

Received: 2014.10.27
Accepted: 2015.04.27
Published: 2015.08.18

Kinazy adenylanowe człowieka – klasyfikacja, budowa oraz znaczenie w fizjologii i patologii

Human adenylate kinases – classification, structure, physiological and pathological importance

Magdalena Wujak, Joanna Czarnecka, Martyna Gorczycka, Anna Hetmann

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie

Kinazy adenylanowe (AK, EC 2.7.4.3) to powszechnie występujące fosfotransferazy, katalizujące odwracalną reakcję przeniesienia wysokoenergetycznych grup β - i γ -fosforanowych między nukleotydami. Wszystkie sklasyfikowane AK wykazują podobny plan budowy: zawierają dużą centralną domenę CORE, domeny wiążące monofosforan i trifosforan nukleozydu (NMPbd i NTPbd) oraz domenę LID. Analizując podobieństwo sekwencji aminokwasowej u człowieka, zidentyfikowano aż dziewięć izoenzymów AK, charakteryzujących się różną lokalizacją narządowo-tkankową i subkomórkową. Spośród tych kinaz tylko dwie: AK1 i AK2, spełniają kryterium strukturalne i funkcjonalne, wykazując najwyższe powinowactwo do nukleotydów adeninowych i wykorzystując tylko AMP lub dAMP w roli akceptora reszty fosforanowej. Poszczególne izoenzymy AK biorą udział w utrzymaniu homeostazy nukleotydowej, monitorują zaburzenia ładunku energetycznego komórki, dostarczają wysokoenergetycznych substratów niezbędnych do regulowania funkcji kanałów i transporterów oraz zewnątrzkomórkowych ligandów receptorów nukleotydowych P2 w dużych, regulacyjno-transportowych kompleksach białkowych. W stanach patologicznych organizmu mogą przejmować funkcje innych kinaz, zastępując np. kinazę kreatynową w niedotlenionym mięśniu sercowym. Ukierunkowana mutagenesa oraz badania genetyczne chorób, takich jak aleukocytoza, niedokrwistość hemolityczna, pierwotna dyskineza rzęsek (PCD), pozwoliły na powiązanie obecności i aktywności AK z etiologią tych chorób. Wykazano również udział AK w regulacji różnicowania i dojrzewaniu komórek, a także w apoptozie i onkogenezie. Szeroki zakres procesów, w które są zaangażowane kinazy adenylanowe oraz skorelowanie ich z rozwojem chorób, zachęca do podjęcia dalszych badań nad AK i przemawia za medycznym aspektem wykorzystania kinazy adenylanowej w diagnostyce i terapii niektórych schorzeń. Praca systematyzuje obecny stan wiedzy dotyczący budowy, właściwości i funkcji ludzkiej kinazy adenylanowej.

Słowa kluczowe:

kinaza adenylanowa • homeostaza nukleotydowa • ładunek energetyczny komórki • sygnalizacja nukleotydowa

Summary

Adenylate kinase (AK, EC 2.7.4.3) is a ubiquitous phosphotransferase which catalyzes the reversible transfer of high-energy β - and γ -phosphate groups between nucleotides. All classified AKs show a similar structure: they contain a large central CORE region, nucleoside monophosphate and triphosphate binding domains (NMPbd and NTPbd) and the LID domain. Analysis of amino acid sequence similarity revealed the presence of as many as nine human AK isoenzymes, which demonstrate different organ-tissue and intercellular localization. Among these kinases, only two, AK1 and AK2, fulfill the structural and functional criterion by the highest affinity for adenine nucleotides and the utilization of only AMP or dAMP as phosphate acceptors. Human

	AK isoenzymes are involved in nucleotide homeostasis and monitor disturbances of cell energy charge. Participating in large regulatory protein complexes, AK supplies high energy substrates for controlling the functions of channels and transporters as well as ligands for extracellular P2 nucleotide receptors. In pathological conditions AK can take over the function of other kinases, such as creatine kinase in oxygen-depleted myocardium. Directed mutagenesis and genetic studies of diseases (such as aleukocytosis, hemolytic anemia, primary ciliary dyskinesia (PCD)) link the presence and activity of AK with etiology of these disturbances. Moreover, AK participates in regulation of differentiation and maturation of cells as well as in apoptosis and oncogenesis. Involvement of AK in a wide range of processes and the correlation between AK and etiology of diseases support the medical potential for the use of adenylate kinases in the diagnosis and treatment of certain diseases. This paper summarizes the current knowledge on the structure, properties and functions of human adenylate kinase.
Keywords:	adenylate kinase • nucleotide homeostasis • cell energy charge • nucleotide signaling
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1165196
Word count:	4761
Tables:	1
Figures:	4
References:	65

Adres autorki: mgr Magdalena Wujak, Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UMK w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń, e-mail: mag_wuj@umk.pl

Wykaz skrótów: **5'-NT** – 5'-nukleotyda; acylo-CoA – acylokoenzym A; **ADO** – adenozyne; **ADP** – adenosynodifosforan, difosforan adenozyne; **AK** – kinaza adenylanowa; **AMP** – adenosynomonofosforan, monofosforan adenozyne; **AMPK** – kinaza białkowa zależna od AMP; **ANT** – translokator nukleotydów adeninowych; **Ap_nA** – diadenosynopolifosforan; **apo-A1** – apolipoproteina 1; **ATP** – adenosynotrifosforan, trifosforan adenozyne; **CK** – kinaza kreatynowa; **dTMPK** – kinaza tymidylanowa; **DUSP26** – fosfataza białkowa; **FADD** – białko z domeną śmierci sprzężone z receptorem Fas; **GAPDH** – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; **GPDH** – dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa; **GUK** – kinaza guanylanowa; **K_{ATP}** – kanał potasowy zależny od ATP; **Kir6.x** – podjednostka strukturalna K_{ATP}; **MCC** – oczyszczanie śluzowo-rzęskowe; **MEF2C** – miogeniczny czynnik transkrypcyjny; **MTHSP75** – mitochondrialne białko szoku cieplnego 75; **NAD⁺** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy w postaci utlenionej; **NF-κB** – czynnik transkrypcji jądrowej kappa B; **NMPbd** – domena wiążąca monofosforan nukleozydu; **NDPK** – kinaza difosforanów nukleozydów; **NMPK** – kinaza monofosforanów nukleozydów; **NPPaza** – pirofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydowa; **NTPbd** – domena wiążąca trifosforan nukleozydu; **NTPDaza** – fosfohydrolaza di- i trifosfonukleozydów; **P2** – receptor nukleotydowy; **P2X** – jonotropowy receptor nukleotydowy; **P2Y** – metabotropowy receptor nukleotydowy; **p53** – czynnik transkrypcyjny o właściwościach supresora nowotworowego; **PCD** – pierwotna dyskineza rzęsek; **PGK** – kinaza fosfoglicerynianowa; **PK** – kinaza pirogronianowa; **RD** – dysgeneza siateczki; **ROS** – reaktywne formy tlenu; **SCID** – ciężki złożony niedobór odporności; **SUR** – podjednostka regulatorowa K_{ATP}; **receptor** sulfonilomocznikowy; **TCA** – cykl kwasów trójkarboksylowych; **TRAIL** – ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę; **UMP-CMPK** – kinaza urydyno-cytydylanowa; **VDAC** – kanał anionowy zależny od napięcia, poryna; **VSCC** – kanał wapniowy zależny od napięcia

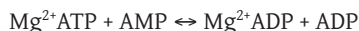
WSTĘP

Kinazy adenylanowe (adenylate kinases, AK; EC 2.7.4.3) są enzymami powszechnie występującymi zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Należą do rodziny kinaz monofosforanów nukleozydów (nucleoside monophosphate kinases, NMPK), która obej-

muje również kinazy guanylanowe (GUK, EC 2.7.4.8), kinazy tymidylanowe (dTMPK, EC 2.7.4.9) oraz kinazy urydyno-cytydylanowe (UMP-CMPK, EC 2.7.4.14) [24,49].

Początkowo kinazę adenylanową definiowano jako ATP:AMP fosfotransferazę katalizującą odwracalną reakcję przeniesienia wysokoenergetycznych grup β –

i γ -fosforanowych między nukleotydami adeninowymi (ATP, ADP i AMP) zgodnie z równaniem:



Badania wykazały jednak, że większość zidentyfikowanych do tej pory kinaz adenylanowych wykorzystuje również inne rybonukleotydy i deoksyrybonukleotydy jako akceptory i donory reszty fosforanowej [40,47,49,50]. Różnorodność właściwości fizykochemicznych i kinetycznych izoenzymów AK, nowe fakty potwierdzające ich związek z rozwojem niektórych chorób, jak również nie w pełni poznany potencjał biologiczny sprawiają, iż coraz częściej bada się jaką rolę pełnią w regulacji procesów metabolicznych komórek. W pracy przedstawiono informacje na temat budowy, mechanizmu działania i funkcji kinaz adenylanowych w organizmach zwierzęcych.

BUDOWA KINAZ ADENYLANOWYCH

Kinazy adenylanowe są zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Zidentyfikowano nieliczne przypadki homooligomeryzacji AK, natomiast przybiera doniesień o interakcji i/lub asocjacji kinazy adenylanowej z pojedynczymi makromolekułami bądź z wysoce zorganizowanymi kompleksami białkowymi maszynierii komórkowej [9,29,32,38,39,59]. AK mogą ulegać acetylacji lub mirystylacji, co ułatwia ich wiązanie lub asocjację z błonami komórkowymi, mitochondrialnymi lub jądrowymi [11,30,34]. Przykładem modyfikacji potranslacyjnej jest mirystylacja ludzkiego izoenzymu AK1. Powstająca w wyniku alternatywnego splicingu izoforma AK1 β ma na N-końcu dodatkowy fragment 18 aminokwasów stanowiący sygnał mirystylacji. Zakotwiczenie AK1 β w błonie komórkowej fizycznie zbliża ją do sensorów metabolicznych lub pozwala jej na funkcjonowanie jako ekto-AK z centrum aktywnym skierowanym na zewnątrz komórki [11,30,58]. W warunkach stresu oksydacyjnego kinazy adenylanowe szczurzych hepatocytów i ludzkich komórek pierwotnego raka wątroby ulegają S-glutatio-nylacji. Wskazuje to na regulację aktywności tych enzymów przez stan oksydoredukcyjny komórki [23].

