

Received: 19.01.2017
Accepted: 21.11.2017
Published: 14.03.2018

Funkcjonalna charakterystyka białka UBIAD1 – punktu węzłowego w syntezie witaminy K i cholesterolu – od dystrofii rogówki do chorób cywilizacyjnych*

Functional characterization of the UBIAD1 protein: The nodal point for vitamin K and cholesterol synthesis. From corneal dystrophies to lifestyle diseases

Anna Sarosiak^{1,2}, Monika Ołdak^{1,3}

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

³Zakład Genetyki, Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu, Warszawa

Streszczenie

Białko zawierające domenę transferazy prenylowej UbiA (UBIAD1) jest transbłonowym białkiem enzymatycznym pełniącym istotne funkcje fizjologiczne w ludzkim organizmie. Do dotychczas poznanych, najważniejszych z nich zalicza się (i) syntezę endogennej postaci witaminy K, (ii) pośredni i bezpośredni udział w szlaku syntezy cholesterolu i (iii) syntezę pozamitochondrialnego ubichinonu Q10 (CoQ10) – komórkowego antyoksydanta. Białko UBIAD1 jest pierwszym i jedynym poznanym dotychczas białkiem przeprowadzającym konwersję pochodnych form roślinnej witaminy K₁ do endogennej witaminy K₂ (MK-4) w organizmie człowieka.

Mutacje w genie *UBIAD1* i/lub zaburzenia w funkcji kodowanego przez niego białka wywołują wiele następstw na poziomie metabolizmu komórkowego i stanowią patofizjologiczne podłoże wielu chorób, do których należy m.in. dystrofia rogówki Schnydera (SCD). Jest to dziedziczna choroba wywołująca stopniowe pogorszenie jakości widzenia przez odkładanie lipidowych złogów w rogówce. Mimo postępu wiedzy, dokładny mechanizm występowania tych zaburzeń nie jest znany. Poza tym dysfunkcję białka UBIAD1 powiązano z patogenezą innych chorób, takich jak choroba Parkinsona, choroby układu krążenia oraz nowotwory złośliwe stercza i pęcherza moczowego.

W artykule podjęto próbę pełnego scharakteryzowania wielu funkcji metabolicznych, jakie pełni białko UBIAD1 w organizmie na poziomie komórkowym. Omówiono także mechanizmy, których zaburzenie może spowodować wystąpienie zmian patologicznych obserwowanych w SCD. Na podstawie przytoczonych wyników badań wykazano złożoność i współzależność procesów, w które jest zaangażowane białko UBIAD1. Spróbowano w ten sposób dociec możliwych przyczyn i wyjaśnić podłoże występowania różnych chorób związanych z dysfunkcją tego białka.

Słowa kluczowe: UBIAD1 • dystrofia Schnydera • witamina K • cholesterol • HMGCR • koenzym Q10

*Publikacja powstała w związku z realizacją projektu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 1M15/N/2016.

Summary

UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1 (UBIAD1) is a transmembrane enzyme that plays an essential physiological role in the human body. The most important functions of the UBIAD1 protein include (i) the synthesis of endogenous vitamin K, (ii) direct and indirect participation in the cholesterol synthesis pathway and (iii) synthesis of the non-mitochondrial ubiquinone Q10 (CoQ10), a cellular antioxidant [27, 28, 30]. UBIAD1 is the only protein in the human body that is known to convert derivatives of the plant form of vitamin K₁ to the endogenous vitamin K₂ (MK-4).

Mutations in the *UBIAD1* gene and/or dysfunction of the UBIAD1 protein have severe consequences on cellular metabolism and are causative of many diseases, including Schnyder corneal dystrophy (SCD). It is an inherited disease that leads to gradual vision loss by the deposition of lipids in the cornea. The mechanism of the disease remains largely unknown. Importantly, dysfunction of UBIAD1 was also found in other diseases, such as (i) Parkinson's disease, (ii) cardiovascular diseases and (iii) prostate and bladder cancer.

In this paper we attempt to present a wide characterization of UBIAD1 metabolic functions at the cellular and tissue level. We also show the mechanisms that may lead to pathological changes observed in SCD. Based on previous research, we demonstrate the complexity of processes in which the UBIAD1 protein is involved. The aim of this review is to analyze possible causes and to present a probable explanation for the occurrence of various diseases related to the dysfunction of UBIAD1.

Keywords: UBIAD1 • Schnyder corneal dystrophy • vitamin K • cholesterol • HMGCR • coenzyme Q10

GICID: 01.3001.0011.6388
DOI: 10.5604/01.3001.0011.6388
Word count: 6583
Tables: 1
Figures: 6
References: 51

Adres autorki: dr hab. med. Monika Ołdak, Zakład Genetyki, Światowe Centrum Słuchu, Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu, ul. Mokra 17, Kajetany k. Warszawy, 05-830 Nadarzyn; e-mail: m.oldak@ifps.org.pl

Wykaz skrótów: **aa** – aminokwas (amino acid), **AG** – aparat Golgiego, **apoE** – apolipoproteina E, **CoQ10** – koenzym Q10, **EC** – komórki śródbłonna (endothelial cells), **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (endothelial nitric oxide synthase), **ER** – retikulum endoplazmatyczne (endoplasmic reticulum), **ERAD** – degradacja związana z retikulum endoplazmatycznym (ER-associated degradation), **FPP** – difosforan farnezyli, **GGOH** – geranylgeraniol, **GGPP** – difosforan geranylogeranyli, **GPP** – difosforan geranyli, **HCF** – ludzkie fibroblasty rogówki (human corneal fibroblasts), **MD** – menadion (menadione), **MD (H₂)** – zredukowana (hydrochinonowa) postać menadionu, **MK** – menachinon (menaquinone), **MK-4** – menachinon-4, **MK-4 (H₂)** – zredukowana (hydrochinonowa) postać menachinonu-4, **MK-4 (>O)** – epoksydowa postać menachinonu-4, **PK** – filochinon (phyloquinone), **PKP** – keratoplastyka drążąca (penetrating keratoplasty), **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species), **SOAT1/ACAT1** – acylotransferaza acylo-CoA:cholesterol (sterol O-acyltransferase 1/acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1), **SCD** – dystrofia rogówki Schnydera (Schnyder corneal dystrophy), **SXR** – receptor steroidów i ksenobiotyków (steroid and xenobiotic receptor), **VKDP** – białka zależne od witaminy K (vitamin K dependent proteins), **TERE1** – białko odpowiedzi przeciwnowotworowej w raku nabłonka przejściowego pęcherza moczowego (transitional epithelial response protein), **UBIAD1** – białko zawierające domenę transferazy prenylowej UbiA (UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1).

WSTĘP

Białko UBIAD1 (ubiA prenyltransferase domain-containing protein 1) należy do rodziny homologicznych białek z nadrodziny ubiA. Prenylotransferazy ubiA, ze względu na udział w licznych procesach biologicznych oraz powiązanie z wieloma chorobami metabolicznymi, są obecnie obiektem zainteresowania wielu badaczy [2,20,22,28,45]. Po raz pierwszy gen *UBIAD1* zidentyfikowano w 2001 r., jako inhibitor rozwoju raka pęcherza moczowego [26]. Kilka lat później, w 2007 r., powiązano jego mutacje z występowaniem rzadkiej, niezapalnej, dziedzicznej choroby rogówki – dystrofii Schnydera (Schnyder corneal dystrophy; SCD) [37,51]. Dokładna rola produktu genu *UBIAD1* jest słabo poznana, jednak największe postępy w zrozumieniu jego funkcji poczyniono w czasie badania patogenezy dystrofii Schnydera i raka pęcherza moczowego.

UBIAD1 jest transbłonowym białkiem enzymatycznym pełniącym wiele ważnych funkcji metabolicznych w ludzkim organizmie. Ma aktywność prenylotransferazową, czyli zdolność do przenoszenia grup prenylowych między cząsteczkami. W ten sposób, korzystając z różnych substratów reakcji, może syntetyzować w komórce istotne biologicznie związki, należące do grupy ubichinonów, menachinonów i witamin [16]. Białko *UBIAD1* jest przemieszczane między kompartmentami komórki i może bezpośrednio oddziaływać z innymi białkami. Dzięki tym właściwościom może uczestniczyć w utrzymaniu homeostazy organizmu na przynajmniej trzech znanych dotychczas poziomach, takich jak:

- synteza endogennej postaci witaminy K₂, niezbędnej w procesie aktywacji grupy białek zależnych od witaminy K, w tym także czynników krzepnięcia (podrozdział „Udział białka *UBIAD1* w metabolizmie i syntezie witaminy K”) [15,24,30,31,32,40,42],
- regulacja prawidłowego stężenia cholesterolu (homeostaza lipidowa) na poziomie komórkowym przez pośredni i bezpośredni udział w szlaku syntezy cholesterolu (podrozdział „Rola białka *UBIAD1* w utrzymaniu homeostazy cholesterolu”) [10,11,12,24,32] oraz
- zwiększanie potencjału redukcyjnego w komórce dzięki syntezie pozamitochondrialnego ubichinonu Q10 (CoQ10) – komórkowego antyoksydanta (podrozdział „Inne funkcje białka *UBIAD1* w komórce”) [22,29].

Rola, jaką pełni białko *UBIAD1* w utrzymaniu homeostazy lipidowo-cholesterolowej w rogówce wydaje się znamienna. Uważa się, że u osób zdrowych bierze ono udział w utrzymaniu prawidłowego stężenia steroidów w sposób bezpośredni – przez oddziaływanie z białkami szlaku syntezy cholesterolu, a także pośrednio – przez syntezę witaminy K [11,24,32]. Dotychczasowe badania wskazują, że mutacje, które upośledzają prawidłową strukturę wytwarzanego białka i mają znaczenie dla spadku jego funkcjonalności, są najprawdopodobniej ści-

śle powiązane z zaburzeniami występującymi w dystrofii Schnydera [48].

MUTACJE W GENIE *UBIAD1* POWODUJĄCE DYSTROFIĘ ROGÓWKI SCHNYDERA

UBIAD1 (UbiA prenyltransferase domain-containing gene 1) jest ludzkim genem kodującym białko *UBIAD1*. Ma długość 22 kb i znajduje się w obrębie krótkiego ramienia chromosomu pierwszego (*locus* 1p36.22) [37]. Ekspresja genu *UBIAD1* zachodzi w większości ludzkich tkanek [33].

Jeszcze do niedawna dokładne podłoże genetyczne SCD nie było znane. Przed odkryciem powiązania genu *UBIAD1* z występowaniem SCD, w 2001 r. został zidentyfikowany jako *TERE1* (transitional epithelial response gene; *TERE1*) – gen odpowiedzi przeciwnowotworowej w raku nabłonka przejściowego pęcherza moczowego [26]. Dla genu *UBIAD1/TERE1* zaobserwowano spadek poziomu ekspresji w wielu typach nowotworów układu moczowego [10,12].

