami Ca^{2+} i do aktywacji przez Ca^{2+} kinazy białkowej C (PKC), a następnie różnych szlaków MAP-kinaz. PKC jest miejscem, gdzie spotykają się wpływy takich proapoptotycznych i promujących przerost patologiczny agonistów jak angiotensyna II, noradrenalina czy endotelina. W wyniku przewlekłej stymulacji β_1 -AR rzeczywiście dochodzi do aktywacji kilku szlaków MAPK (p38, JNK, ERK1/2) oraz do apoptozy i przerostu mięśnia sercowego. W mechanizmie tym bezpośrednim aktywatorem MAPK są wolne rodniki powstające w niezidentyfikowanym dotąd mechanizmie. Stymulacja β_2 -AR i β_3 -AR, a także zwiększona ekspresja β_2 -AR mają działanie antyapoptotyczne (16).

Długotrwała stymulacja β_1 -AR, oprócz nasilania przerostu i apoptozy, ma działanie proarytmiczne. Ma to związek z nadmierną fosforylacją kanałów wapniowych siateczki (RyRs) przez PKA i z arytmogennym „wyciekaniem” Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej. Prawdopodobnie, właśnie to zaburzenie jest najgroźniejszą konsekwencją nadmiernej stymulacji układu współczulnego w NS (17), a zapobieganie arytmiom powstającym w tym mechanizmie stanowi istotę korzystnego działania β -blokerów w NS (18).

PODSUMOWANIE

Badania nagrodzonych Nagrodą Nobla naukowców umożliwiły zrozumienie działania receptorów związanych z białkiem G, w tym receptorów β -AR. Połowa stosowanych dziś leków działa za pośrednictwem GPCR. Kobilka i Lefkowitz odkryli strukturę receptorów β_1 -AR, β_2 -AR i β_3 -AR, dzięki czemu możliwe jest projektowanie odpowiednich substancji chemicznych mogących na nie oddziaływać. Mając na uwadze obserwacje korzystnego dzia-

łania blokady na receptory β_1 -AR i jednocześnie pozytywne aspekty aktywacji receptorów β_2 -AR i β_3 -AR, sensowne wydają się badania nad potencjalnymi lekami, które mogłyby charakteryzować się wybiórczą aktywnością wobec każdego z tych receptorów. Mogłoby to przełożyć się na zmniejszenie śmiertelności i wzrost jakości życia dla pacjentów dotkniętych niewydolnością serca, a dla systemu opieki zdrowotnej skutkować zmniejszeniem kosztów hospitalizacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Nygaard R, Frimurer TM, Holst B et al.: Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 249-259.
2. Kobilka BK, Deupi X: Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 397-406.
3. Schertler G: Structure of rhodopsin and the metarhodopsin I photointermediate. *Curr Opin Struct Biol* 2005; 15: 408-415.
4. Kobilka BK, Schertler G: New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 79-83.
5. Kobilka BK: G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 794-807.
6. Soubias O, Gawrisch K: The role of the lipid matrix for structure and function of the GPCR rhodopsin. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1818: 234-240.
7. Traczyk W, Trzebski A: Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004.
8. Hoyer D, Bartfai T: Neuropeptides and Neuropeptide Receptors: Drug Targets, and Peptide and Non-Peptide Ligands: a tribute to Prof. Dieter Seebach. *Chemistry & Biodiversity* 2012; 9: 2367-2387.
9. Lefkowitz RJ: Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 413-422.
10. Lefkowitz RJ: Heterogeneity of adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptors. *Biochem Pharmacol* 1975; 24: 583-590.
11. Whalen EJ, Foster MW, Matsumoto A et al.: Regulation of β Adrenergic Receptor Signaling by S-Nitrosylation of G-Protein-Coupled Receptor Kinase 2. *Cell* 2007; 129: 511-522.
12. Zoicher M, Fung JJ, Kobilka BK: Ligand-Specific Interactions Modulate Kinetic, Energetic, and Mechanical Properties of the Human β_2 Adrenergic Receptor. *Structure* 2012; 20: 1391-1402.
13. Mackiewicz U, Klemenska E, Beręsewicz A: Receptory beta-adrenergiczne w zdrowym i niewydolnym sercu. *Kardiologia Pol* 2007; 65: 368-375.
14. Molenaar P, Parsonage WA: Fundamental considerations of beta-adrenoreceptor subtypes in human heart failure. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 368-375.
15. Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ et al.: Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1607-1612.
16. Razeghi P, Young ME, Alcorn JL et al.: Metabolic Gene Expression in Fetal and Failing Human Heart. *Circulation* 2001; 104: 2923-2931.
17. Marks AR: Ryanodine receptors, FKBP12, and heart failure. *Front Biosci* 2002; 7: d970-d97.
18. Doi M, Yano M, Kobayashi S et al.: Propranolol prevents the development of heart failure by restoring FKBP12.6-mediated stabilization of ryanodine receptor. *Circulation* 2002; 105: 1374-1379.

otrzymano/received: 09.04.2014
zaakceptowano/accepted: 03.06.2014