Niezależnie od pochodzenia kinazy adenylanowe charakteryzują się podobnym planem budowy opartym na strukturze alfa-beta. Enzymy te są zbudowane z kilku zakurczonych regionów: regionu centralnego (CORE), domeny wiążącej monofosforan nukleozydu (NMPbd), domeny wiążącej trifosforan nukleozydu (NTPbd) oraz domeny LID [13,24,25,40,42,53]. Region CORE składa się z równolegle ułożonych struktur β -harmonijki otoczonych α -helisami [46]. W jego obrębie, w pobliżu N-końca polipeptydu, znajduje się domena wiążąca NTP, która składa się z centralnie położonej β -harmonijki otoczonej po obu stronach α -helisami. Najistotniejszym elementem NTPbd jest pętla P (określana również jako motyw Walkera A) o zakonserwowanej sekwencji aminokwasowej GXXXXGK(T/S) [31]. Pętla P ma podstawowe znaczenie dla katalizy, ponieważ oddzia-

luje z grupami fosforanowymi związanego trifosforanu nukleozydu oraz dwuwartościowym jony metalu koordynującym β - i γ -fosforan. Miejsce wiązania NTP ma postać kieszeni formowanej przy współudziale domeny LID i regionu CORE. Wzajemna orientacja domen NMPbd i LID, jak również ich przestrzenny dystans do regionu CORE, decydują o ostatecznej konformacji kinaz adenylanowych, co wpływa na proces wiązania substratów, stabilizację stanu przejściowego, jak również sam transfer reszty fosforanowej [12,13,40,53].

MECHANIZM KATALIZY AK

Podczas swojego cyklu katalitycznego kinaza adenylanowa przechodzi duże zmiany konformacyjne. Prowadzone w ostatnich latach badania krystalograficzne oraz modelowanie komputerowe struktur kinazy adenylanowej podważają wcześniejszy model indukowanego dopasowania enzymu do substratu, w którym to enzym występuje tylko w postaci dwóch skrajnych konformacji – otwartej (open – przed związaniem substratów) i zamkniętej (closed – po ich związaniu) [5,8,13,18,53]. Coraz częściej przyjmowanym modelem opisującym wiązanie substratów przez AK jest model selekcji konformacyjnej (conformational selection model lub population-shift model), według którego enzym osiąga równowagę konformacyjną spośród wielu metastabilnych stanów natywnych [3,53]. W czasie tranzycji open-closed AK przechodzi przez kolejne pośrednie stany metastabilne, podczas których przemieszczeniu ulegają domeny LID i NMPbd, z kolei region CORE nie zmienia swojej konformacji. W postaci otwartej i bez związanych substratów (tzw. apo-AK), domena LID znajduje się w położeniu dystalnym w stosunku do regionu CORE i NMPbd. Po związaniu NTP jego reszty fosforanowe oddziałują z naładowanymi resztami aminokwasowymi domeny LID i regionu CORE [8,12,25,40,42,46]. Następuje indukowane przemieszczanie się domeny LID w kierunku regionu CORE, co skutkuje przykryciem miejsca aktywnego dla NTP. Związanie NMP przez domenę NMPbd powoduje kolejne zmiany konformacyjne, polegające na przemieszczaniu się domeny NMPbd w kierunku regionu CORE i domeny NTPbd, czego wynikiem jest uformowanie drugiej kieszeni z osłoniętym miejscem aktywnym wiążącym NMP [13,18,25,31,42,46,53]. Zmiana położenia domeny LID eliminuje niepożądane oddziaływanie substratu z wodą przez zamknięcie miejsca katalitycznego ponad związanym NTP. Przemieszczanie się domeny NMPbd w kierunku pętli P pozycjonuje cząsteczki substratów w odpowiedniej orientacji, a to ułatwia przeniesienie grupy γ -fosforanowej z NTP na NMP i utworzenie dwóch cząsteczek NDP. Podczas transferu reszty fosforanowej nie następuje żadna tranzycja konformacji enzymu. Etapem limitującym szybkość reakcji enzymatycznej jest otwieranie domen NMPbd i LID, po którym następuje uwolnienie produktów z obu miejsc aktywnych AK [13,49,53].

W procesie katalizy istotną rolę odgrywają dwuwartościowe jony metalu, przede wszystkim magnezu. Two-

rzając kompleks z trifosforanem nukleozydu, chronią ładunek jego reszty fosforanowej przed atakiem nukleofilowym, pozycjonują łańcuch fosforanowy w odpowiedniej orientacji do reszt aminokwasowych AK o kluczowym znaczeniu podczas katalizy oraz ułatwiają rozszczepienie wysokoenergetycznego wiązania [64].

LUDZKIE ISOENZYMY AK

Przyjmowane przez wielu współczesnych badaczy kryteria klasyfikacji izoenzymów ludzkiej kinazy adenylanowej budzą kontrowersje. Stosując podobieństwo strukturalne jako podstawę klasyfikacji, można wyróżnić dziewięć izoenzymów ludzkiej kinazy adenylanowej (AK1-AK9). NMPbd, NTPbd i region CORE izoenzymów AK wykazują wyższy stopień zakonserwowania reszt aminokwasowych niż domena LID. Jej długość i masa cząsteczkowa są czynnikiem klasyfikującym izoenzymy AK w dwa typy. Do typu krótkiego należą izoenzymy, u których domena LID występuje jako pojedyncza pętla, a masa cząsteczkowa polipeptydu nie przekracza 22 kDa (ludzkie izoenzymy AK1, AK5, AK6). Masa cząsteczkowa AK typu długiego wynosi powyżej 25 kDa, natomiast domena LID jest zbudowana z kilku przeciwrównoległych struktur typu β (ludzkie izoenzymy AK2, AK3, AK4, AK7, AK8, AK9) [5,18,24,40,47].

Mimo podobnego planu budowy, ludzkie izoenzymy AK wykazują w stosunku do siebie bardzo zróżnicowany stopień identyczności sekwencji aminokwasowych – od najwyższego między mitochondrialnymi izoenzymami AK3 i AK4 (60%) czy też cytosolowymi AK1 i AK5 (59%), po drastycznie niski w przypadku AK1 i AK7 (jedynie 16%). Relacje filogenetyczne AK1-AK9 w postaci nieukorzonego drzewa przedstawiono na ryc. 1.

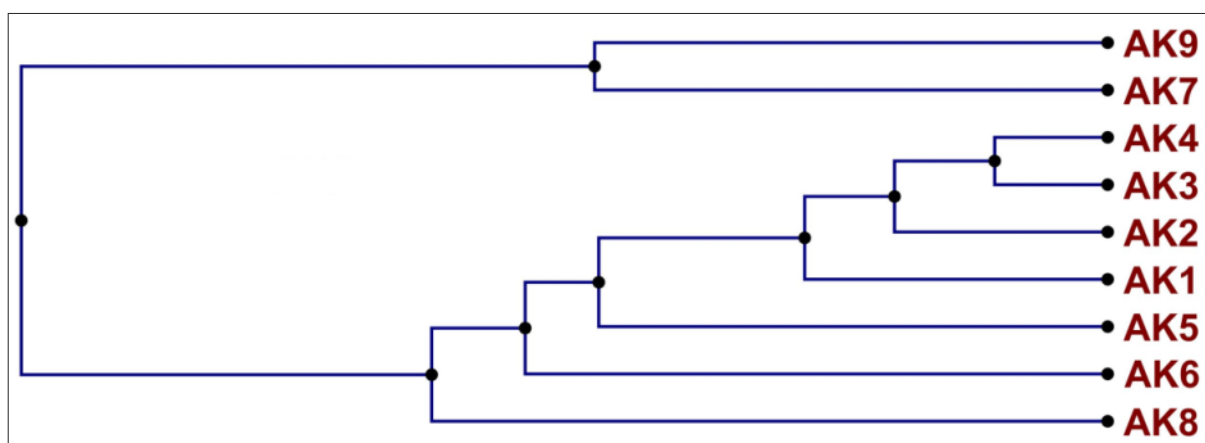
Izoenzymy AK1-AK9 różnią się lokalizacją subkomórkową i tkankowo-narządową, jak również właściwościami fizykochemicznymi i kinetycznymi (tab. 1).

Większość enzymów klasyfikowanych jako kinazy adenylanowe (ATP:AMP fosfotransferazy) charakteryzuje się stosunkowo niewielką swoistością substratową. Jest to szczególnie widoczne we właściwościach kinetycznych izoenzymów AK6, AK7, AK8 i AK9, które wykorzystują bogaty zakres rybo- i deoksyrybonukleotydów jako akceptory i/lub donory reszty fosforanowej [2,49,50,56]. Lepszą swoistość substratową prezentują izoenzymy AK3 i AK4 (nazywane również GTP:AMP fosfotransferazami) i AK5 [47,48,49,62].

Naszym zdaniem, tylko izoenzymy AK1 i AK2 powinny być klasyfikowane jako kinazy adenylanowe, ponieważ tylko one wykazują najwyższe powinowactwo do nukleotydów adeninowych i wykorzystują tylko AMP i dAMP jako akceptory reszty fosforanowej [47,49,63]. Tym samym, jako jedyne spośród wszystkich izoenzymów AK spełniają kryterium tak strukturalne, jak i funkcjonalne. Z tego względu w pracy położono szczególny nacisk na udział tych izoenzymów AK1 i AK2 w regulacji procesów komórkowych i rozwoju chorób.