W 1995 r. zidentyfikowano *locus* w krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p36) segregujący z występowaniem SCD [43]. W 2007 r. dwie niezależne grupy w obrębie tego *locus* odkryły mutacje w genie, któremu przyporządkowano symbol *UBIAD1* [37,49]. W ten sposób *UBIAD1/TERE1* został na nowo zidentyfikowany jako gen, którego mutacje są przyczyną SCD. *UBIAD1* jest oficjalnie przyjętym symbolem tego genu [6] i jest powszechnie stosowany w badaniach okulistycznych [23,32,33,50], natomiast synonimiczna nazwa *TERE1* nadal jest wykorzystywana w badaniach nad nowotworami układu moczowo-płciowego [10,11,27].

Dotąd opisano 27 niesynonimicznych mutacji punktowych występujących w obrębie genu *UBIAD1*, które powodują występowanie SCD [4,23,32,34]. Do najczęściej rozpoznawanych mutacji należą p.G177E/R, p.N102S i p.L121F [32]. W polskiej populacji potwierdzono także występowanie mutacji p.D112N (Ołdak i wsp., dane nieopublikowane). W populacji szwedzko-fińskiej, japońskiej i tureckiej, do najczęstszych mutacji należą zmiany w kodonach p.N102 i p.G177 (częstość odpowiednio 33 i 19% w rodzinach z SCD). W 2016 r. po raz pierwszy odnotowano spontaniczne powstanie mutacji związanej z SCD u osoby z rodziny nieobciążonej występowaniem tej choroby (p.T103I) [23].

Typowym objawem SCD jest wewnątrzkomórkowe i/lub międzykomórkowe powolne, postępujące gromadzenie się kryształów cholesterolu i złogów fosfolipidów w istocie właściwej rogówki. Zmiany te obniżają jakość widzenia, a w zaawansowanych stadiach prowadzą do ślepoty [50]. Często konieczne jest wdrożenie leczenia operacyjnego i poddanie pacjentów z SCD zabiegowi keratoplastyki drażącej (penetrating keratoplasty; PKP). Z raportu J.S. Weiss, z badań klinicznych wynika, że PKP poddawanych jest 54% pacjentów z SCD w wieku do 50 lat i 77%

pacjentów w wieku do 70 lat [48,49]. Choroba jest dziedziczona autosomalnie dominująco i zazwyczaj dotyka oboje oczu symetrycznie [37].

Dotychczasowe badania nie ujawniły dokładnego patogenetycznego mechanizmu tych nieprawidłowości. Rozważa się przede wszystkim: (i) bezpośrednie oddziaływanie uszkodzonego białka UBIAD1 z innymi białkami, z którymi może tworzyć kompleksy enzymatyczne, (ii) działanie pośrednie, przez zaburzenia w syntezie witaminy K i tym samym skutki jej niedoboru na poziomie komórkowym i tkankowym, (iii) upośledzenie funkcji antyoksydacyjnych przez obniżony poziom syntezy CoQ10 i stres oksydacyjny. Prowadzone obecnie badania mają na celu odkrycie nowych mechanizmów oraz odnalezienia zależności między tymi, które zostały już poznane, np. zbadania oddziaływań między metabolizmem witaminy K, a syntezą cholesterolu w rogówce [11,12,32,38].

CHARAKTERYSTYKA BIAŁKA UBIAD1

Białko UBIAD1 należy do nadrodziny transbłonowych prenylotransferaz UbiA, charakteryzujących się swoistymi właściwościami. Nazwa grupy pochodzi od bakteryjnego białka UbiA (transferazy oktaprenylo-4-hydroksybenzoesanowej), uczestniczącego w syntezie bakteryjnych ubichinonów [37]. Jest to rodzina homologicznych białek enzymatycznych, których wspólną cechą jest aktywność prenylotransferazowa, czyli zdolność do przenoszenia grup prenylowych między różnymi cząsteczkami [48]. Najczęściej akceptorami łańcucha poliprenyloвого w reakcji prenylacji są węglowodory aromatyczne. Prenylacja pozwala na dołączanie do związków podjednostek o charakterze hydrofobowym, co zwiększa ich rozpuszczalność i funkcjonalność w błonach komórkowych [22]. W ten sposób białka z nadrodziny UbiA katalizują główne etapy biosyntezy szerokiej gamy niezbędnych do życia związków występujących w błonach organizmów żywych. Należą do nich m.in. ubichinony, menachinony, plastochinony, hemy, chlorofile, witaminy E i lipidy strukturalne [38].

Sekwencja ludzkiego białka UBIAD1 wykazuje szczególne podobieństwo do bakteryjnej prenylotransferazy menA, występującej u *Escherichia coli*. Oba białka mają wysokie powinowactwo do substratów z grupy pochodnych kwasu 1,4-dihydroksy-2-naftoesowego (1,4-dihydroksy-2-naphthoic acid; DHNA) [22]. Jednak ludzkie białko UBIAD1 dysponuje większą elastycznością biochemiczną – korzystając z różnych substratów reakcji, może syntetyzować związki z grupy ubichinonów, menachinonów i witamin [16]. Białko UBIAD1 wykazuje także 57% homologii w stosunku do białka Heix, związanego pośrednio z transportem elektronów w łańcuchu białek mitochondrialnych u *Drosophila melanogaster* [26,46].

Na szeroki zakres działania białka UBIAD1 składają się przede wszystkim funkcje cząsteczek, które powstają w wyniku przeprowadzanych przez nie reakcji enzyma-

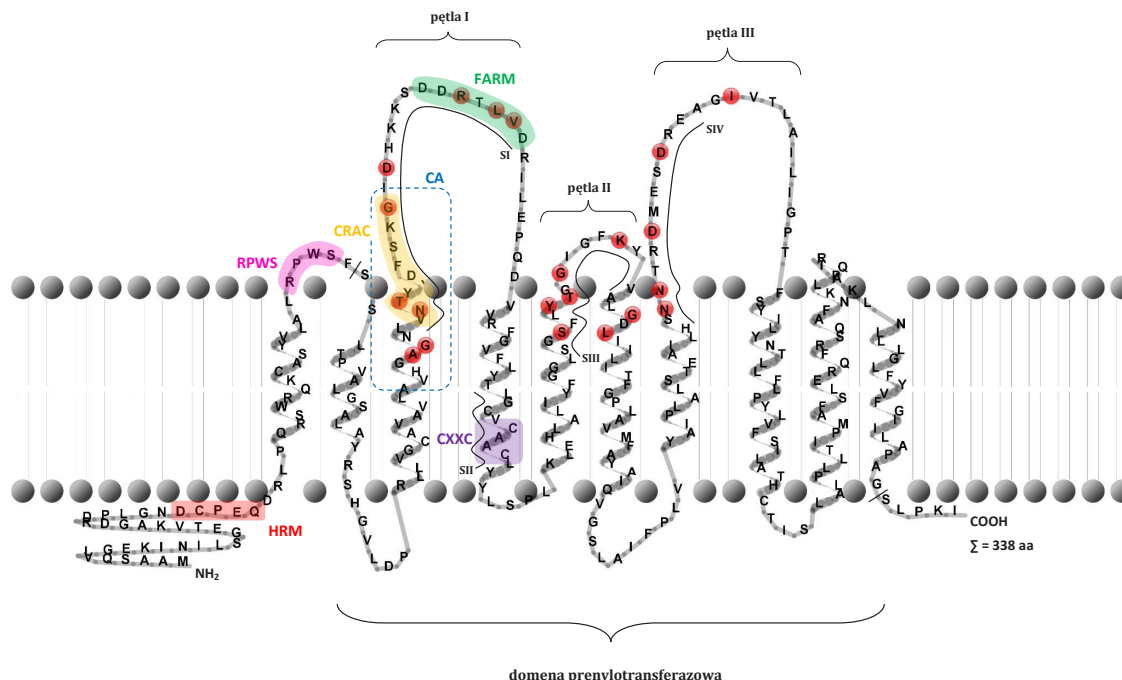
tycznych (m.in. MK-4 i CoQ10). Witamina K wykazuje silny wpływ na metabolizm lipidów, steroidogenezę, utrzymanie równowagi redoks i funkcji mitochondrialnych w komórce [30,42]. CoQ10 bierze udział w przeciwdziałaniu nadmiernemu generowaniu reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species; ROS) odpowiedzialnych za uszkodzenia i stres oksydacyjny komórek (m.in. peroksydację lipidów, nitrozylację białek, oksydację kwasów nukleinowych) [11,29]. Istotną składową w funkcjonalności białka UBIAD1 jest też jego zdolność do bezpośredniego oddziaływania z innymi białkami, głównie zaangażowanymi w metabolizm i transport cholesterolu, takimi jak: reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (3-hydroksy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase; HMGCR), acylotransferazaacylo-CoA:cholesterol (sterol O-acyltransferase 1/acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1; SOAT1/ACAT1) i apolipoproteina E (apoE).

Struktura białka UBIAD1

Białko UBIAD1 jest kodowane przez transkrypt *UBIAD1-001*, w którego skład wchodzi dwa pierwsze eksony genu *UBIAD1*. Jest zbudowane z 338 aminokwasów o łącznej masie 36,8 kD [26]. Jak większość białek należących do nadrodziny ubiA, zawiera w swojej budowie dziesięć α -helikalnych transbłonowych segmentów (ryc. 1) [10,44]. Dziewięć z nich znajduje się w obszarze przewidywanej funkcjonalnej domeny prenylotransferazowej (pozycja w białku UBIAD1: aa 58-333). Wszystkie poznane dotąd mutacje punktowe związane z SCD występują w tej domenie (ryc. 1) [32]. Zmiany w obrębie jej sekwencji mogą upośledzać strukturę przestrzenną powstałego białka i tym samym jego funkcję metaboliczną [33]. Wybrane fragmenty łańcucha polipeptydowego białka UBIAD1 są eksponowane po hydrofilowej, zewnętrznej stronie błony. Tworzą trzy charakterystyczne pętle, które stanowią prawdopodobnie strefę oddziaływania enzymu z innymi cząsteczkami. Wiele mutacji UBIAD1 grupuje się w tych pętlach (ryc. 1). Wśród 30 badanych rodzin z SCD, mutacje *UBIAD1* lokowały się z częstością 63% dla pętli pierwszej, 29% dla drugiej i 8% dla trzeciej [32].

Na podstawie badań nad grupą homologów ludzkiego białka UBIAD1 u różnych gatunków wyodrębniono w jego strukturze 4 krótkie, wysoko konserwowane w toku ewolucji subdomeny (ryc. 1). Usunięcie którejkolwiek z subdomen całkowicie wyklucza aktywność enzymatyczną białka [16].

