

Received: 2012.05.20  
Accepted: 2012.07.01  
Published: 2012.07.20

## Fosfodiesterazy rodziny 3 sprzęgają szlaki sygnałowe zależne od kinaz białkowych i cyklicznego GMP z metabolizmem cyklicznego AMP\*

Phosphodiesterase 3 mediates cross-talk between the protein kinase- and cGMP- dependent pathways and cyclic AMP metabolism

Edyta Makuch, Janusz Matuszyk

Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

### Streszczenie

PDE3 są fosfodiesterazami dwusubstratowymi, hydrolizującymi cAMP i cGMP. Jednocześnie ich aktywność katalityczna jest hamowana kompetycyjnie przez cGMP. Jest to związane z obecnością 44-aminokwasowego insertu w domenie katalitycznej, który warunkuje różny mechanizm wprowadzania cyklicznych nukleotydów do miejsca katalitycznego enzymu. Podczas gdy wiązanie cGMP do miejsca hydrolizy ma charakter bezpośredni, cAMP wprowadzane jest przez insert. cGMP związane z enzymem stanowi zawadę steryczną dla cAMP.

Natomiast domena regulatorowa, za pośrednictwem hydrofobowych regionów NHR1 i NHR2, determinuje subkomórkowe umiejscowienie PDE3, a przez to udział w ściśle określonych kaskadach sygnałowych. Właściwości PDE3 warunkują szczególną rolę w łączeniu metabolizmu cyklicznego AMP z innymi kaskadami sygnałowymi. Opisano dwa odmienne mechanizmy działania PDE3 w szlakach sygnałowych komórki. W wielu kaskadach sygnałowych niezbędne jest utworzenie makromolekularnego kompleksu PDE3 z białkami sygnałowymi, w którym dochodzi do aktywacji PDE3 przez fosforylację. W szlakach indukowanych niektórymi hormonami lub czynnikami wzrostu PDE3 łączy metabolizm cAMP z kaskadami sygnałowymi zależnymi od kinaz białkowych. Z kolei w przypadku stymulacji peptydami natriuretycznymi PDE3 reguluje stężenie cAMP w odpowiedzi na zmieniające się stężenie cGMP.

### Słowa kluczowe:

fosfodiesteraza • PDE • fosfodiesterazy rodziny 3 • PDE3 • PDE3A • PDE3B • budowa i regulacja aktywności PDE3 • szlaki sygnałowe zależne od kinaz białkowych • sprzęganie szlaków sygnałowych cAMP i cGMP • szlaki sygnałowe peptydów natriuretycznych

### Summary

PDE3 is a dual-substrate phosphodiesterase responsible for hydrolyzing both cAMP and cGMP whilst being simultaneously inhibited by cGMP. This feature is related to presence of the 44 amino acid insert in the catalytic domain, which determines the mechanism of introduction of the cyclic nucleotide into the catalytic pocket of the enzyme. Once bound in the catalytic site cGMP results in steric hindrance for cAMP to enter the site. The regulatory domain of PDE3 consists

\* Praca finansowana z grantu MNiSW numer N N401 063636.

of two hydrophobic regions: NHR1 and NHR2. Their presence defines the enzyme's intracellular localization, thus determining its participation in particular signaling cascades. Due to the properties of PDE3 this enzyme has exceptional importance for the cross-talk between cAMP-dependent signaling and other cascades. There are two different mechanisms of action of PDE3 enzymes in cell signaling pathways. In many signaling cascades assembly of a signalosome is necessary for phosphorylation and activation of the PDE3 proteins. In response to certain hormones and growth factors, PDE3 merges the metabolism of cAMP with protein kinase-dependent signaling pathways. PDE3 also controls the level of cAMP with regard to the alternating concentration of cGMP. This effect occurs in signaling cascades activated by natriuretic peptide.

**Key words:** phosphodiesterase • PDE • phosphodiesterase 3 family • PDE3 • PDE3A • PDE3B • structure and regulation of the activity of PDE3 • protein kinase-dependent pathways • cAMP and cGMP signaling cross-talk • natriuretic peptide signaling

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1004074>

**Word count:** 3094

**Tables:** 2

**Figures:** 3

**References:** 63

**Adres autora:** dr hab. Janusz Matuszyk, prof. PAN, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirsfelda, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: matuszyk@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **cAMP** – cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; **cGMP** – cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan; **CREB** – czynnik transkrypcyjny wiążący element odpowiedzi na cAMP; **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu; **EPAC** – wymiennicze cGMP zależne od cAMP; **ERK1/2** – kinazy białkowe aktywowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe; **ICER** – wczesny represor indukowany cAMP; **K<sub>m</sub>** – stała Michaelisa-Mentena; **NGF** – nerwowy czynnik wzrostu; **NHR1, NHR2** – regiony hydrofobowe znajdujące się w domenie regulatorowej PDE3; **NPR-A, NPR-B** – receptory peptydów natriuretycznych sprzężone z cyklazą guanylanową; **PC12** – linia komórkowa wyprowadzona z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura; **PDE** – fosfodiesterazy; **PDE3** – fosfodiesterazy rodziny 3; **PI3K** – kinaza-3-fosfatydyloinozytolu; **PKA** – kinaza białkowa A; **PKB** – kinaza białkowa B; **PKC** – kinaza białkowa C; **PKG** – kinaza białkowa G; **Raf-1** – kinazy serynowo-treoninowe rodziny Raf; **V<sub>max</sub>** – maksymalna szybkość reakcji.