UDZIAŁ AK W STABILIZACJI HOMEOSTAZY NUKLEOTYDOWEJ I KONTROLI METABOLIZMU ENERGETYCZNEGO

Kinazy adenylanowe, katalizując reakcję fosfotransferu, uczestniczą w regeneracji i regulacji stężenia nukleotydów we wszystkich przedziałach komórkowych (ryc. 2). Tym samym enzymy te są zaangażowane w utrzymanie homeostazy nukleotydowej, która jest niezbędna do przeprowadzenia i podtrzymania złożonych funkcji komórkowych. Regulując stężenie nukleotydów wchodzących w skład ładunku energetycznego, AK kontrolują szybkość przemian w różnych szlakach metabolicznych. Stężenie nukleotydów modyfikuje aktywność wielu enzymów, wpływa na aktywację i inaktywację kanałów jonowych i receptorów nukleotydowych zaangażowanych w transdukcję sygnałów tak wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki [8,9,14,15,18,40,43,47,58,59,65]. Ze



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne ludzkich izoenzymów kinazy adenylanowej sporządzone na podstawie wielokrotnego dopasowania sekwencji aminokwasowych zdeponowanych w bazie UniProt: AK1 (P00568), AK2 (P54819), AK3 (Q9UIJ7), AK4 (P27144), AK5 (Q9Y6K8), AK6 (Q9Y3D8), AK7 (Q96M32), AK8 (Q96MA6), AK9 (Q5TCS8)

Tabela 1. Charakterystyka ludzkich izoenzymów kinazy adenylanowej. Przy lokalizacji tkankowo-narządowej uwzględniono poziom ekspresji danego izoenzymu

AK	M _a [kDa]	pI	Lokalizacja tkankowo-narządowa	Lokalizacja subkomórkowa	Swoistość substratowa
1	21,6	8,73	wszystkie tkanki; wysoki: mięśnie szkieletowe, mózg, serce, erytrocyty	cytosol, błona komórkowa, jądro komórkowe	ATP>dATP>NTP: AMP>dAMP
2	26,5	7,67	wysoki: wątroba, nerki, serce; niski: mięśnie szkieletowe, płuca	cytosol, przestrzeń międzybłonowa mitochondrium	ATP>NTP:AMP
3	25,6	9,15	wszystkie tkanki z wyjątkiem erytrocytów; wysoki: wątroba, serce, mięśnie szkieletowe; średni: trzustka, nerki; niski: mózg, płuca, łożysko	macierz mitochondrialna	GTP>ITP>dGTP> UTP:AMP
4	25,3	8,47	hipokamp i wątroba (specyficzność rozwojowa); wysoki: nerki wątroba; średni: serce, żółtek, jajniki; niski: jelita, jądra, jajowody	macierz mitochondrialna	GTP>ATP:AMP
5	22	5,38	mózg (specyficzność rozwojowa), serce; inne tkanki: brak badań	cytosol, jądro komórkowe	ATP:AMP; GTP:AMP; ATP:dAMP>GTP:CMP> GTP:dCMP
6	20	4,48	gruczoły adrenergiczne; inne tkanki: brak badań	jądro komórkowe	CTP>UTP>dCTP>ATP> GTP>dATP>dTTP>dGTP:AMP/ dAMP>CMP/dCMP
7	82,7	4,67	tkanki bogate w nabłonek rzęskowy; wysoki: jądra; średni: tchawica, jajowody; niski: płuca, mózg	cytosol	ATP:AMP>CMP>dAMP> dCMP; GTP:AMP/CMP/dCMP
8	54,9	5,77	wątroba, płuca, trzustka, tchawica, jądra	cytosol	ATP:AMP>AMP>dAMP; GTP:AMP/CMP/dCMP
9	221,4	4,96	wysoki: przysadka mózgowa, tchawica, gruczoły piersiowe; średni: mózg, gardło, śledziona, macica, węzły chłonne	cytosol, jądro komórkowe	ATP:AMP>CMP>dAMP> dCMP; GTP:AMP/CMP

Według [2,9,11,18,20,30,33,45,47,49,50,56,61,62].

względem na wahadłowy przebieg prowadzonych przez kinazy adenylanowe reakcji ($AMP + ATP \rightleftharpoons 2 ADP$), enzymy te nie tylko regulują stężenie nukleotydów, ale również monitorują zaburzenia ładunku energetycznego, czyli wzajemny stosunek stężeń ufosforylowanych nukleotydów adeninowych ($[ATP] + 0,5[ADP]/([ATP]+[ADP]+[AMP])$). Zmiany w równowadze energetycznej mogą być wynikiem stresu, wysiłku fizycznego, destabilizacji równowagi hormonalnej, nieodpowiedniego natlenowania tkanek czy też braku składników odżywczych i są jednym z istotnych czynników wpływających na aktywność enzymów uczestniczących w wielu procesach metabolicznych [9,15,18,26,54]. Kinazy adenylanowe podtrzymują spadający potencjał energetyczny przez syntezę mono- i trifosforanu adenozy, które odgrywają główną rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej. Powstający wewnątrz komórki ATP służy m.in. jako wielofunkcyjny koenzym i regulator metabolizmu oraz stanowi źródło energii niezbędnej w procesach biosyntezy, transporcie aktywnym czy też pracy mechanicznej. AMP natomiast reguluje wiele szlaków metabolicznych (w tym glikolizę, glikogenolizę, fosforylację oksydacyjną) oraz aktywność sensorów metabolicznych, takich jak kinaza białkowa aktywowana

przez AMP (AMPK) i ATP-zależne kanały potasowe (K_{ATP}) [18,26,30]. W odpowiedzi na wysoki poziom AMP, kanały K_{ATP} , enzymy wrażliwe na AMP oraz adenozyna hamują procesy, w których jest wykorzystywany ATP, a stymulują szlaki prowadzące do jego wytwarzania [18].

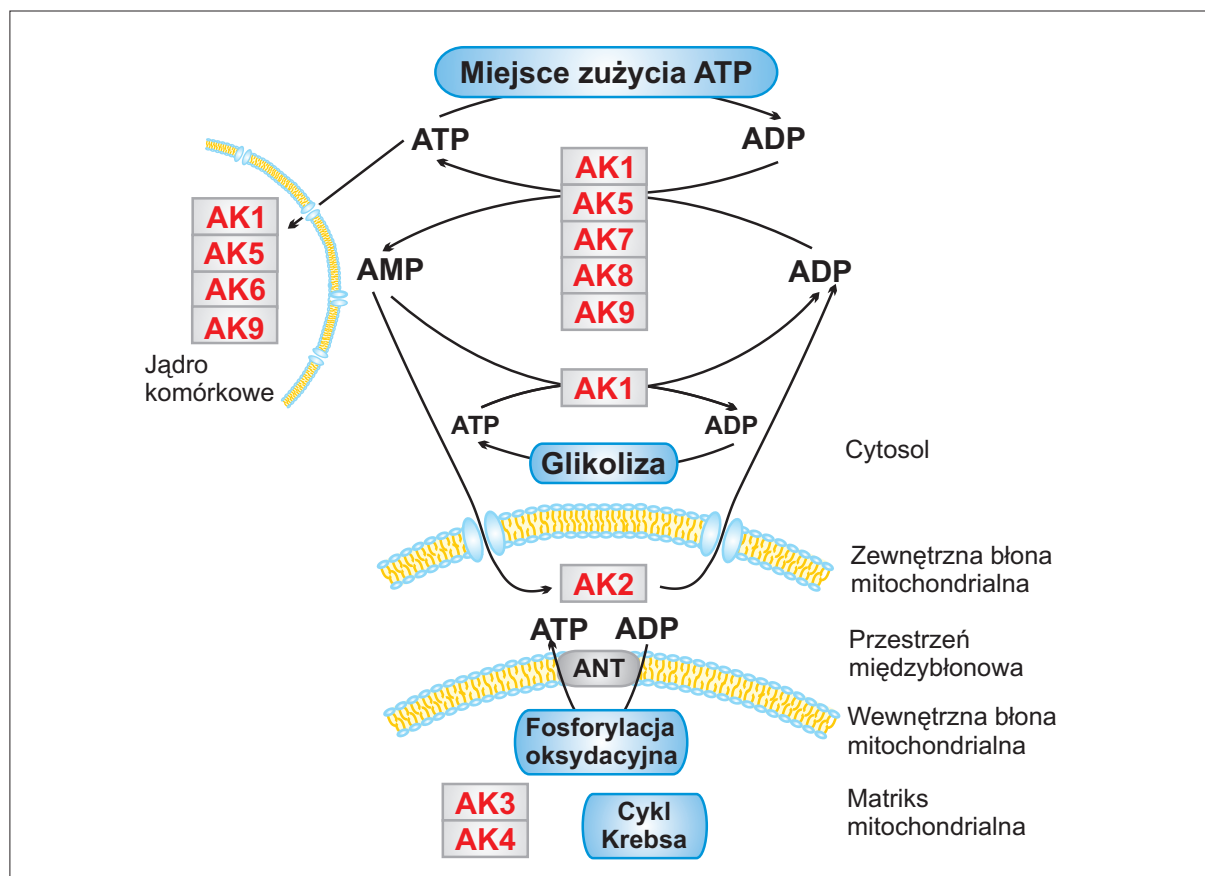
Izoenzymy AK są funkcjonalnie i strukturalnie zintegrowane z procesami enzymatycznymi przebiegającymi w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze komórkowym (ryc. 2). Bliskie sąsiedztwo cytosolowej AK1 i enzymów szlaku glikolitycznego zapewnia stały dopływ ADP i podtrzymanie fosforylacji substratowej. Duża stabilność AK1 w kwaśnym pH jest szczególnie istotna w intensywnie pracujących mięśniach, gdzie glikoliza jest jedynym źródłem energii dla miofibrilarnej ATP-azy, której nieprzerwane funkcjonowanie podtrzymuje skurcze aktomiozyny [17,18,30,63]. Funkcją mitochondrialnych izoenzymów AK jest zapewnienie ciągłości syntezy ATP w wyniku fosforylacji oksydacyjnej i substratowej. Zlokalizowana w przestrzeni międzybłonowej AK2 oraz obecne w macierzy mitochondrialnej AK3 i AK4 uzupełniają pulę ADP dla syntazy ATP. Charakterystyczne są odmienną preferencją substratową AK3 i AK4 ($GTP + AMP \rightleftharpoons GDP + ADP$), regenerując pulę cząsteczek GDP

i tym samym bezpośrednio kontrolują przebieg cyklu kwasów trójkarboksylowych (TCA) na poziomie syntazy bursztyniło-CoA [47,48]. Funkcja izoenzymów AK1, AK5, AK6 i AK9 zlokalizowanych w jądrze komórkowym jest słabo poznana. Ze względu na dużą swoistość substratów zarówno w stosunku do deoksynukleotydów, jak i nukleotydów, izoenzymy te mogą być zaangażowane w regulację procesów związanych z organizacją chromatyny, powielaniem i ekspresją informacji genetycznej czy też transportem aktywnym molekuł przez pory jądrowe [15,56,62].