Subdomena I odpowiada za rozpoznanie substratu reakcji prenylacji i podlega przestrzennym modyfikacjom po przyłączeniu substratu [16]. Jej sekwencja pokrywa się z przewidywanym centrum aktywnym łączenia liganda w homologicznym, bakteryjnym białku menA. W obrębie tej domeny znajduje się pierwszy motyw bogaty w reszty kwasu asparaginowego (first aspartate-rich motif; FARM) i sekwencja konsensusowa rozpoznawania cholesterolu (cholesterol recognition amino acid consensus; CRAC), wskazujące na biologiczną rolę białka



Ryc. 1. Schemat struktury białka UBIAD. Kolorami oznaczono funkcjonalne motywy warunkujące biologiczną rolę białka UBIAD1 w komórce [10,16,32,33]; czerwone kółka wskazują miejsca występowania wszystkich opisanych dotychczas mutacji zidentyfikowanych u pacjentów z SCD [4,23,32,34]. CA – przewidywane centrum aktywne białka, CRAC – sekwencja konsensusowa rozpoznawania cholesterolu, CXXC – motywy oksydoreduktazy o sekwencji aa: Cys-Xaa-Xaa-Cys, FARM – pierwszy motyw bogaty w reszty kwasu asparaginowego, HRM – motyw regulowany przez hem, RPWS – motywy sekwencji aa: Arg-Pro-Trp-Ser, SI-IV – konserwowane subdomeny (subdomena I, II, III i IV). Wygenerowano w bezpłatnie dostępnym programie TMRPres2D (RefSeq: NP_037451) [44]

UBIAD1 w komórce (ryc. 1) [32]. Uczestniczą one w syntezie steroli, lipidów izoprenoidowych, a także w wiązaniu, składowaniu lub transportowaniu cholesterolu [10,32].

Subdomena II zawiera motyw oksydoreduktazy o sekwencji aa: Cys-Xaa-Xaa-Cys (CXXC) (ryc. 1). Jego obecność wskazuje na możliwy wpływ potencjału redoks w komórce na aktywność białka UBIAD1. Na podobną zależność wskazuje obecność motywu regulowanego przez hem (heme regulatory motif; HRM), którego cząsteczka jest zdolna do naprzemiennych procesów utleniania i redukcji (Fe^{2+} - Fe^{3+}). Motyw HRM występuje na początku sekwencji białka, poza konserwowanym regionem (ryc. 1) [33].

Subdomena III jest ważnym regionem katalitycznym enzymu i regionem podporowym. Subdomena IV jest miejscem wiązania jonu Mg^{2+} , będącego enzymatycznym aktywatorem reakcji prenylacji [10,16].

Lokalizacja białka UBIAD1

Białko UBIAD1 występuje w błonach różnych organelli komórkowych. Prawdopodobnie jego umiejscowienie jest związane ze stanem i rodzajem komórek, w których prowadzi się detekcję. Dotychczas białko UBIAD1 zlokalizowano w:

- retikulum endoplazmatycznym (ER),
- aparacie Golgiego (AG),
- mitochondrium,

a także w obrębie cytoplazmy w pobliżu jądra komórkowego [26]. W ludzkich fibroblastach rogówki – keratocytach, białko UBIAD1 zaobserwowano jedynie w obrębie mitochondriów (tabela 1) [33]. Wykazano także, że UBIAD1 jest białkiem ruchomym i może ulegać delokalizacji w komórce. Prawdopodobnie jest to związane z procesem syntezy i dojrzewania białka, a także, według najnowszych badań, z dynamiką interakcji, jaka zachodzi między białkiem UBIAD1, a białkami uczestniczącymi w metabolizmie cholesterolu.

Białko UBIAD1 powstaje w ER, następnie jest transportowane do AG w kompleksie białek opłaszczających COPII (coat protein complex II) [47]. Dojrzałe białko UBIAD1 może później ulegać cyklicznej translokacji z AG do ER, gdzie przyłącza się do HMGCR – głównego enzymu limitującego w szlaku syntezy cholesterolu. Rozpad kompleksu białek i przemieszczenie UBIAD1 z powrotem do AG jest niezbędne do utrzymania prawidłowej aktywności HMGCR w komórce [38,39].

Składowanie białka w AG jest związane z jego funkcją represorową w stosunku do nadmiernej proliferacji komórek nowotworowych raka pęcherza moczowego i stercza. Na N-końcu białka znajduje się specjalny

Tabela 1. Lokalizacja białka UBIAD1 w różnych typach komórek

Nazwa	Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka	Rodzaj komórek	Ref.
MG63	retikulum endoplazmatyczne	linia komórkowa wyprowadzona z kostniakomięsaka	[30]
HEK293	retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego	linia komórkowa wyprowadzona z embrionalnych komórek nerek	
T24	retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego	linia komórkowa wyprowadzona z raka pęcherza moczowego	[47]
PC3	aparat Golgiego	linia komórkowa wyprowadzona z raka gruczołu krokowego	
L02	aparat Golgiego	immortalizowane embrionalne hepatocyty	
EC	aparat Golgiego	pierwotne komórki śródbłónka naczyń krwionośnych	[29]
HCF	mitochondrium	pierwotne fibroblasty rogówki (keratocyty)	[32]
S2	mitochondrium	linia komórkowa wyprowadzona z zarodków muszki owocowej	[46]

Wszystkie podane rodzaje komórek z wyjątkiem S2 [*Drosophila* sp.] są pochodzenia ludzkiego.

motyw RPWS (sekwencja aa: Arg-Pro-Trp-Ser), tworzący strukturę palca argininowego, który służy jako sygnał do zatrzymania dojrzałego białka w AG (ryc. 1) [47].

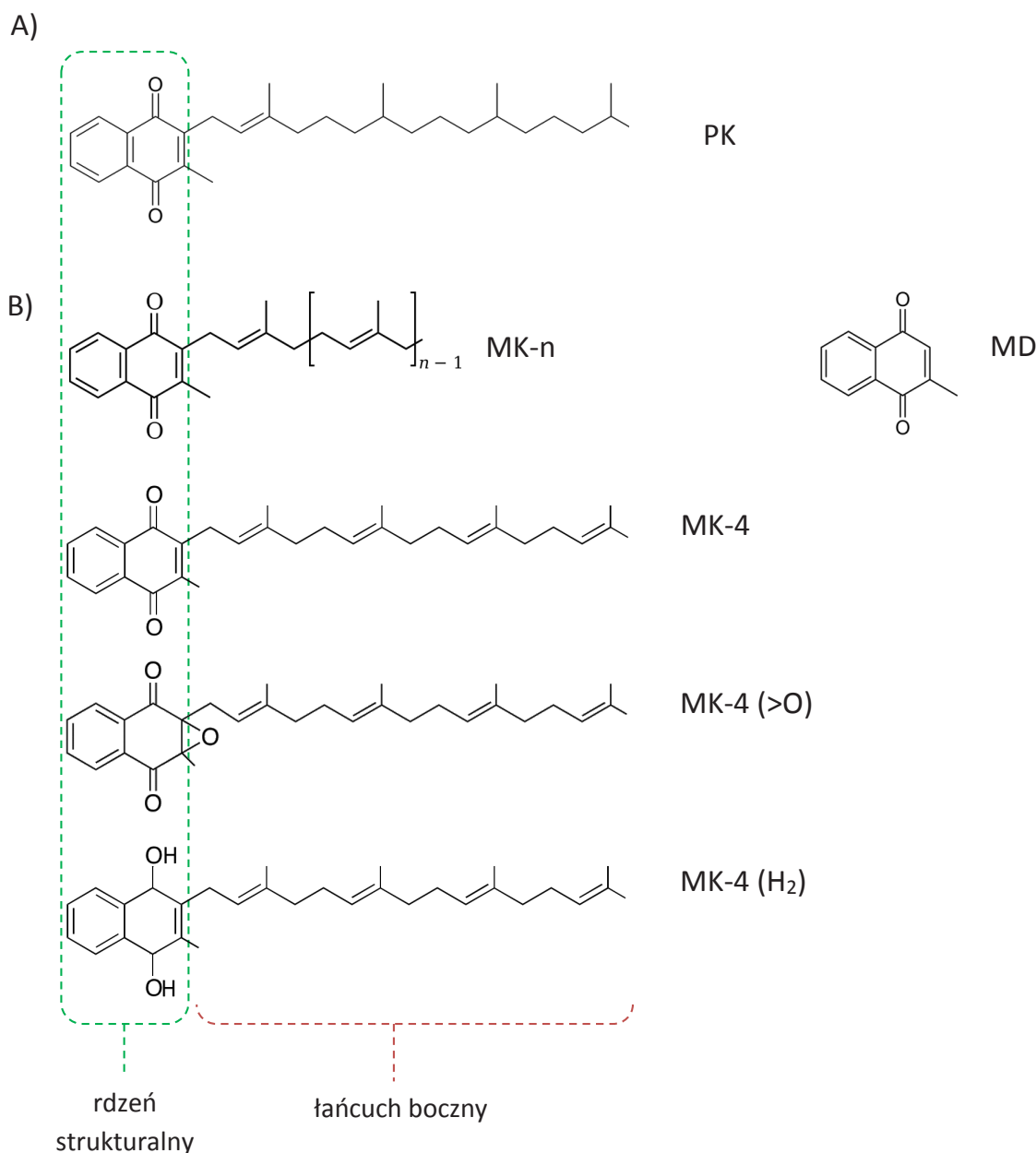
Udowodniono także, że niektóre mutacje białka UBIAD1 mogą się przyczyniać do zatrzymywania go w ER. Może się to wiązać z hamowaniem łączenia uszkodzonego białka UBIAD1 z kompleksem COPII (obserwowano dla mutacji: p.D112A, p.K181A, niezwiązanych z SCD) lub też brakiem możliwości degradacji retikularnego kompleksu UBIAD1:HMGR w przypadku wystąpienia mutacji p.N102S i p.G177E (związanych z SCD) [16,38]. Jednocześnie zaobserwowano, że wystąpienie mutacji p.D112A, p.K181A, p.N102S i p.G177E znacznie hamuje syntezę witaminy K przez białko UBIAD1 [16]. Jest to prawdopodobnie spowodowane brakiem możliwości przyłączania substratów reakcji do zdeformowanego białka UBIAD1. W prawidłowym białku UBIAD1 przyłączanie substratów jest sygnałem do przemieszczenia go do AG, gdzie zachodzi synteza witaminy K (podrozdział „Rola białka UBIAD1 w utrzymaniu homeostazy cholesterolu”) [16,38,39].

Zróznicowane umiejscowienie białka UBIAD1 może być także związane z funkcją pełnioną przez dany typ komórki. Obserwuje się, że komórki eukariotyczne są zdolne do wyspecjalizowania swoich funkcji przez lokowanie białek w różnych organellach [17]. Potwierdzenie takiej hipotezy o umiejscowieniu białka UBIAD1, szczególnie w stosunku do keratocytów, wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań.