W ciągu ostatniej dekady zintensyfikowano badania nad funkcją kinazy adenylanowej w metabolizmie energetycznym mięśni i serca. Powszechnie wiadomo, iż to kinaza kreatynowa (CK) dostarcza wysokoenergetycznych grup fosforanowych przez regenerację ATP z zapasów fosfokreatyny [17]. Uczestnicząc w wymianie nukleotydów adeninowych, zapewnia czułą i efektywną komunikację między mitochondriami a najważniejszymi miejscami utylizacji ATP, tj. cytoszkieletem, miofibrilami, jądrem komórkowym i sarkolemmą [17,18,47]. Funkcję CK w sercu i mięśniach wspierają cytosolowe izoenzymy AK, głównie AK1, którego zadaniem jest usprawnienie komunikacji między mitochondriami a aktomiozyną oraz kontrola częstotliwości i amplitudy skurczów przez regulację lokalnego stężenia ATP.

W warunkach fizjologicznych kinaza kreatynowa ogranicza aktywność kinazy adenylanowej, natomiast przy niedotlenieniu AK przejmuje główną rolę w transferze wysokoenergetycznych grup fosforanowych [17,19,28]. W indukowanej elektrostymulacją niewydolności serca aktywność AK wzrasta do 134%, a jej udział w całkowitym obrocie ATP wzrasta z 10 do 21% [19].

Niedobór mięśniowej AK1 aktywuje wiele adaptacji mających na celu podtrzymanie przepływu wysokoenergetycznych fosforanów do miejsca ich wykorzystania, co przemawia za ważnym udziałem AK w regulacji metabolizmu energetycznego. Mechanizmy adaptacyjne są indukowane na poziomie transkrypcji i translacji, a także celują w aktywność enzymów i reorganizację subkomórkowych struktur. Niedobór mięśniowej AK1 powoduje intensyfikację procesu glikolizy i zahamowanie wytwarzania intermediatów cyklu TCA. Badania nad mysim mutantem AK1^{-/-} wykazały w mięśniu brzuchatym łydki 1,5-2-krotny wzrost ilości transkryptów mRNA kodujących enzymy szlaku glikolitycznego: β-enolazę, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), kinazę fosfoglicerynianową (PGK), dehydrogenazę glicero-3-fosforanową (GPDH) i mięśniową kinazę pirogronianową (PK) z jednoczesnym wzrostem ilości wolnego



Ryc. 2. Izoenzymy kinazy adenylanowej jako wydajny system utrzymujący homeostazę nukleotydową w obrębie najważniejszych kompartmentów komórki (szczegółowy opis ryc. w tekście, wg [47] zmodyfikowano)

NAD⁺ o 20%. Jednocześnie obniżonej ekspresji ulegają geny kodujące długi łańcuch dehydrogenazy acylo-CoA i dehydrogenazy glutaminianowej – enzymów macierzy mitochondrialnej uczestniczących w oksydacji kwasów tłuszczowych i glutaminianu [28,29,54]. Bezpośrednim skutkiem mutacji AK1^{-/-} jest upośledzenie refosforylacji ADP w cytosolu i tym samym ograniczony dostęp ATP dla miofibrylarniej ATP-azy. Translokacja ADP do mitochondriów oraz uwalnianie ATP do cytosolu odbywa się z udziałem kompleksów translokacyjnych składających się z translokatora nukleotydów adeninowych (ANT), kanału anionowego zależnego od napięcia (VDAC) i oktamerycznej mitochondrialnej kinazy kreatynowej (ScCKmit). Mała dyfuzja ADP nie pozwala na pełną kompensację niedoboru AK1, stąd mechanizmem adaptującym komórki mięśniowe w tym stanie jest dwukrotne zwiększenie objętości mitochondriów, któremu towarzyszy wzrost stężenia ANT i ScCKmit. Zwiększona liczba cząsteczek ANT usprawnia eksport mitochondrialnego ADP niezbędnego do utrzymania wzmożonej aktywności szlaku glikolitycznego, a zwiększenie ekspresji ScCKmit w błonie mitochondrialnej ma na celu podtrzymanie syntezy ATP wykorzystywanego przez miofibrylarną ATP-azę podczas skurczu mięśni [29].

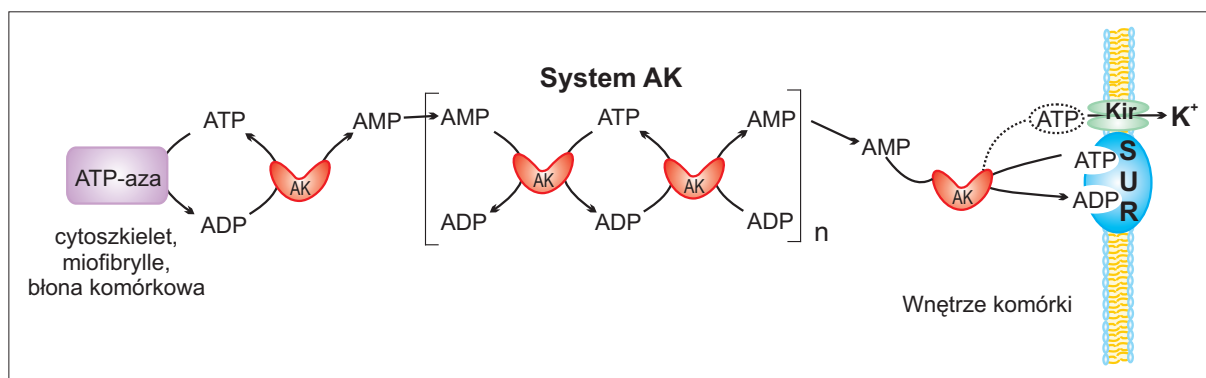
Warto nadmienić, iż podobny wzorzec molekularnych i strukturalnych mechanizmów adaptacyjnych obserwuje się w komórkach pozbawionych kinazy kreatynowej, co wskazuje, iż utrzymanie homeostazy energetycznej komórki przez AK i CK cechuje się w pewnym stopniu redundancją [17,19,29].

UDZIAŁ AK W REGULACJI AKTYWNOŚCI ATP-ZALEŻNYCH KANAŁÓW POTASOWYCH

Kanały potasowe zależne od ATP (K_{ATP}) pośredniczą w regulacji funkcji komórkowych, takich jak sekrecja hormonalna, cytoprotekcja, skurcz i rozkurcz naczyń krwionośnych oraz funkcji na poziomie organizmu, np. wzrost włosów czy kontrola łaknienia [9,10,59]. Zidentyfikowano je w komórkach β trzustki, sercu, mięśniach szkieletowych i gładkich, mózgu, przysadce mózgowej oraz nerkach [10,59]. Kanały K_{ATP} są heteromultimerami zbudowanymi z podjednostek strukturalnych Kir6.x two-

rzących pory kanału i podjednostek regulatorowych SUR funkcjonujących jako receptory sulfonilomocznikowe [4,6,9]. Inhibicja aktywności kanału następuje po związaniu ATP przez jednostki Kir6.x, a ADP znosi to działanie [9]. Kanały te stanowią unikalny czujnik stężenia nukleotydów, adaptując pobudliwość i przepuszczalność błony dla jonów K⁺ w odpowiedzi na wewnątrzkomórkowe sygnały metaboliczne [4,6]. Sygnały są przenoszone przez cytosolowe izoenzymy AK, które regulując stosunek ATP/ADP, odpowiadają za precyzyjną kontrolę aktywności kanałów K_{ATP} . Przez wydajny transfer wysokoenergetycznych reszt fosforanowych z miejsc ich wytwarzania (przede wszystkim mitochondriów) do miejsc występowania K_{ATP} kinazy adenylanowe dostarczają informacji o aktualnym stanie energetycznym komórki. Miejscowe wysokie stężenie AMP stymuluje ich aktywność i przyspiesza fosfotransfer między cząsteczką ATP (wiązaną przez podjednostki Kir6.x) a cząsteczką AMP. Wytworzenie aż dwóch cząsteczek ADP promuje otwarcie kanału potasowego. Wydajność tego mechanizmu kontroli jest zwiększona fizyczną asocjacją izoenzymu AK1 z podjednostką Kir6.x (ryc. 3) [9].

Badania nad AK1 i AK5 w ludzkich komórkach β trzustki stanowią jedno z nielicznych źródeł informacji o współdziałaniu AK i K_{ATP} . W warunkach niewielkiego stężenia glukozy we krwi, izoenzym AK1 wytwarza ADP z ATP i AMP, podtrzymując tym samym aktywność kanału K_{ATP} . Utrzymuje to błonę komórkową w stanie spolaryzowanym i zapobiega sekrecji insuliny. Dopiero napływ glukozy stymuluje komórki β trzustki i hamuje aktywność AK1. Bezpośrednim skutkiem inhibicji aktywności AK1 jest podwyższenie stosunku ATP/ADP w mikrośrodkowisku K_{ATP} , co powoduje zamknięcie kanału, depolaryzację błony komórkowej, napływ jonów wapnia przez zaktywowane kanały wapniowe zależne od potencjału (VSCC) i ostatecznie sekrecję cząsteczek insuliny [43,59]. Stanojevic i wsp. wykazali, iż wzrost stężenia glukozy w medium komórek szczurzej linii guza insulinowego (INS-1) obniża ekspresję genu AK-1, AK-4 i CKB (kinazy kreatynowej typu B) przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji LPK (kinazy pirogronianowej typu L). Za zahamowanie aktywności trzustkowej AK1 w warunkach podwyższonego stężenia glukozy odpowiadają wzrost



Ryc. 3. Regulacja aktywności ATP-zależnych kanałów potasowych z udziałem cytosolowej AK (szczegółowy opis w tekście, wg [9] zmodyfikowano)

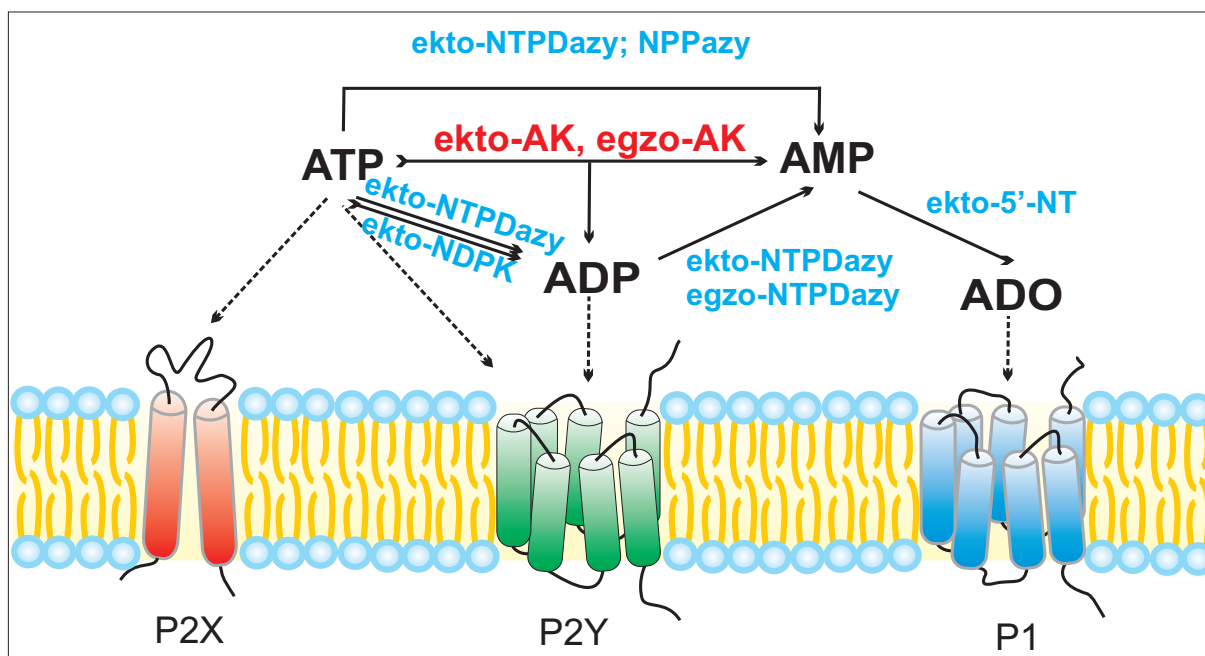
ATP wytwarzanego podczas glikolizy, obniżenie stężenia AMP w pobliżu K_{ATP} oraz wzrost stężenia diadenozynopolifosforanów (Ap_nA) pochodzących z metabolizmu glukozy [9,59]. Niewrażliwość izoenzymu AK5 na zmiany stężenia glukozy, jak również brak jego asocjacji z podjednostką Kir6.2 dowodzą, iż enzym ten nie reguluje aktywności ATP-zależnych kanałów potasowych i pełni w cytosolu funkcję kompensującą przy obniżonej aktywności AK1.

AK JAKO ELEMENT ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ SYGNALIZACJI NUKLEOTYDOWEJ

Obecność kinazy adenylanowej wykazano w płynach ustrojowych, gdzie jako enzym rozpuszczalny (egzo-AK) lub błonowy (ekto-AK) stanowi jeden z elementów nukleotydowego systemu sygnalizacji [14,20,52,55,65]. Częsteczki sygnałowe stanowią ektonukleotydy i ektonukleozydy, które wiążąc się do odpowiednich receptorów, aktywują szlaki transdukcji sygnału i regulują wiele procesów fizjologicznych, takich jak różnicowanie, proliferacja, apoptoza, reakcje zapalne, wydzielanie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe, neurotransmisja czy też hemostaza [8,65]. Stężenie ektonukleotydów i ektonukleozydów jest precyzyjnie regulowane przez ektoenzymy błonowe: ektokinazę adenylanową (ekto-AK), ektokinazę difosforanów nukleozydów (ekto-NDPK), ekto-5'-nukleotydazę (ekto-5'-NT), ektofosfohydrolazę di- i trifosfonukleozydów (ekto-NTPDazę), ektopirofosfatazę/fosfodiesterazę nukleotydową (ekto-NPPazę) i ektodeaminazę adenozyne (ADA) oraz przez ich rozpuszczalne odpowiedniki (ryc. 4) [11,14,20,41,52,55,57,65]. Ektonukleotydy aktywują dwie rodziny receptorów nukleotydowych typu P2: P2X i P2Y, wykazujących odmienne właściwości

regulatorowe i farmakologiczne. P2X ($P2X_{1-7}$) to bramkowane ATP kanały jonowe dla Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , a P2Y ($P2Y_{1-14}$) to receptory metabotropowe, z których P2Y_{1,2,4,6,11} aktywują fosfolipazę C- β , natomiast P2Y_{12,13,14} hamują aktywność cykazy adenylanowej [65]. Zewnątrzkomórkowe di- i trifosfonukleotydy, głównie ekto-ATP i ekto-ADP, funkcjonują jako agoniści receptorów typu P2, natomiast adenozyne jest ligandem metabotropowych receptorów P1 [8,20,27,37,57]. Wygenerowana przez komórki odpowiedź fizjologiczna jest wypadkową pobudzenia receptorów przez enzymatycznie kontrolowaną liczbę cząsteczek ATP, ADP i adenozyne. Rola kinazy adenylanowej jest istotna dla prawidłowego przebiegu wielu szlaków sygnałowych. Wspólnie z inną fosfotransferazą (NDPK) regeneruje ekto-ATP, który może być dalej metabolizowany przez ekto- i egzohydrolazy lub wiązany przez swoje receptory P2. Obie fosfotransferazy dostarczają również drugiego agonistę receptorów P2 – ADP. Funkcją wyróżniającą kinazę adenylanową jest kontrola stężenia AMP, którego hydroliza przez ekto-5'-nukleotydazę generuje kolejną cząsteczkę sygnałową – adenozyne [57,65].

Kinazę adenylanową zidentyfikowano na powierzchni różnych komórek pełniących wyspecjalizowane funkcje [14,20,52,55]. Aurelie i wsp. udowodnili udział ekto-AK hepatocytów w regulacji homeostazy cholesterolu HDL. Obecny na powierzchni hepatocytów kompleks podobny do mitochondrialnej syntazy ATP (ekto- F_1 -ATP-aza) wykazuje duże powinowactwo do apolipoproteiny A-1 (apo A-1), będącej podstawowym białkiem kompleksu HDL. Związanie apo A-1 indukuje hydrolizę zewnątrzkomórkowego ATP przez ekto- F_1 -ATP-azę, czego wynikiem jest aktywacja receptora P2Y₁₃ przez



Ryc. 4. Zintegrowany system enzymów metabolizujących nukleotydy jako element zewnątrzkomórkowej sygnalizacji nukleotydowej (szczegółowy opis ryc. w tekście, wg [65] zmodyfikowano)

powstający ADP i endocytoza cząsteczek HDL do komórek wątroby [20,27]. W razie nieobecności apo A-1 ekto-ATP hamuje aktywność ekto- F_1 -ATP-azy. Co ciekawe, ekto- F_1 -ATP-aza ma jedynie aktywność hydrolityczną, stąd za konstytutywną syntezę ekto-ATP odpowiada ekto-AK i w mniejszym stopniu – ekto-NDPK [20]. Udział ekto-AK w tym procesie przyczynia się do ochrony ścian naczyń krwionośnych przed odkładaniem blaszki miażdżycowej i zapobiega rozwojowi miażdżycy.

Aktywność kinazy adenylanowej na powierzchni nabłonka i w płynnej wyściółce dróg oddechowych przemawia za jej udziałem w regulacji mechanizmów oczyszczania śluzowo-rzęskowego (MCC), który stanowi pierwszą linię obrony przed infekcją. Kontrola głównych procesów składających się na MCC, tj. wydzielanie śluzu, zwiększenie częstości bicia rzęsek oraz aktywacja kanałów chlorkowych odbywa się przez receptory P2, przede wszystkim P2Y₂ pobudzany przez ATP [14,37]. Prawie 50% udział AK w metabolizmie ekto-ADP sugeruje, iż jej funkcją jest przede wszystkim dostarczanie agonisty receptora P2Y₂ i wydłużanie w czasie aktywowanej przez niego odpowiedzi komórkowej [14].

Badania Studzińskiej i wsp. wykazały, iż kinaza adenylanowa z *Bacillus stearothermophilus* odwraca agregację płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym wywołaną *in vitro* za pomocą ADP lub kolagenu. Prawdopodobnie kinaza adenylanowa nie tylko usuwa egzogeny ADP, ale również ten uwalniany przez zaktywowane płytki krwi, zapobiegając dalszemu tworzeniu czopów płytkowych [60]. Dalszy metabolizm AMP dostarcza adenozy, która jest czynnikiem kardioprotekcyjnym i rozkurczającym naczyń. Należy przypuszczać, iż podobne właściwości mają przynajmniej niektóre izoenzymy bądź izoformy ludzkiej kinazy adenylanowej. Precyzyjne poznanie roli AK w regulacji hemostazy dawałoby nadzieję zastosowania jej, podobnie jak NTP-Dazy-1, jako białka terapeutycznego o działaniu antyagregacyjnym i kardioprotekcyjnym [41,60].