FUNKCJE BIAŁKA UBIAD1

Udział białka UBIAD1 w metabolizmie i syntezie witaminy K

Witaminy K należą do grupy witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Różne ich postaci mają różny wkład w ogólną aktywność tej witaminy w ludzkim organizmie i mogą być dostarczane z różnych źródeł. Postacią witaminy K pochodzenia roślinnego jest filochinon (PK, rodzina K₁) (ryc. 2A). Do drugiej grupy zaliczane są witaminy K pochodzenia bakteryjnego i zwierzęcego - mena-



Ryc. 2. Schemat budowy chemicznej wybranych form witaminy K i jej metabolitów. (A) filochinon (rodzina K₁), (B) menachinony (rodzina K₂), GGPP - difosforan geranylogeranylu, MK-n - menachinony o dowolnej długości łańcucha n, MK-4 - menachinon-4, syntetyzowany przez białko UBIAD1, MK-4 (>O) – utleniona (epoksydowa) forma witaminy MK-4, MK-4 (H₂) zredukowana forma witaminy MK-4, MD – menadiol (tzw. witamina K₃)

chinony (MK, rodzina K₂) (ryc. 2B). Wszystkie z nich są pochodnymi 2-metylo-1,4-naftochinonu i zawierają w swojej budowie pierścieniowy układ 1,4-naftochinonu z dołączoną grupą metylową podstawioną w pozycji 2. Związki różnią się między sobą bocznym łańcuchem podstawionym do układu pierścieniowego w pozycji 3. W przypadku PK jest to łańcuch fitylowy, a MK - różna liczba jednostek izoprenowych tworzących jeden łańcuch poliprenyloowy (ryc. 2) [40,41,42]. MK dostępne biologicznie dla człowieka to MK długołańcuchowe, mające

4-12 jednostek izoprenowych w łańcuchu bocznym (MK-4-12) [41].

Głównym źródłem pokarmowym PK są zielone warzywa liściaste i niektóre tłuszcze roślinne, powszechnie obecne w wielu produktach spożywczych [40]. MK są syntetyzowane przez niektóre grupy bakterii beztlenowych, u których spełniają rolę nośnika elektronów w łańcuchu oddechowym. Największą ilość MK w diecie mogą dostarczać wątroby zwierząt i pokarmy przygoto-

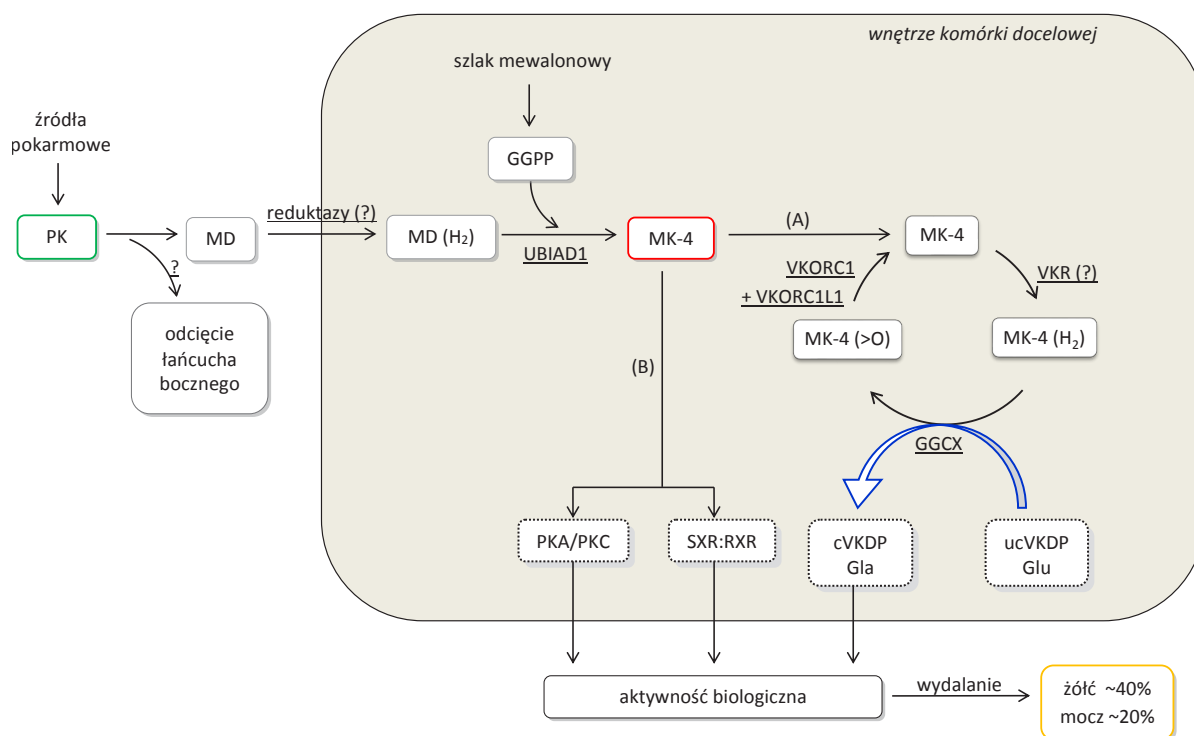
wane z udziałem fermentacji bakteryjnej, takie jak sery (głównie MK-8 i MK-9) i natto – soja poddana procesowi naturalnej fermentacji (MK-7) [42]. Niektóre z bakterii syntetyzujących MK zajmują nisze mikroflory przewodu pokarmowego człowieka i w pewnym stopniu mogą być źródłem witaminy K, lecz ich rola okazuje się mniej ważna niż uznawano dotychczas [40].

Pierwszą poznaną funkcją enzymatyczną białka UBIAD1 jest jego uczestnictwo w syntezie ludzkiej, endogennej witaminy K (MK-4) z PK. Metabolitem pośrednim w tej reakcji jest menadion (witamina K₃, MD), pozbawiony bocznego łańcucha poliprenylowego (ryc. 2) [16]. MK-4 to dominująca postać aktywnej biologicznie witaminy K, występująca powszechnie poza wątrobą, kumulująca się głównie w mózgu, nerkach i trzustce [30]. Jest przede wszystkim ważnym kofaktorem enzymu odpowiadającego za konwersję obecnych w białkach reszt kwasu glutaminowego (Glu) do reszt kwasu γ -karboksylglutaminowego (Gla) – γ -glutamylkarboksylazy (γ -glutamylcarboxylase; GG CX).

Białka podlegające γ -karboksylacji nazywa się białkami zależnymi od witaminy K (vitamin K dependent proteins; VKDP) lub też białkami Gla. Jedyną czynną metabolicznie postacią witaminy MK-4, uczestniczącą

w procesie aktywacji GG CX, jest jej zredukowana postać hydrochinonowa (MK-4 (H₂)). Powstaje w wyniku redukcji MK-4 z udziałem niezidentyfikowanej reduktazy witaminy K (VKR). Po interakcji z GG CX ulega utlenieniu do postaci epoksydowej, po czym jest odnawiana do MK-4 (H₂) z udziałem kompleksu reduktazy epoksydowej postaci witaminy K (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1; VKORC1) i białka podobnego do VKORC1 (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 like 1; VKORC1L1) (ryc. 3). Cykl epoksydowy witaminy K jest zasadniczym mechanizmem pozwalającym na recykling i zachowanie stałej aktywności witaminy K w komórkach, czego następstwem metabolicznym jest utrzymanie odpowiedniego poziomu aktywnych form VKDP (ryc. 3) [36,40,41]. Stopień dekarboksylacji niektórych rodzajów VKDP odzwierciedla wydolność cyklu epoksydowego i jest określany jako krążący biomarker stanu witaminy K w organizmie [25].

Dotąd do grupy VKDP przyporządkowano 16 różnych białek, które uczestniczą w regulacji gospodarki wapniowej organizmu i tym samym wpływają na utrzymanie homeostazy układu kostnego i krwionośnego [21]. Są to m.in. białka układu krzepnięcia, takie jak protrombina, VII i X czynnik krzepnięcia krwi, a także białko Gla macierzy (matrix Gla protein, MGP), białko S, osteokalcyne (bone gamma-carboxyglutamic acid-containing



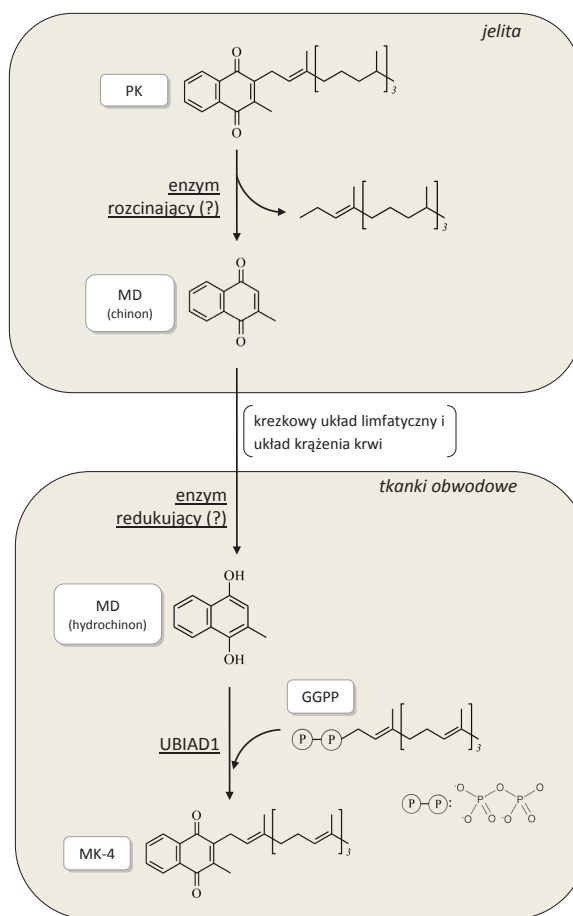
Ryc. 3. Schemat przemian metabolicznych witaminy K w organizmie ssaków. (A) Wejście funkcjonalnej postaci witaminy K2 (MK-4) do cyklu epoksydowego. (B) Inne możliwe oddziaływania witaminy MK-4, wchodzące w skład jej ogólnej aktywności biologicznej w organizmie. MD - menadion, MD (H₂) - hydromenadion, MK-4 - menachinon-4, MK-4 (>O) - epoksydowa forma menachinonu-4, GG CX - γ -glutamylkarboksylaza, VKORC1 - kompleks reduktazy epoksydowej formy witaminy K, VKORC1L1 - kompleks podobny do reduktazy epoksydowej formy witaminy K, ucVKDP Glu - niekarboksylowane białko zależne od witaminy K, cVKDP Gla - karboksylowane białko zależne od witaminy K, SXR:RXR - kompleks receptorów dla steroidów i ksenobiotyków, PKA/PKC - kinazy proteinowe A i C, ? - enzymy dotychczas niezidentyfikowane. Zmodyfikowano na podstawie [36]

protein; BGLAP) i białko zatrzymania wzrostu 6 (growth arrest-specific 6; GAS6) [29,42]. Większość VKDP ma w swojej budowie specjalne domeny białkowe, pozwalające na oddziaływanie z jonami i związkami wapnia [21]. Wykazano zależność między stężeniem wybranych VKDP i ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej serca [8,35].

Dzięki pośredniemu mechanizmowi aktywacji MGP i innych VKDP, jak i bezpośredniemu wpływowi na metabolizm wapnia, MK-4 bierze czynny udział w hamowaniu sztywnienia i wapnienia naczyń krwionośnych – objawów, które są jednymi z etapów rozwoju miażdżycy [1,9,21]. MK-4 hamuje także syntezę prostaglandyny 2 (prostaglandin E2; PGE2), będącej czynnikiem indukującym resorpcję składników mineralnych z udziałem osteoklastów, przyczyniając się do zachowania równowagi mineralnej kości i zmniejszenia objawów osteoporozy. Jednocześnie hamuje proces osteoklastogenezy [41]. Aktywuje także osteokalcynę – niekolagenowe białko, występujące najobficiej w tkance kostnej, gdzie odgrywa rolę w transporcie wapnia i modulacji struktury hydroksyapatytów w mineralnej części kości. MK-4 jest zaangażowana w regulację ekspresji genów kodujących receptory jądrowe steroidów i ksenobiotyków (steroid and xenobiotic receptor; SXR), związanych z metabolizmem steroli (podrozdział „Rola białka UBIAD1 w utrzymaniu homeostazy cholesterolu”) [11]. Ponadto wykazuje inne działania biologiczne przez aktywację kinaz białkowych A i C (protein kinase A/protein kinase C; PKA/PKC) (ryc. 3) [36]. Niedawno odkryto także potencjalną rolę MK-4 w przenoszeniu elektronów w łańcuchu mitochondrialnym podczas syntezy ATP [46].

Synteza aktywnej biologicznie postaci MK-4 z PK nie jest (jak sądzono wcześniej) reakcją jednoetapową. Jest to reakcja złożona o określonej dystrybucji przestrzennej. Zachodzi częściowo w komórkach nabłonkowych jelita i częściowo w obrębie komórek docelowych, w których następuje reakcja prenylacji katalizowana przez białko UBIAD1 (ryc. 4) [17]. Częsteczką bezpośrednio podlegającą prenylacji jest MD, który powstaje z PK w wyniku odcięcia łańcucha fitylowego podczas absorpcji składników pokarmowych w jelicie. UBIAD1 wykazuje wysoką aktywność prenylacyjną wobec MD, a znikomą zdolność odcinania łańcucha od PK. Nie wiadomo dotąd, jaki enzym przeprowadza reakcję odłączania łańcucha fitylowego od PK w enterocytach. Uwolniony MD jest transportowany w postaci niezredukowanej, chinonowej, przez naczynia układu limfatycznego aż do przewodu piersiowego, skąd zostaje uwolniony do krwi i trafia dalej do tkanek docelowych. Tam ulega ostatecznemu zredukowaniu do postaci hydrochinonowej MD (H_2) [17,40] (ryc. 4). Mechanizm redukcji postaci chinonowej do hydrochinonu nie jest jeszcze poznany, wiadomo jednak, że prenylacji z udziałem białka UBIAD1 może ulec jedynie zredukowana postać cząsteczki – MD (H_2) [16].

Enzymatyczna rola białka UBIAD1 polega na odłączaniu łańcuchów poliprenylowych od substratów i przenoszeniu ich na cząsteczki akceptorowe. Grupę takich substra-



Ryc. 4. Schemat syntezy aktywnej biologicznie formy menachinonu-4 (MK-4) z filochinonu (PK) w reakcji prenylacji przeprowadzanej przez białko UBIAD1. MD - menaden, GGPP - difosforan geranylogeranylu, ? - enzymy dotychczas niezidentyfikowane. Zmodyfikowano na podstawie [17]

tów tworzą niesteroidowe związki powstałe w szlaku miewalonowym. Gdy produktem reakcji jest MK-4, donorem łańcucha jest cząsteczka difosforanu geranylogeranylu (GGPP). Jednak białko może katalizować prenylację MD z wykorzystaniem innych substratów, takich jak difosforan geranylu (GPP) i difosforan farnezyli (FPP), w wyniku której powstają odpowiednio formy MK-2 i MK-3 (ryc. 5) [16]. Tak jak w przypadku innych prenylotransferaz, aktywność białka UBIAD1 warunkuje obecność jonów Mg^{2+} . Spełniają one funkcję łącznikową i stymulują powstanie wiązania między substratem łańcuchowym (GGPP, GPP, FPP), a substratem właściwym (MD). Powinowactwo enzymu do danego substratu izoprenowego i tym samym synteza danej postaci MK może być warunkowana stężeniem dostępnych jonów Mg^{2+} . UBIAD1 jest jedynym znanym białkiem w organizmie człowieka przeprowadzającym omówione wyżej reakcje.

Wystąpienie mutacji związanych z SCD istotnie zmniejsza poziom syntezy witaminy K przez białko UBIAD1. Mutacje o największej częstości występowania: p.D112N, p.N102S, p.G177E, p.G177R, zmniejszają poziom syntezy MK-4 przez białko UBIAD1 odpowiednio o 6, 22, 30

i 39% [32]. Mutacje p.N102S, p.D112G, p.R119G, p.T175I, p.N232S całkowicie wykluczają przyłączanie GPP jako substratu łańcuchowego i blokują wytwarzanie postaci MK-3 [16].

Aminokwasy, które ulegają podstawieniu w SCD, zdają się warunkować utrzymanie różnych, głównych funkcji enzymatycznych białka UBIAD1 [16,18]. Aminokwas G177 jest umiejscowiony w pobliżu przewidywanego miejsca aktywnego. Dla zmiany p.G177E stwierdzono występowanie przestrzennych perturbacji w ułożeniu transbłonowych helis i utratę wiązań wodorowych w strukturze białka. Powoduje to powstanie zbyt dużej odległości między substratami (GGPP, a MD) do zajścia reakcji prenylacji [32]. Aminokwas N102 występujący w konserwowanej subdomenie I, jest istotnym miejscem przyłączania jonów magnezu i łańcucha poliprenylowego [18]. Jest to zgodne z obserwacją, że zmiana p.N102S znacznie zmniejsza powinowactwo białka do wszystkich rodzajów substratów łańcuchowych. D112 i R119 są głównymi aminokwasami powiązanymi ze zmianami strukturalnymi zachodzącymi w białku podczas przyłączania substratów. Aminokwas T175 występuje w silnie polarnym obszarze białka uważanym za centrum katalityczne enzymu. Zmiany w ich obrębie znacznie ograniczają wytwarzanie MK-4 [16].

Mimo znajomości podstawowych funkcji witaminy K na poziomie tkankowym i komórkowym, nieznany jest dokładny związek między jej syntezą, a występowaniem objawów charakterystycznych dla SCD. Brak objawów ogólnoustrojowych, będących skutkiem obniżonego stężenia witaminy K w organizmie, wskazuje na istnienie swoistego tkankowo mechanizmu charakterystycznego dla rogówki. Może być on związany ze specyfiką metabolizmu keratocytów i wyjątkowymi warunkami panującymi w rogówce, takimi jak brak ukrwienia, odżywianie z płynu łzowego i z cieczy wodnistej przedniej komory oka [5]. Sugerowałoby to istotną rolę syntetyzowanej *de novo* postaci MK-4, której wytwarzanie jest zaburzone, gdy występują mutacje genu *UBIAD1* związane z SCD. Kiedy w innych tkankach funkcje (np. kofaktorowe) rekompensowałyby inne postaci witaminy K (PK, inne menachinony, np. MK-7), zjawisko takie nie byłoby możliwe w rogówce, przez brak dostarczania witamin z krwią lub limfą. Może być to powodem, dla którego upośledzenie funkcji białka UBIAD1 jest dla rogówki tak dotkliwe w skutku. Aktualne badania poruszają istotny problem potencjalnego wpływu poziomu witaminy K na metabolizm cholesterolu, jako możliwego czynnika mającego udział w chorobie [10-12,24,32,38,39].

Rola białka UBIAD1 w utrzymaniu homeostazy cholesterolu

Jedną z najintensywniej badanych właściwości białka UBIAD1 jest jego potencjalny udział w utrzymaniu homeostazy cholesterolu w komórce. W badaniach na liniach komórkowych (m.in. HEK293T [32], TCC [10,27]) wykazano oddziaływanie białka UBIAD1 z innymi biał-

kami i cząsteczkami uczestniczącymi w transporcie, odkładaniu i metabolizowaniu cholesterolu. Do najważniejszych z nich należą: apoE, SOAT1 i HMGCR [10,27,32].

Apolipoproteina E jest obecna w osoczowych lipoproteinach transportujących cholesterol pochodzenia wątrobowego i pokarmowego. Przez oddziaływanie z białkami regulatorowymi, takimi jak CERP (cholesterol efflux regulatory protein) może stymulować wypływ cholesterolu z komórki [14]. Udowodniono również jej bezpośrednią rolę jako naczyniowo-limfatycznego transportera PK, MK-7 i triglicerydów, które oddziałują z białkiem UBIAD1 [40,41].

Białko SOAT1 przeprowadza reakcję estryfikacji cholesterolu w komórkach, co zwiększa możliwość jego ekstrakcji przez aktywność mikrosomalnego białka transportującego triglicerydy (microsomal triglyceride transfer protein; MTP). MTP uczestniczy w tworzeniu lipoprotein zawierających apolipoproteinę B (apoB), które transportują cholesterol z wnętrza komórek do przestrzeni międzykomórkowej [19].

Reduktaza HMGC jest enzymem limitującym efektywność przemian w szlaku kwasu mewalonowego, w którym powstaje cholesterol i inne steroidy. Interakcja białek zachodzi między domeną prenylotransferazową białka UBIAD1, a domeną rozpoznającą sterole w HMGCR (sterol-sensing domain; SSD). Wykazano kolo-kalizację tych białek w komórce [32].

Przypuszcza się, że HMGCR, SOAT1 i apoE mogą tworzyć z UBIAD1 kompleks białkowy, w którym białka regulują swoją funkcję, strukturę i zdolność do wchodzenia w reakcje za pomocą oddziaływań fizycznych [32]. Powstanie kompleksu może warunkować zajście potranslacyjnych modyfikacji poszczególnych podjednostek, zwiększać wydajność enzymatyczną przez sąsiedowanie enzymów i kumulację substratów reakcji bądź wzajemne regulowanie aktywności białek z udziałem produktów i substratów ich reakcji [7,32]. Zmutowane podjednostki UBIAD1 mogą zaburzać działanie hipotetycznego kompleksu białkowego tworzonego z HMGCR, SOAT1 i apoE nawet w obecności jednostek prawidłowych, co może tłumaczyć dominujący charakter dziedziczenia choroby [32].