UDZIAŁ AK W KONTROLI WZROSTU I RÓŻNICOWANIA

Udział w kardiogenezie

Nieustanny przepływ sygnałów energetycznych i metabolicznych jest głównym elementem regulacji funkcji organów od rozwoju embrionalnego przez cały okres życia organizmu. Wiadomo, że przejściu komórki ze stanu pluripotencji w fenotyp zróżnicowanej komórki serca towarzyszy zmiana metabolizmu energetycznego z anaerobowej glikolizy w wydajną fosforylację oksydacyjną. Dzeja i wsp. odkryli bezpośredni wpływ współdziałania AK i AMPK na różnicowanie embrionalnych komórek macierzystych w kardiomiocyty [16]. Podczas kardiogenezy przeobrażeniu ulega profil ekspresji i subkomórkowej lokalizacji niektórych izoenzymów AK. W porównaniu do pluripotentnych komórek macierzystych,

w kardiomiocytach poziom ekspresji genów kodujących cytosolowe AK1 i AK5 zostaje podwyższony, a transkrypcja genów mitochondrialnych AK2 i AK4 oraz cytosolowej AK7 obniżona. Nie istnieje jednak ścisła korelacja między poziomem transkrypcji genów AK a ilością kodowanego białka, co wskazuje na udział cząsteczek miRNA w tworzeniu ostatecznego wzorca ekspresji izoenzymów AK. W embrionalnych komórkach macierzystych przeważająca ilość AK1 jest zasocjowana z błoną komórkową, natomiast w kardiomiocytach jej dystrybucja zostaje rozszerzona na przestrzeń perynuklearną, jądro komórkowe, miofibrille oraz sarkolemmę [16]. Zwiększona obfitość izoformy AK1β w błonie komórkowej podtrzymuje transfer wewnątrzkomórkowych sygnałów metabolizmu do sensorów metabolicznych [18,30]. Collavin i wsp. odkryli, iż ekspresja AK1β jest aktywowana przez białko supresorowe p53, regulujące dwa punkty kontrolne cyklu komórkowego G1/S i G2/M. Izoforma AK1β uczestniczy w odwracalnym zatrzymaniu cyklu komórkowego i prawdopodobnie w wydajnym dostarczaniu ATP do miejsc naprawy DNA [11,16].

Chociaż w większości typów komórek AK2 jest białkiem typowym dla mitochondriów, to w przypadku różnicujących i dojrzewających kardiomiocytów izoenzym ten występuje najobficiej w cytosolu. Wskazuje to na jego dominujący udział w fosfotransferze w obrębie cytoplazmy w sytuacji, gdy AK1 ulega przemieszczeniu do innych struktur o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym. Podobny wzorec lokalizacji co AK1 prezentuje sercowa podjednostka AMPKα2, która przede wszystkim interkaluje w strukturę miofibrilli, a jej ufosforylowana postać p-AMPKα2(Thr172) jest transportowana do jądra komórkowego [16]. Kolokalizacja AMPK i AK w miofibryllach ułatwia aktywację glikolizy i glikogenolizy w celu dostarczenia energii do kurczących się sarkomerów. Wiadomo, iż AMPK uczestniczy w rozwoju embrionalnym przez utrzymanie polarności komórki i ciągłości cyklu komórkowego [26]. Translokacja p-AMPKα2(Thr172) do jądra komórkowego może mieć na celu regulację fosforylacji lub acetylacji czynników transkrypcji i transportu jądrowego, co wpływa na wydajność ekspresji genów zaangażowanych w różnicowanie np. MEF2C [16]. Przemieszczenie AK i p-AMPKα2(Thr172) do jądra komórkowego gwarantuje wystarczający zasób energii do przeprowadzenia asymetrycznych podziałów komórkowych i wytworzenia wyspecjalizowanych komórek sercowych. AK1, asocjując w metafazie z centrosomem i wrzecionem mitotycznym w pobliżu białek motorycznych, dostarcza energii niezbędnej do rozdzielania się chromosomów i tym samym napędza podział komórki. Izoenzym ten uczestniczy również w jądrowo-cytoplazmatycznym transporcie molekuł oraz wpływa na intensywność syntezy DNA i RNA przez regulację stosunku nukleotydów. Podwyższona całkowita aktywność enzymatyczna i precyzyjna translokacja tych enzymów do jądra komórkowego podczas mitozy świadczy, że uczestniczą w podziale i różnicowaniu komórki.

Dzaja i wsp. wykazali, iż jednocześnie wyciszenie genów AK-1, AK-2 i AK-5 przerywa kardiogenezę. Upośledzenie układu AK-AMP-AMPK zakłóca dojrzewanie sieci mitochondrialnej i miofibrinogenezę, co wyklucza tworzenie zorganizowanych struktur kurczliwych w kulach zarodkowych. Precyzyjna relokalizacja AK i AMPK podczas cyklu komórkowego i asymetrycznego podziału komórki odsłania nową drogę regulacji kardiogenezy i regeneracji tkanek serca [16].

Udział w dojrzewaniu układu limfatycznego

Lagresle-Peyrou i wsp. udowodnili bezpośredni wpływ AK2 na różnicowanie i dojrzewanie komórek linii mielo- i limfoidalnej. Fosfotransferaza ta, w odróżnieniu od innych enzymów wytwarzających ATP (kinaza kreatynowa, difosfokinaza nukleotydów, anhidraza węglanowa i enzymy szlaku glikolitycznego), ulega ekspresji w szpiku kostnym [61]. W wyniku alternatywnego splicingu pre-mRNA AK-2 mogą powstać dwa rodzaje transkryptów: AK-2A składający się z 6 eksonów kodujących białko o długości 239 aminokwasów oraz AK-2B mający na 3' końcu dodatkowy siódmy ekson i stanowiący matrycę do biosyntezy łańcucha polipeptydowego składającego się z 232 aminokwasów [33]. Wykazano, iż mutacje genu AK-2 stanowią bezpośrednią przyczynę rozwoju dysgenезji siateczki (RD, aleukocytoza) [36,51]. Dysgenезja siateczki jest najostrzejszą postacią ciężkiego złożonego niedoboru odporności (SCID), u której następuje wczesne zatrzymanie różnicowania linii mielo- i limfoidalnej. RD charakteryzuje się nieobecnością granulocytów, niemal całkowitym brakiem limfocytów w krwi obwodowej, niedorozwojem gruczołów i wtórnych narządów limfatycznych oraz brakiem wrodzonych i nabytych funkcji immunologicznych. U osób cierpiących na RD zidentyfikowano różne mutacje recesywne w obrębie genu AK-2. Mogą przybierać postać homozygotycznej mutacji missensownej, nonsensownej bądź homozygotycznej delecji 1 bp lub 5 kbp, skutkującej powstaniem przedwczesnego kodonu terminacji translacji [51]. Skutkiem każdej z nich jest utrata funkcji enzymatycznej przez izoenzym AK2 i utrudnienie transportu ADP z macierzy mitochondrialnej do wewnętrznej błony mitochondriów, gdzie mógłby być ponownie ufosforylowany przez syntazę ATP. Dramatycznym następstwem obniżonej aktywności bioenergetycznej mitochondriów może być wzmożone wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) oraz indukowana śmierć komórki (apoptoza) [51]. Interesujące jest, że poziom ekspresji i aktywność innej ATP:AMP fosfotransferazy (AK1) w leukocytach pacjentów z RD nie ulega zmianie, co wskazuje na brak mechanizmów kompensujących niedobór funkcjonalnej AK2. Jedynie wprowadzenie genów AK-2A i AK-2B za pośrednictwem transfekcji lentiwirusowej do komórek CD34⁺ pobranych ze szpiku kostnego pacjentów z RD przywraca różnicowanie komórek linii granulocytarnej w dojrzale neutrofile [51].

Schorzeniem towarzyszącym dysgenезji siateczki jest głuchota nerwowo-czuciowa. Zarówno w warunkach

fizjologicznych, jak i patologicznych gen AK-2 ulega ekspresji w prążku naczyniowym ucha wewnętrznego w siódmym dniu rozwoju postnatalnego. Badacze sugerują, iż zachwianie homeostazy nukleotydowej spowodowane brakiem funkcjonalnej AK2 uniemożliwia generowanie potencjału błonowego lub upośledza transport jonów K⁺ przez kanały potasowe między komórką słuchową a endolimfą [36].

RD jest pierwszym przykładem syndromu niedoboru odporności, którego przyczyną jest zaburzenie w metabolizmie energetycznym komórek szpiku kostnego. Dotychczas nie zidentyfikowano mechanizmów, w wyniku których pod nieobecność funkcjonalnej AK2 dochodzi do neutropenii i limfopenii. Badacze sugerują, iż funkcją mitochondrialnej AK2 jest nie tylko dostarczanie energii do proliferacji prekursorów hematopoety, ale również kontrola apoptozy [36,51].

UDZIAŁ AK W APOPTOZIE I ONKOGENEZIE

Najnowsze badania wskazują na mediację AK2 w wewnętrznym szlaku apoptozy przez formowanie kompleksu z białkiem adaptorowym FADD i kaspazą 10 (kompleks AFAC-10). FADD uczestniczy w aktywacji czynnika transkrypcji jądrowej kappa B (NF-κB), regulacji embriogenezy, cyklu komórkowego, proliferacji i nowotworzeniu komórek [32]. W świetle tych informacji, Lagresle-Peyrou i wsp. sugerują, iż tworzenie kompleksu AFAC-10 może być pośrednim etapem niezbędnym do indukcji prawidłowego wzrostu i różnicowania komórek linii mielo- i limfoidalnej [36]. Istnieje jedynie kilka doniesień literaturowych dotyczących funkcji AK2 w indukcji apoptozy. Wyciszenie ekspresji AK-2 osłabia apoptozę ludzkich komórek indukowaną etopozydem lub staurosporyną, lecz nie wpływa na przebieg apoptozy indukowanej przez ligand Fas (FasL) lub ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę (TRAIL). Ponieważ nie wykryto kompleksów AFAC-10 w kilku ludzkich liniach nowotworowych opornych na etopozyd, wydaje się, że AK2 pośredniczy w nowym wewnętrznym szlaku indukcji apoptozy powiązanym z nowotworzeniem [38].

Najnowsze badania prowadzone przez Kim i wsp. dowodzą nieznaną dotąd regulatorową funkcję AK2 w procesie wzrostu i onkogenezy. Tworząc kompleks ze swoistą fosfatazą DUSP26, zwiększa jej aktywność, reguluje specyficzność substratową oraz promuje interakcje fosfatazy z FADD. Katalizowana przez DUSP26 defosforylacja Ser194 w cząsteczce FADD powoduje zahamowanie proliferacji komórek. W niektórych nowotworach piersi, wątroby i płuc następuje znaczne obniżenie ekspresji AK-2, co potwierdza jej funkcjonowanie w roli negatywnego regulatora wzrostu nowotworów [32].