HMGCR przeprowadza reakcję konwersji 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMGCoA) do cząsteczki kwasu mewalonowego w szlaku, w którym powstaje cholesterol i inne izoprenoidy. Właściwy poziom cholesterolu w komórce jest kontrolowany na zasadzie pętli zwrotnej; metabolity pośrednie i produkty powstające w szlaku stymulują degradację proteolityczną HMGCR w ER (ER-associated degradation; ERAD) i limitują prędkość zachodzących przemian. Do cząsteczek promujących ERAD należą sterole (w tym głównie sam cholesterol) oraz niesterolowe metabolity pośrednie szlaku, tj. geranylogeraniol (GGOH), który ulega fosforylacji do GGPP. Sterole stymulują ERAD w sposób

bezpośredni – ich nagromadzenie w komórce skutkuje przyłączeniem HMGCR do białek indukujących kaskadę reakcji, która prowadzi do jej ubiquitynacji i ostatecznej proteolizy w proteasomie. Jednak ERAD okazuje się być także regulowana pośrednio przez oddziaływanie białka UBIAD1 z HMGCR (ryc. 6). UBIAD1 przyłącza się do HMGCR i chroni reduktazę przed łączeniem z białkami, które inicjują ERAD. GGPP pełni w tym mechanizmie rolę regulatorową – odłącza białko UBIAD1 od HMGCR i jest niezbędny do całkowitej degradacji reduktazy (ryc. 6). Przy braku białka UBIAD1, reduktaza HMGC może być degradowana bez udziału GGPP w sposób regulowany przez sterole [39].

Mechanizm równowagi, który tworzą oddziaływania między UBIAD1 i GGPP, może być konieczny do zachowania odpowiedniego poziomu syntezy niesterolowych izoprenoidów przy jednoczesnym uniknięciu wysokiego stężenia cholesterolu w komórce. Ubiquitynacja i proteoliza cząsteczek HMGCR hamuje wytwarzanie kwasu mewalonowego i produktu końcowego – cholesterolu, ale także istotnych biologicznie niesterolowych metabolitów pośrednich szlaku. Przyłączenie UBIAD1 do HMGCR uniemożliwia całkowitą supresję reduktazy, zachowując jej częściową aktywność, przez co utrzymuje podstawowy poziom stężenia kwasu mewalonowego. Jest on wtedy promowany głównie do wytwarzania niesterolowych izoprenoidów, takich jak np. GGOH i GGPP. Gdy osiągną optymalne stężenie w cytosolu, przyłączają się do UBIAD1 i umożliwiają jego odłączenie od HMGCR i translokację z ER na AG. Reduktaza jest wtedy niezwłocznie przeznaczana do zależnej od steroli ERAD [38].

Jest możliwe, że odłączenie i translokacja białka UBIAD1 z ER do AG są niezbędne do zachowania fizjologicznego poziomu aktywności białka, czyli optymalnego poziomu syntezy MK-4 i 3-poliprenylo-4-hydroksy benzoesanu (PPHB) – metabolitu pośredniego w szlaku syntezy CoQ10, w AG (ryc. 6) [38].

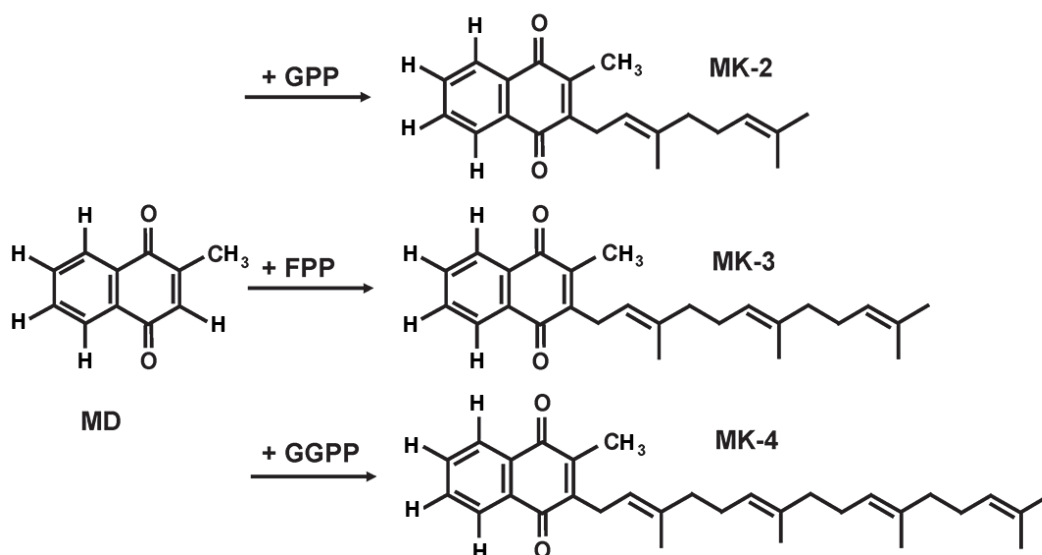
Badania dowodzą, że deformacje białka UBIAD1 spowodowane wystąpieniem mutacji związanych z SCD (p.N102S i p.G177R) powodują przyłączanie się UBIAD1 do HMGCR nawet w obecności GGOH/GGPP. Uniemożliwia to zależną od GGOH/GGPP degradację reduktazy HMGC, co skutkuje utrzymaniem ciągłej syntezy cholesterolu, mimo jego wzrastającego stężenia [38]. Ponadto mutacje p.N102S i p.G177R uniemożliwiają dyslokację białka UBIAD1 z ER do AG. Występowanie tych mutacji już wcześniej powiązано ze spadkiem aktywności enzymatycznej białka UBIAD1 [16,18,32]. Jeśli synteza MK-4 jest ograniczona głównie do czasu, gdy białko UBIAD1 znajduje się w obrębie AG, wydaje się logicznym, że jego zablokowanie w obrębie ER będzie skutkowało zmniejszeniem poziomu wytwarzania tej witaminy. Dodatkowo, mutacje wpływają negatywnie na powinowactwo białka do łańcuchowych substratów izoprenowych [16,38]. Tym samym mniejsze jest prawdopodobieństwo zajścia prawidłowej, indukowanej GGPP dyslokacji białka UBIAD1

z ER do AG. Bioinformatyczna symulacja dokowania substratów wykazała, że miejsce wiązania GGPP w białku UBIAD1 ma wysokie powinowactwo do cząsteczki cholesterolu. Może to świadczyć o istnieniu konkurencji między substratami przy zwiększonych stężeniach cholesterolu i blokowaniu miejsca aktywnego białka oraz hamowaniu translokacji białka UBIAD1 z ER do AG [32,38]. Powyższy zespół zjawisk może doprowadzić do nadmiernego wytwarzania cholesterolu w komórkach i być powiązany z gromadzeniem jego złogów w rogówce, cechy charakterystycznej dla fenotypu SCD.

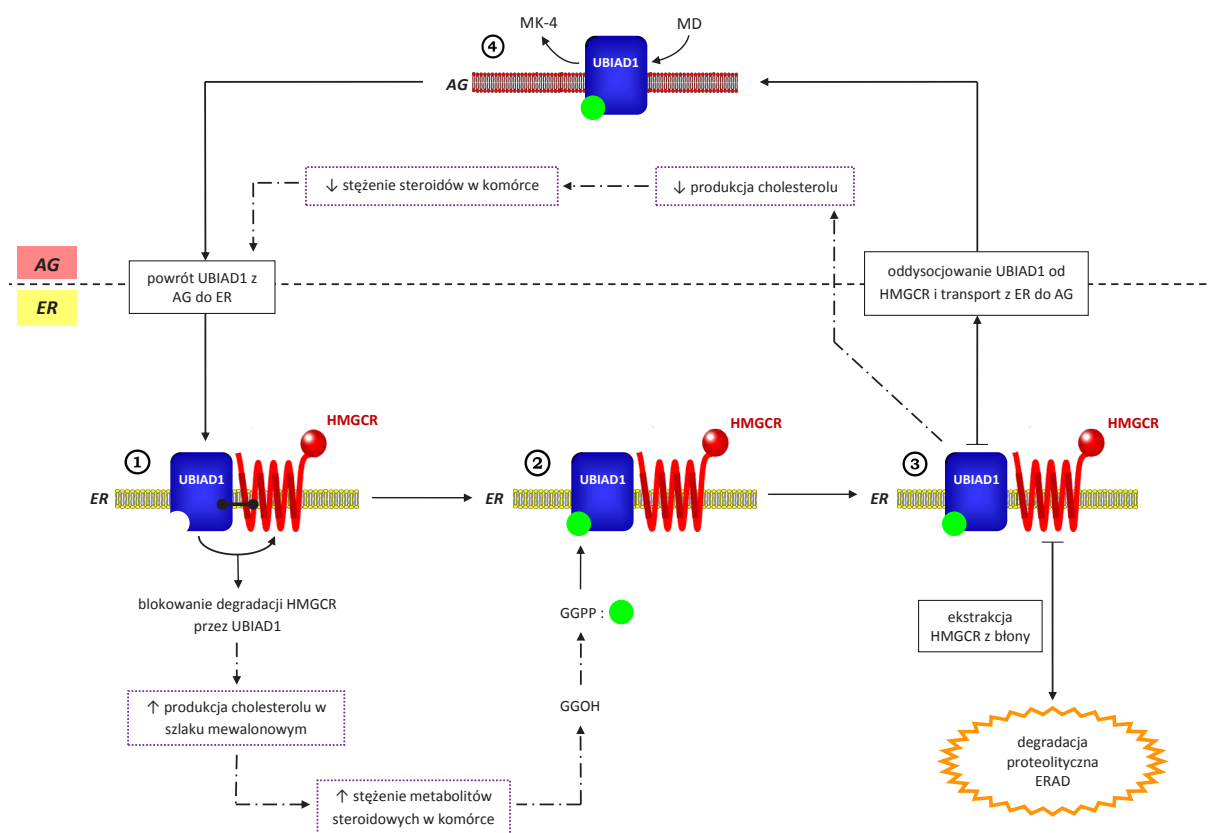
Regulacja stężenia cholesterolu w komórce związana z aktywnością białka UBIAD1 może się także odbywać za pośrednictwem produktu przeprowadzanej przez niego reakcji enzymatycznej. MK-4 jest endogennym ligandem i aktywatorem receptorów jądrowych SXR i receptora wątrobowego X (liver X receptor; LXR), które są odpowiedzialne m.in. za stymulację puli genów metabolizmu lipidów i cholesterolu (ryc. 3) [11,12]. Aktywacja odbywa się przez przyłączanie białkowych heterodimerów zawierających SXR oraz receptor retinoidowy X (retinoid X receptor; RXR) do swoistych sekwencji DNA i aktywację transkrypcji wielu genów. W komórkach o zaburzonej metabolizmie i podwyższonym poziomie cholesterolu, ekspresja genów docelowych dla SXR jest obniżona. Ekspresja puli genów dla białek enzymatycznych zaangażowanych w syntezę cholesterolu jest za to podwyższona. Produkty genów docelowych dla SXR mogą być zaangażowane np. w hydroksylację cholesterolu i jego wyrzut z komórki, czy też w tworzenie białek transportowych i wyrzut cholesterolu (m.in. apoE). Obserwuje się także spadek ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów i kwasów tłuszczowych [12]. Jednocześnie ekspresja zespołu tych genów ulega znacznemu podwyższeniu i kompensacji w wypadku poddania komórek działaniu 1,25-hydroksy-MD. Przywrócenie właściwego poziomu ekspresji genu *UBIAD1/TERE1* w komórkach raka stercza powoduje także podniesienie ekspresji mRNA dla receptorów SXR [11].