W kontrolę żywotności komórek może być również zaangażowany izoenzym AK4 występujący w macierzy mitochondrialnej. Liu i wsp. udowodnili dodatnią korela-

cję między poziomem transkrypcji i translacji AK4 a ekspozycją komórek na szkodliwe czynniki stresowe, takie jak niedotlenienie i nadtlenek wodoru. Wyciszenie endogennej ekspresji AK-4 w ludzkich i mysich neuronalnych liniach komórkowych indukuje kondensację chromatyny i śmierć komórek. Ochronną funkcję AK4 może tłumaczyć jej interakcja z mitochondrialnym białkiem szoku ciepłego 75 (MTHSP75) oraz ANT [39]. Kompleks ANT-VDAC jest zaangażowany w utrzymanie homeostazy energetycznej komórki, a tworząc por jonowy, również w regulację przepuszczalności błony mitochondrialnej. Indukowany przez stres oksydacyjny wzrost ekspresji AK4 w macierzy mitochondrialnej ogranicza uwalnianie cytochromu c do cytosolu, wskazując na ochronną funkcję AK4 przed śmiercią komórki [39].

WPŁYW MUTACJI GENÓW AK NA ROZWÓJ CHOROÓB

Anemia hemolityczna

Omówiona we wcześniejszym z rozdziałów aleukocytoza nie jest jedyną chorobą, której molekularnym podłożem jest mutacja genu AK. Niedobór erytrocytarnego izoenzymu AK1 jest rzadką dziedziczną enzymopatią krwinkową powiązaną z niesferocytową anemią hemolityczną o umiarkowanym lub ostrym przebiegu. Schorzeniu temu mogą towarzyszyć zaburzenia psychoruchowe i niedorozwój umysłowy [1,7]. Badania prowadzone w ostatnich 30 latach mianują mutację genu AK-1 jako jedną z najważniejszych przyczyn wystąpienia chronicznej niedokrwistości hemolitycznej. U pacjentów z tą chorobą identyfikuje się różne mutacje w genie AK-1, które powodują drastyczne obniżenie aktywności enzymatycznej lub całkowitą utratę funkcji (m.in. substytucje: 118G>A, 190G>A, 382C>T, 491A>G, 321C>T i delecje: 418-420, 138) [1,7,21,44]. Większość mutacji dotyczy reszt aminokwasowych zaangażowanych w wiązanie substratów, ruchy domen i stabilizację stanów przejściowych. Zmutowane warianty izoenzymu AK1 wykazują różnice we właściwościach kinetycznych (stała Michaelisa, szybkość maksymalna, stała katalityczna) i fizykochemicznych (stabilność termiczna, rozpuszczalność) w porównaniu do postaci niezmutowanej [1]. Kompleksowe badanie przypadków niedoboru erytrocytarnej AK1 z uwzględnieniem analizy aktywności enzymów podstawowych szlaków metabolicznych oraz historii zachorowań w rodzinie zweryfikowanej badaniami genetycznymi wskazuje na istnienie bardziej skomplikowanego układu czynników i mechanizmów decydujących o rozwoju anemii niż sama mutacja AK-1. Jednoznacznie dowodzi tego brak objawów choroby u członków rodziny pacjentów, mimo mutacji w genie AK-1 oraz prawidłowa żywotność czerwonych krwinek przy jednoczesnej aktywności erytrocytarnej AK na poziomie 50% [35]. Ponieważ u większości pacjentów wyraźnie obniżoną aktywność wykazują syntetaza fosforybozopirofosforanu i kinaza pirogronianowa, należy sądzić, iż rozwój przewlekłej anemii hemolitycznej jest wynikiem interferencji defektów enzymatycznych kilku fosfotransferaz [35].

Pierwotna dyskineza rzęsek

Fernandez-Gonzalez i wsp., opierając się na mysim modelu AK7^{-/-}, udowodnili bezpośredni wpływ mutacji genu AK-7 na rozwój choroby charakteryzującej się zmianami patologicznymi podobnymi do pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD) [22]. PCD jest chorobą fenotypowo i genetycznie heterogeniczną, której objawy są wywołane przez nieprawidłową budowę i funkcjonowanie rzęsek pokrywających nabłonki urzęsione organizmu człowieka. Przejawia się częstymi infekcjami dróg oddechowych, rozstrzeniemi oskrzeli, bezpłodnością i objawami charakterystycznymi dla przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [22]. AK7 jest izoenzymem cytosolowym, występującym najobficiej w tkankach bogatych w nabłonek rzęskowy [50]. Mysi model PCD wywołany niedoborem AK7 charakteryzuje się m.in. wodogłowiem, zakłóceniem spermatogenezy, akumulacją śluzu w zatokach przynosowych, nawracającymi infekcjami dróg oddechowych oraz upośledzeniem reakcji układu oddechowego w zetknięciu z alergenem [22]. Zmiany te są spowodowane wadliwą budową rzęsek, gdzie aksonemy zostają pozbawione położonego centralnie dubletu mikrotubul (9+0), dubletów perytrychalnych (8+1) lub dubletów nadliczbowych. Wydaje się, iż funkcją AK7 nie jest jedynie zaopatrywanie rzęsek w energię, ale udział w organizacji mikrotubul rzęskowych. AK7 może funkcjonować jako integralny komponent aksonemu, stanowiąc ostatnie ogniwo w transferze wysokoenergetycznych reszt fosforanowych bądź też znajdować się w całej cytoplazmie, gwarantując wydajny transfer energii z mitochondriów do dyneiny aksonemalnej [22]. Stworzenie mysiego modelu AK7^{-/-} z pewnością wniesie cenny wkład w badania nad astmą, alergią i reakcją zapalną organizmu. Identyfikacja nowego czynnika genetycznego może zaowocować stworzeniem narzędzi diagnostycznych umożliwiających wczesną identyfikację przypadków pierwotnej dyskinezy rzęsek.

PODSUMOWANIE

Występowanie u człowieka aż dziewięciu izoenzymów kinazy adenylanowej, charakteryzujących się różną lokalizacją narządowo-tkankową i subkomórkową, jak również właściwościami kinetycznymi przemawia za kompleksowym i precyzyjnym działaniem AK w wielu procesach komórkowych. Główną rolą izoenzymów AK jest utrzymanie stężenia nukleotydów na poziomie zapewniającym prawidłowy przebieg procesów zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki, jednak to swoistość substratowa, lokalizacja subkomórkowa i interakcja z innymi komponentami maszynarii komórkowej różnicują funkcje i znaczenie poszczególnych izoenzymów. Szeroki zakres procesów, w które są zaangażowane kinazy adenylanowe oraz skorelowanie ich z rozwojem chorób, zachęca do podjęcia dalszych badań nad AK i przemawia za medycznym aspektem wykorzystania kinazy adenylanowej w diagnostyce i terapii niektórych schorzeń.

PÍSMIENICTWO

- [1] Abrusci P., Chiarelli L.R., Galizzi A., Fermo E., Bianchi P., Zanella A., Valentini G.: Erythrocyte adenylate kinase deficiency: characterization of recombinant mutant forms and relationship with nonspherocytic hemolytic anemia. *Exp. Hematol.*, 2007; 35: 1182-1189
- [2] Amiri M., Conserva F., Panayiotou C., Karlsson A., Solaroli N.: The human adenylate kinase 9 is a nucleoside mono- and diphosphate kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013; 45: 925-931
- [3] Arora K., Brooks C.L. 3rd: Large-scale allosteric conformational transitions of adenylate kinase appear to involve a population-shift mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 18496-18501
- [4] Baranowska M., Kozłowska H., Korbut A., Malinowska B.: Kanały potasowe w naczyniach krwionośnych: ich znaczenie w fizjologii i patologii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 596-605
- [5] Beckstein O., Denning E.J., Perilla J.R., Woolf T.B.: Zipping and unzipping of adenylate kinase: atomistic insights into the ensemble of open->-closed transitions. *J. Mol. Biol.*, 2009; 394: 160-176
- [6] Bennett K., James C., Hussain K.: Pancreatic β -cell K_{ATP} channels: Hypoglycaemia and hyperglycaemia. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2010; 11: 157-163
- [7] Bianchi P., Zappa M., Bredi E., Vercellati C., Pelissero G., Barraco F., Zanella A.: A case of complete adenylate kinase deficiency due to a nonsense mutation in AK-1 gene (Arg 107 -> Stop, CGA -> TGA) associated with chronic haemolytic anaemia. *Br. J. Haematol.*, 1999; 105: 75-79
- [8] Burnstock G.: Introduction and perspective, historical note. *Front. Cell. Neurosci.*, 2013; 7: 227
- [9] Carrasco A.J., Dzeja P.P., Alekseev A.E., Pucar D., Zingman L.V., Abraham M.R., Hodgson D., Bienengraeber M., Pucoat M., Janssen E., Wieringa B., Terzic A.: Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 7623-7628
- [10] Clark R., Proks P.: ATP-sensitive potassium channels in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010; 654: 165-192
- [11] Collavin L., Lazarevic D., Utrera R., Marzinotto S., Monte M., Schneider C.: wt p53 dependent expression of a membrane-associated isoform of adenylate kinase. *Oncogene*, 1999; 18: 5879-5888
- [12] Dahnke T., Tsai M.D.: Mechanism of adenylate kinase. The conserved aspartates 140 and 141 are important for transition state stabilization instead of substrate-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 8075-8081
- [13] Daily M.D., Phillips G.N. Jr., Cui Q.: Many local motions cooperate to produce the adenylate kinase conformational transition. *J. Mol. Biol.*, 2010; 400: 618-631
- [14] Donaldson S.H., Picher M., Boucher R.C.: Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2002; 26: 209-215
- [15] Dzeja P.P., Bortolon R., Perez-Terzic C., Holmuhamedov E.L., Terzic A.: Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 10156-10161
- [16] Dzeja P.P., Chung S., Faustino R.S., Behfar A., Terzic A.: Developmental enhancement of adenylate kinase-AMPK metabolic signaling axis supports stem cell cardiac differentiation. *PLoS One*, 2011; 6: e19300
- [17] Dzeja P.P., Hoyer K., Tian R., Zhang S., Nemutlu E., Spindler M., Ingwall J.S.: Rearrangement of energetic and substrate utilization networks compensate for chronic myocardial creatine kinase deficiency. *J. Physiol.*, 2011; 589: 5193-5211
- [18] Dzeja P., Terzic A.: Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009; 10: 1729-1772
- [19] Dzeja P.P., Vitkevicius K.T., Redfield M.M., Burnett J.C., Terzic A.: Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ. Res.*, 1999; 84: 1137-1143
- [20] Fabre A.C., Vantourout P., Champagne E., Tercé F., Rolland C., Perret B., Collet X., Barbaras R., Martinez L.O.: Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y(13)-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006; 63: 2829-2837
- [21] Fermo E., Bianchi P., Vercellati C., Micheli S., Marcello A.P., Portaleone D., Zanella A.: A new variant of adenylate kinase (delG138) associated with severe hemolytic anemia. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2004; 33: 146-149
- [22] Fernandez-Gonzalez A., Kourembanas S., Wyatt T.A., Mitsialis S.A.: Mutation of murine adenylate kinase 7 underlies a primary ciliary dyskinesia phenotype. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2009; 40: 305-315
- [23] Fratelli M., Demol H., Puype M., Casagrande S., Villa P., Eberini I., Vandekerckhove J., Gianazza E., Ghezzi P.: Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics*, 2003; 3: 1154-1161
- [24] Fukami-Kobayashi K., Nosaka M., Nakazawa A., Go M.: Ancient divergence of long and short isoforms of adenylate kinase: molecular evolution of the nucleoside monophosphate kinase family. *FEBS Lett.*, 1996; 385: 214-220
- [25] Gur M., Madura J.D., Bahar I.: Global transitions of proteins explored by a multiscale hybrid methodology: application to adenylate kinase. *Biophys. J.*, 2013; 105: 1643-1652
- [26] Hardie D.G.: AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.*, 2011; 25: 1895-1908
- [27] Jacquet S., Malaval C., Martinez L.O., Sak K., Rolland C., Perez C., Nauze M., Champagne E., Tercé F., Gachet C., Perret B., Collet X., Boeynaems J.M., Barbaras R.: The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 2508-2515
- [28] Janssen E., Dzeja P.P., Oerlemans F., Simonetti A.W., Heerschap A., de Haan A., Rush P.S., Terjung R.R., Wieringa B., Terzic A.: Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. *EMBO J.*, 2000; 19: 6371-6381
- [29] Janssen E., de Groof A., Wijers M., Fransen J., Dzeja P.P., Terzic A., Wieringa B.: Adenylate kinase 1 deficiency induces molecular and structural adaptations to support muscle energy metabolism. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 12937-12945
- [30] Janssen E., Kuiper J., Hodgson D., Zingman L.V., Alekseev A.E., Terzic A., Wieringa B.: Two structurally distinct and spatially compartmentalized adenylate kinases are expressed from the AK1 gene in mouse brain. *Mol. Cell. Biochem.*, 2004; 256-257: 59-72
- [31] Kenyon C.P., Roth R.L.: The role of the C8 proton of ATP in the catalysis of shikimate kinase and adenylate kinase. *BMC Biochem.*, 2012; 13: 15
- [32] Kim H., Lee H.J., Oh Y., Choi S.G., Hong S.H., Kim H.J., Lee S.Y., Choi J.W., Su Hwang D., Kim K.S., Kim H.J., Zhang J., Youn H.J., Noh D.Y., Jung Y.K.: The DUSP26 phosphatase activator adenylate kinase 2 regulates FADD phosphorylation and cell growth. *Nat. Commun.*, 2014; 5: 3351
- [33] Kishi F., Tanizawa Y., Nakazawa A.: Isolation and characterization of two types of cDNA for mitochondrial adenylate kinase and their expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 11785-11789
- [34] Klier H., Magdolen V., Schricker R., Strobel G., Lottspeich F., Bandlow W.: Cytoplasmic and mitochondrial forms of yeast adenylate kinase 2 are N-acetylated. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996; 1280: 251-256