Inne funkcje białka UBIAD1 w komórce

Białko UBIAD1 uczestniczy w syntezie pozamitochondrialnego CoQ10, który jest mobilnym nośnikiem elektronów w systemie błon AG i w błonie plazmatycznej [29]. Reakcja polega na przeniesieniu łańcucha z cząsteczki poliprenylo-PP, pochodzącego ze szlaku przemian kwasu mewalonowego, na cząsteczkę kwasu 4-hydroksy-benzoowego, pochodzącego z metabolizmu tyrozyny [22]. CoQ10 jest jedynym lipofilnym, syntetyzowanym endogennie przeciwutleniaczem i pełni ważną rolę antyoksydacyjną w homeostazie naczyń krwionośnych. Główne białka enzymatyczne odpowiedzialne za wytwarzanie ROS w tkankach układu sercowo-naczyniowego to oksydazy NADPH i śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (endothelial nitric oxide synthase; eNOS) [3]. CoQ10 działa hamująco na aktywność eNOS w śródbłonku. Białko UBIAD1 poprzez syntezę pozamitochondrialnego CoQ10 bierze udział w przeciwdziałaniu



Ryc. 5. Schemat produktów otrzymywanych w reakcji prenylacji katalizowanej przez białko UBIAD1 w zależności od użytego substratu. GPP - difosforan geranylu, FPP - difosforan farnezyli, GGPP - difosforan geranylogeranylu, MD - menadion, MK - menachinon (witamina K). Zmodyfikowano na podstawie [16]



Ryc. 6. Schemat prawdopodobnego mechanizmu regulacji stężenia cholesterolu w komórce z udziałem prawidłowych białek UBIAD1 i HMGCR w ER i AG. (1) Utworzenie kompleksu UBIAD1:HMGCR uniemożliwia degradację reduktazy, doprowadzając do wzrostu stężenia cholesterolu i metabolitów steroidowych. (2) UBIAD1 jest odłączany od HMGCR na zasadzie zwrotnego sprzężenia reakcji - przez oddziaływanie z pośrednimi produktami szlaku miewalonowego, takimi jak GGPP. (3) Połączenie białka UBIAD1 z GGPP skutkuje jego translokacją na teren AG w systemie białek oplaszczających COPII oraz przeznaczeniem HMGCR do degradacji w proteasomie; ERAD - powiązana z ER degradacja zależna od steroli. (4) Synteza MK-4 z udziałem przyłączonego GGPP (jako substratu) jest prawdopodobnie przeprowadzana przez białko UBIAD1 na terenie AG. Szlak sygnałowy, który stymulowałby przemieszczenie białka UBIAD1 z powrotem na teren ER nie jest znany. Zmodyfikowano na podstawie [38]

niu nadmiernemu generowaniu ROS odpowiedzialnych za uszkodzenia i stres oksydacyjny komórek śródbłónka (m.in. peroksydację lipidów, nitrozyzację białek, oksydację kwasów nukleinowych) [29]. Dodatkowo przez syntezę witaminy K reguluje także przeżywalność komórek śródbłónka i proces formowania naczyń [15].

Mutacja typu *reddish*⁵⁵⁸⁷ (*reh*) w genie *ubiad1* u danio przegowanego prowadzi do obrzęku serca, wylewów wewnątrzczaszkowych i degeneracji naczyń krwionośnych, co wiąże się z obumieraniem komórek śródbłónka. Traktowanie zmutowanego zarodka witaminą K odwraca charakterystyczne dla niego zmiany fenotypowe związane z degeneracją naczyń krwionośnych i sercowo-naczyniowym stresem oksydacyjnym. Nie dotyczy to jednak pozostałych zmian zachodzących w sercu. Wskazuje to na ważną rolę syntetyzowanej przez UBIAD1 witaminy K w utrzymaniu naczyniowej homeostazy. Wyciszenie ekspresji genu *ubiad1* w zarodkach danio przegowanego znacznie obniżyło poziom pozamitochondrialnego CoQ10 i doprowadziło do zależnej od ROS peroksydacji lipidów w śródbłónku naczyń krwionośnych [15].

W doświadczeniu prowadzonym na ludzkich komórkach śródbłónka (endothelial cells; EC) badano możliwy wpływ mutacji związanych z SCD na syntezę CoQ10. Linie komórkową ludzkich EC transfekowano wektorami ekspresyjnymi, zawierającymi zmutowaną sekwencję genu *UBIAD1* ze zmianami p.N102S lub p.D122G. EC, w których ekspresji ulegały białka zmutowane, wykazywały wyższy poziom syntezy CoQ10, niż EC z prawidłowym wariantem białka UBIAD1. Ponadto mutacje związane z SCD nie zaburzały poziomu syntezy cholesterolu w ludzkich liniach komórkowych EC. W związku z tym sugeruje się brak związku syntezy CoQ10 z fenotypem charakterystycznym dla SCD [29].

Białko homologiczne dla UBIAD1 u *Drosophila*, czyli białko Heix, okazuje się modulatorem genu *Pink1*. Mutacje w genie *PINK1* (PTEN-induced putative kinase 1), który koduje konserwowaną ewolucyjnie kinazę mitochondrialną, są związane z występowaniem choroby Parkinsona u ludzi. Ponadto mutacje w genach homologicznych

dla *PINK1* powodują defekty funkcji mitochondrialnych w organizmach modelowych. Zmiany w sekwencji *Pink1* u *Drosophila* sp. zaburzają transport elektronów w łańcuchu mitochondrialnym, czego skutkiem jest zmniejszone wytwarzanie ATP. Jednak dysfunkcje mitochondriów wywołane mutacjami w genie *heix* mogą być zrekompen-sowane przez witaminę K₂, która działa jako przenośnik elektronów i przywraca prawidłowe wytwarzanie ATP w mitochondriach u *Drosophila* [46]. W analizie próbek pobranych z rogówek pacjentów z SCD w mikroskopie elektronowym obserwowano występowanie torbielowatego obrzęknięcia mitochondriów w komórkach nabłonka przedniego. Wskazywało to na występowanie nieprawidłowości w funkcjach mitochondriów w SCD, co może być związane z zaburzeniami w wytwarzaniu witaminy K przez zmutowane białko UBIAD1 [13,46]. Dokładny związek i mechanizm udziału witaminy K w funkcjach mitochondrialnych u ludzi nie został jednak zbadany.

PODSUMOWANIE

Historia badań nad funkcjami genu *UBIAD1* i białka UBIAD1 jest stosunkowo krótka. Wiadomo, że UBIAD1 jest enzymem wielofunkcyjnym, podlegającym redystrybucji w komórce, którego uszkodzenie znacząco wpływa na zdrowie człowieka. Badania podłoża genetycznego SCD doprowadziły nie tylko do odkrycia mutacji genu *UBIAD1*. Dalsze prace nad patogenezą choroby wykazały znaczenie tego genu dla całego organizmu. Powiązanie metabolizmu witaminy K z metabolizmem cholesterolu może dać wgląd w patomechanizm innych chorób, więc badania nad SCD mogą być istotne nie tylko w okulistyce. Obecnie największym wyzwaniem dla naukowców jest zbadanie przyczyny tkankowej swoistości objawów, które towarzyszą mutacjom genu *UBIAD1* w SCD, ograniczonych do odkładania heterogennych złogów cholesterolu i lipidów w rogówce. Istotnym odkryciem wydaje się potwierdzenie udziału białka UBIAD1 w regulacji degradacji HMGCR w szlaku syntezy cholesterolu oraz zaobserwowanie możliwości witaminy K na wpływanie na komórkowy poziom cholesterolu. Następnym krokiem powinno być także poznanie dokładnego udziału białka UBIAD1 w patofizjologii pozostałych chorób powiązanych dotychczas z jego dysfunkcją.

PÍSMIENICTWO

[1] Ahmadieh H., Arabi A.: Vitamins and bone health: beyond calcium and vitamin D. *Nutr. Rev.*, 2011; 69: 584-598

[2] Antonicka H., Leary S.C., Guercin G.H., Agar J.N., Horvath R., Kennaway N.G., Harding C.O., Jaksch M., Shoubridge E.A.: Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, 2003; 12: 2693-2702

[3] Browning E.A., Chatterjee S., Fisher A.B.: Stop the flow. A paradigm for cell signaling mediated by reactive oxygen species in the pulmonary endothelium. *Annu. Rev. Physiol.*, 2012; 74: 403-424

[4] Chae H., Kim M., Kim Y., Kim J., Kwon A., Choi H., Park J., Jang W., Lee Y.S., Park S.H., Kim M.S.: Mutational spectrum of Korean patients with corneal dystrophy. *Clin. Genet.*, 2016; 89: 678-689

[5] Collin H.B., Collin S.P.: The corneal surface of aquatic vertebrates: microstructures with optical and nutritional function? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2000; 355: 1171-1176

[6] HUGO Gene Nomenclature Committee. http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:30791 (14.12.2016)

[7] Conrado R.J., Varner J.D., DeLisa M.P.: Engineering the spatial organization of metabolic enzymes: mimicking nature's synergy.

Curr. Opin. Biotechnol., 2008; 19: 492-499

- [8] Danziger J., Young R.L., Shea M.K., Tracy R.P., Ix J.H., Jenny N.S., Mukamal K.J.: Vitamin K-dependent protein activity and incident ischemic cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2016; 36: 1037-1042
- [9] El Asmar M.S., Naoum J.J., Arbid E.J.: Vitamin K dependent proteins and the role of vitamin K2 in the modulation of vascular calcification. A review. *Oman Med. J.*, 2014; 29: 172-177
- [10] Fredericks W.J., McGarvey T., Wang H., Lal P., Puthiyaveetil R., Tomaszewski J., Sepulveda J., Labelle E., Weiss J.S., Nickerson M.L., Kruth H.S., Brandt W., Wessjohann L.A., Malkowicz S.B.: The bladder tumor suppressor protein TERE1 (UBIAD1) modulates cell cholesterol. Implications for tumor progression. *DNA Cell Biol.*, 2011; 30: 851-864
- [11] Fredericks W.J., Sepulveda J., Lai P., Tomaszewski J.E., Lin M.F., McGarvey T., Rauscher F.J.3rd, Malkowicz S.B.: The tumor suppressor TERE1 (UBIAD1) prenyltransferase regulates the elevated cholesterol phenotype in castration resistant prostate cancer by controlling a program of ligand dependent SXR target genes. *Oncotarget*, 2013; 4: 1075-1092
- [12] Fredericks W.J., Yin H., Lal P., Puthiyaveetil R., Malkowicz S.B., Fredericks N.J., Tomaszewski J., Rauscher F.J.3rd, Malkowicz S.B.: Ectopic expression of the TERE1 (UBIAD1) protein inhibits growth of renal clear cell carcinoma cells. Altered metabolic phenotype associated with reactive oxygen species, nitric oxide and SXR target genes involved in cholesterol and lipid metabolism. *Int. J. Oncol.*, 2013; 43: 638-652
- [13] Garner A., Tripathi R.C.: Hereditary crystalline stromal dystrophy of Schnyder. II. Histopathology and ultrastructure. *Br. J. Ophthalmol.*, 1972; 56: 400-408
- [14] Getz G.S., Reardon C.A.: Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.*, 2009; 50 (Suppl.1): S156-S161
- [15] Hegarty J.M., Yang H., Chi N.C.: UBIAD1-mediated vitamin K2 synthesis is required for vascular endothelial cell survival and development. *Development*, 2013; 140: 1713-1719
- [16] Hirota Y., Nakagawa K., Sawada N., Okuda N., Suhara Y., Uchino Y., Kimoto T., Funahashi N., Kamao M., Tsugawa N., Okano T.: Functional characterization of the vitamin K₂ biosynthetic enzyme UBIAD1. *PLoS One*, 2015; 10: e0125737
- [17] Hirota Y., Tsugawa N., Nakagawa K., Suhara Y., Tanaka K., Uchino Y., Takeuchi A., Sawada N., Kamao M., Wada A., Okitsu T., Okano T.: Menadiolone (vitamin K₂) is a catabolic product of oral phyloquinone (vitamin K₁) in the intestine and a circulating precursor of tissue menaquinone-4 (vitamin K₂) in rats. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 33071-33080
- [18] Huang H., Levin E.J., Liu S., Bai Y., Lockless S.W., Zhou M.: Structure of a membrane-embedded prenyltransferase homologous to UBIAD1. *PLoS Biol.*, 2014; 12: e1001911
- [19] Hussain M.M., Rava P., Walsh M., Rana M., Iqbal J.: Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr. Metab.*, 2012; 9: 14
- [20] Jakobs B.S., van den Heuvel L.P., Smeets R.J., de Vries M.C., Hien S., Schaible T., Smeitink J.A., Wevers R.A., Wortmann S.B., Rodenburg R.J.: A novel mutation in COQ2 leading to fatal infantile multisystem disease. *J. Neurol. Sci.*, 2013; 326: 24-28
- [21] Lanham S., Cagampang F.R., Oreffo R.O.: Maternal high fat diet affects offspring's vitamin K-dependent proteins expression levels. *PLoS One*, 2015; 10: e0138730
- [22] Li W.: Bringing bioactive compounds into membranes. The UbiA superfamily of intramembrane aromatic prenyltransferases. *Trends Biochem. Sci.*, 2016; 41: 356-370
- [23] Lin B.R., Frausto R.F., Vo R.C., Chiu S.Y., Chen J.L., Aldave A.J.: Identification of the first *de novo* UBIAD1 gene mutation associated with Schnyder corneal dystrophy. *J. Ophthalmol.*, 2016; 2016: 1968493
- [24] Liu S., Guo W., Han X., Dai W., Diao Z., Liu W.: Role of UBIAD1 in intracellular cholesterol metabolism and vascular cell calcification. *PLoS One*, 2016; 11: e0149639
- [25] Mayer O.Jr., Seidlerová J., Wohlfahrt P., Filipovský J., Vaněk J., Cífková R., Windrichová J., Topolčan O., Knapen M.H., Drummen N.E., Vermeer C.: Desphospho-uncarboxylated matrix Gla protein is associated with increased aortic stiffness in a general population. *J. Hum. Hypertens.*, 2016; 30: 418-423
- [26] McGarvey T.W., Nguyen T., Tomaszewski J.E., Monson F.C., Malkowicz S.B.: Isolation and characterization of the TERE1 gene, a gene down-regulated in transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene*, 2001; 20: 1042-1051
- [27] McGarvey T.W., Nguyen T.B., Malkowicz S.B.: An interaction between apolipoprotein E and TERE1 with a possible association with bladder tumor formation. *J. Cell. Biochem.*, 2005; 95: 419-428
- [28] Mollet J., Giurgea I., Schlemmer D., Dallner G., Chretien D., Delahodde A., Bacq D., de Lonlay P., Munnich A., Rötig A.: Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 765-772
- [29] Mugoni V., Postel R., Catanzaro V., De Luca E., Turco E., Digilio G., Silengo L., Murphy M.P., Medana C., Stainier D.Y., Bakkers J., Santoro M.M.: Ubiad1 is an antioxidant enzyme that regulates eNOS activity by CoQ10 synthesis. *Cell*, 2013; 152: 504-518
- [30] Nakagawa K., Hirota Y., Sawada N., Yuge N., Watanabe M., Uchino Y., Okuda N., Shimomura Y., Suhara Y., Okano T.: Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*, 2010; 468: 117-121
- [31] Nakagawa K., Sawada N., Hirota Y., Uchino Y., Suhara Y., Hasegawa T., Amizuka N., Okamoto T., Tsugawa N., Kamao M., Funahashi N., Okano T.: Vitamin K₂ biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. *PLoS One*, 2014; 9: e104078
- [32] Nickerson M.L., Bosley A.D., Weiss J.S., Kostih B.N., Hirota Y., Brandt W., Esposito D., Kinoshita S., Wessjohann L., Morham S.G., Andresson T., Kruth H.S., Okano T., Dean M.: The UBIAD1 prenyltransferase links menaquinone-4 synthesis to cholesterol metabolic enzymes. *Hum. Mutat.*, 2013; 34: 317-329
- [33] Nickerson M.L., Kostih B.N., Brandt W., Fredericks W., Xu K.P., Yu F.S., Gold B., Chodosh J., Goldberg M., Lu D.W., Yamada M., Tervo T.M., Grutzmacher R., Croasdale C., Hoeltzenbein M. i wsp.: UBIAD1 mutation alters a mitochondrial prenyltransferase to cause Schnyder corneal dystrophy. *PLoS One*, 2010; 5: e10760
- [34] Nowinska A.K., Wylegala E., Teper S., Lyssek-Boron A., Aragona P., Roszkowska A.M., Micali A., Pisani A., Puzzolo D.: Phenotype-genotype correlation in patients with Schnyder corneal dystrophy. *Cornea*, 2014; 33: 497-503
- [35] O'Donnell C.J., Shea M.K., Price P.A., Gagnon D.R., Wilson P.W., Larson M.G., Kiel D.P., Hoffmann U., Ferencik M., Clouse M.E., Williamson M.K., Cupples L.A., Dawson-Hughes B., Booth S.L.: Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 2769-2774
- [36] Okano T.: A new horizon in vitamin K research. *Yakugaku Zasshi*, 2016; 136: 1141-1159
- [37] Orr A., Dubé M.P., Marcadier J., Jiang H., Federico A., George S., Seamone C., Andrews D., Dubord P., Holland S., Provost S., Mongrain V., Evans S., Higgins B., Bowman S. i wsp.: Mutations in the UBIAD1 gene, encoding a potential prenyltransferase, are causal for Schnyder crystalline corneal dystrophy. *PLoS One*, 2007; 2: e685
- [38] Schumacher M.M., Elsabrouty R., Seemann J., Jo Y., DeBose-Boyd R.A.: The prenyltransferase UBIAD1 is the target of geranylgeraniol in degradation of HMG CoA reductase. *Elife*, 2015; 4: e05560
- [39] Schumacher M.M., Jun D.J., Jo Y., Seemann J., DeBose-Boyd R.A.: Geranylgeranyl-regulated transport of the prenyltransferase

UBIAD1 between membranes of the ER and Golgi. *J. Lipid Res.*, 2016; 57: 1286-1299

[40] Shearer M.J., Fu X., Booth S.L.: Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements. Current concepts and future research. *Adv. Nutr.*, 2012; 3: 182-195

[41] Shearer M.J., Newman P.: Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb. Haemost.*, 2008; 100: 530-547

[42] Shearer M.J., Newman P.: Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *J. Lipid Res.*, 2014; 55: 345-362

[43] Shearman A.M., Hudson T.J., Andresen J.M., Wu X., Sohn R.L., Haluska F., Housman D.E., Weiss J.S.: The gene for Schnyder's crystalline corneal dystrophy maps to human chromosome 1p34.1-p36. *Hum. Mol. Genet.*, 1996; 5: 1667-1672

[44] Spyropoulos I.C., Liakopoulos T.D., Bagos P.G., Hamodrakas S.J.: TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. *Bioinformatics*, 2004; 20: 3258-3260

[45] Vitali M., Venturelli E., Galimberti D., Benerini Gatta L., Scarpini E., Finazzi D.: Analysis of the genes coding for subunit 10 and 15 of cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.*, 2009; 116: 1635-1641

[46] Vos M., Esposito G., Edirisinghe J.N., Vilain S., Haddad D.M., Slabbaert J.R., Van Meensel S., Schaap O., De Strooper B., Meganathan R., Morais V.A., Verstreken P.: Vitamin K₂ is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science*, 2012; 336: 1306-1310

[47] Wang X., Wang D., Jing P., Wu Y., Xia Y., Chen M., Hong L.: A novel Golgi retention signal RPWS for tumor suppressor UBIAD1. *PLoS One*, 2013; 8: e72015

[48] Weiss J.S.: Schnyder corneal dystrophy. *Curr. Opin. Ophthalmol.*, 2009; 20: 292-298

[49] Weiss J.S.: Visual morbidity in thirty-four families with Schnyder crystalline corneal dystrophy (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 2007; 105: 616-648

[50] Weiss J.S., Khemichian A.J.: Differential diagnosis of Schnyder corneal dystrophy. *Dev. Ophthalmol.*, 2011; 48: 67-96

[51] Weiss J.S., Kruth H.S., Kuivaniemi H., Tromp G., White P.S., Winters R.S., Lisch W., Henn W., Denninger E., Krause M., Wasson P., Ebenezer N., Mahurkar S., Nickerson M.L.: Mutations in the UBIAD1 gene on chromosome short arm 1, region 36, cause Schnyder crystalline corneal dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2007; 48: 5007-5012

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.