- [35] Lachant N.A., Zerez C.R., Barredo J., Lee D.W., Savely S.M., Tanaka K.R.: Hereditary erythrocyte adenylate kinase deficiency: a defect of multiple phosphotransferases? *Blood*, 1991; 77: 2774-2784
- [36] Lagresle-Peyrou C., Six E.M., Picard C., Rieux-Laucat F., Michel V., Ditadi A., Demerens-de Chappedelaine C., Morillon E., Valensi F., Simon-Stoos K.L., Mullikin J.C., Noroski L.M., Besse C., Wulffraat N.M., Ferster A. i wsp.: Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with sensorineural deafness. *Nat. Genet.*, 2009; 41: 106-111
- [37] Lazarowski E.R., Boucher R.C.: Purinergic receptors in airway epithelia. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2009; 9: 262-267
- [38] Lee H.J., Pyo J.O., Oh Y., Kim H.J., Hong S.H., Jeon Y.J., Kim H., Cho D.H., Woo H.N., Song S., Nam J.H., Kim H.J., Kim K.S., Jung Y.K.: AK2 activates a novel apoptotic pathway through formation of a complex with FADD and caspase-10. *Nat. Cell. Biol.*, 2007; 9: 1303-1310
- [39] Liu R., Ström A.L., Zhai J., Gal J., Bao S., Gong W., Zhu H.: Enzymatically inactive adenylate kinase 4 interacts with mitochondrial ADP/ATP translocase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009; 41: 1371-1380
- [40] Liu R., Xu H., Wei Z., Wang Y., Lin Y., Gong W.: Crystal structure of human adenylate kinase 4 (L171P) suggests the role of hinge region in protein domain motion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 379: 92-97
- [41] Marcus A.J., Broekman M.J., Drosopoulos J.H., Olson K.E., Islam N., Pinsky D.J., Levi R.: Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2005; 31: 234-246
- [42] Matsunaga Y., Fujisaki H., Terada T., Furuta T., Moritsugu K., Kidera A.: Minimum free energy path of ligand-induced transition in adenylate kinase. *PLoS Comput. Biol.*, 2012; 8: e1002555
- [43] Miki T., Nagashima K., Seino S.: The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *J. Mol. Endocrinol.*, 1999; 22: 113-123
- [44] Miwa S., Fujii H., Tani K., Takahashi K., Takizawa T., Igarashi T.: Red cell adenylate kinase deficiency associated with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia: clinical and biochemical studies. *Am. J. Hematol.*, 1983; 14: 325-333
- [45] Miyoshi K., Akazawa Y., Horiguchi T., Noma T.: Localization of adenylate kinase 4 in mouse tissues. *Acta Histochem. Cytochem.*, 2009; 42: 55-64
- [46] Müller C.W., Schlauderer G.J., Reinstein J., Schulz G.E.: Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure*, 1996; 4: 147-156
- [47] Noma T.: Dynamics of nucleotide metabolism as a supporter of life phenomena. *J. Med. Invest.*, 2005; 52: 127-136
- [48] Noma T., Fujisawa K., Yamashiro Y., Shinohara M., Nakazawa A., Gondo T., Ishihara T., Yoshinobu K.: Structure and expression of human mitochondrial adenylate kinase targeted to the mitochondrial matrix. *Biochem. J.*, 2001; 358: 225-232
- [49] Panayiotou C., Solaroli N., Karlsson A.: The many isoforms of human adenylate kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2014; 49: 75-83
- [50] Panayiotou C., Solaroli N., Xu Y., Johansson M., Karlsson A.: The characterization of human adenylate kinases 7 and 8 demonstrates differences in kinetic parameters and structural organization among the family of adenylate kinase isoenzymes. *Biochem. J.*, 2011; 433: 527-534
- [51] Pannicke U., Hönig M., Hess I., Friesen C., Holzmann K., Rump E.M., Barth T.F., Rojewski M.T., Schulz A., Boehm T., Friedrich W., Schwarz K.: Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. *Nat. Genet.*, 2009; 41: 101-105
- [52] Picher M., Boucher R.C.: Human airway ecto-adenylate kinase. A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 11256-11264
- [53] Ping J., Hao P., Li Y.X., Wang J.F.: Molecular dynamics studies on the conformational transitions of adenylate kinase: a computational evidence for the conformational selection mechanism. *Biomed. Res. Int.*, 2013; 2013: 628536
- [54] Pucar D., Janssen E., Dzeja P.P., Juranic N., Macura S., Wieringa B., Terzic A.: Compromised energetics in the adenylate kinase AK1 gene knockout heart under metabolic stress. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 41424-41429
- [55] Quillen E.E., Haslam G.C., Samra H.S., Amani-Taleshi D., Knight J.A., Wyatt D.E., Bishop S.C., Colvert K.K., Richter M.L., Kitos P.A.: Ecto-adenylate kinase and plasma membrane ATP synthase activities of human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 20728-20737
- [56] Ren H., Wang L., Bennett M., Liang Y., Zheng X., Lu F., Li L., Nan J., Luo M., Eriksson S., Zhang C., Su X.D.: The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2005; 102: 303-308
- [57] Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H.: The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.*, 2006; 2: 409-430
- [58] Ruan Q., Chen Y., Gratton E., Glaser M., Mantulin W.W.: Cellular characterization of adenylate kinase and its isoform: two-photon excitation fluorescence imaging and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 2002; 83: 3177-3187
- [59] Stanojevic V., Habener J.F., Holz G.G., Leech C.A.: Cytosolic adenylate kinases regulate K-ATP channel activity in human beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 368: 614-619
- [60] Studzińska B., Seroka A., Łepicka M., Roszek K., Komoszyński M.: The increase of adenylate kinase activity in the blood can control aggregation of platelets in coronary or peripheral arterial ischemia. *Health*, 2010; 2: 246-252
- [61] Tanimura A., Horiguchi T., Miyoshi K., Hagita H., Noma T.: Differential expression of adenine nucleotide converting enzymes in mitochondrial intermembrane space: a potential role of adenylate kinase isozyme 2 in neutrophil differentiation. *PLoS One*, 2014; 9: e89916
- [62] van Rompay A.R., Johansson M., Karlsson A.: Identification of a novel human adenylate kinase. cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 261: 509-517
- [63] Walker E.J., Dow J.W.: Location and properties of two isoenzymes of cardiac adenylate kinase. *Biochem. J.*, 1982; 203: 361-369
- [64] Yan H.G., Tsai M.D.: Mechanism of adenylate kinase. Demonstration of a functional relationship between aspartate 93 and Mg²⁺ by site-directed mutagenesis and proton, phosphorus-31, and magnesium-25 NMR. *Biochemistry*, 1991; 30: 5539-5546
- [65] Yegutkin G.G.: Nucleotide – and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1783: 673-694

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.