## WSTĘP

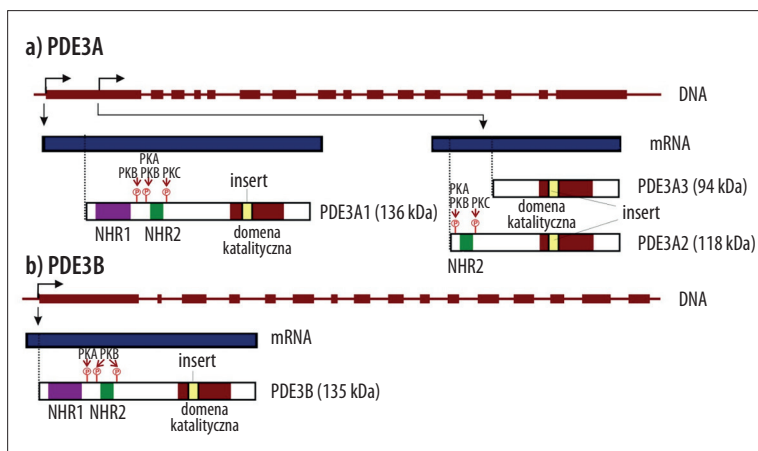
Cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan (cAMP) oraz cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan (cGMP) pełnią ważne funkcje w procesach biologicznych. Jako tzw. drugorzędowe przekaźniki uczestniczą w transdukcji sygnału wewnątrz komórki. Za regulację ich poziomu odpowiedzialne są fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów (PDE), które katalizują reakcję hydrolizy wiązania 3'-fosfodiesterowego w cyklicznych nukleotydach, w wyniku czego powstaje nukleozydo-5'-fosforan [31]. Enzymy te są szeroko rozpowszechnione w różnych tkankach ssaczych. Wiąże się to z ich funkcją, gdyż przez modulację wewnątrzkomórkowych stężeń cAMP i cGMP wpływają na regulację różnych kaskad sygnałowych [59].

Niezwykle znaczącymi, ze względu na dwusubstratowość oraz mechanizm regulacji aktywności katalitycznej, są fosfodiesterazy cAMP i cGMP regulowane przez cGMP, które pełnią główną rolę w sprzęganiu (cross-talk) szlaków sygnałowych cyklicznych nukleotydów. Do tej grupy należą m.in. PDE3, które są kompetycyjnie hamowane przez cGMP, co skutkuje zahamowaniem hydrolizy cAMP. Cechę tę oraz inne własności PDE3, związane z uczestnictwem w ściśle

określonych kaskadach sygnałowych, warunkuje swoista budowa domen białkowych. W przeciwieństwie do fosfodiesteraz rodziny 2, również należących do tej grupy, PDE3 w większości przypadków funkcjonują jako fosfodiesterazy, które po aktywacji przez swoistą kinazę białkową są odpowiedzialne za hydrolizę cAMP bez udziału cGMP. Tak dzieje się na przykład w odpowiedzi na niektóre hormony. Zdecydowanie rzadziej obserwuje się funkcjonowanie PDE3 jako łącznika między szlakami cyklicznych nukleotydów, jak to się zdarza w kaskadach sygnałowych aktywowanych przez peptydy natriuretyczne. Stąd PDE3 może pełnić dwie odmienne funkcje w komórce, takie jak sprzęganie szlaków sygnałowych cyklicznych nukleotydów, bądź łączenie kaskad sygnałowych kinaz białkowych z metabolizmem cAMP. Warunkuje to uczestnictwo PDE3 w transdukcji sygnału w różnorodnych procesach komórkowych.

## WARIANTY PDE3 I STOPIEŃ PODOBIENSTWA IZOFORM MIĘDZY GATUNKAMI

Fosfodiesterazy rodziny 3 pierwotnie nazywane były fosfodiesterazami hamowanymi przez cGMP. Po raz pierwszy wyizolowane zostały z ludzkich płytek krwi [18]. Badania



Ryc. 1. Struktura genów kodujących ludzką PDE3 oraz budowa izoform białkowych z zaznaczeniem wariantów wynikających z alternatywnego składania mRNA (na podstawie [38, 39], zmodyfikowano)

wykazały, iż są to fosfodiesterazy dwusubstratowe o dużym powinowactwie względem obu cyklicznych nukleotydów. Zidentyfikowano dwa geny kodujące fosfodiesterazy rodziny 3: *PDE3A* i *PDB3B* [56]. Z transkryptu genu ludzkiej *PDE3A*, w wyniku alternatywnego składania mRNA powstają dwa mRNA i trzy izoformy białkowe, *PDE3A1/2/3*. *PDE3A1* powstaje z pełnej długości mRNA, stąd jest najdłuższą z izoform. *PDE3A2* powstaje dzięki obecności w sekwencji kodującej alternatywnego miejsca startu transkrypcji. Natomiast izoforma *PDE3A3* powstaje z mRNA *PDE3A2* przez rozpoczęcie translacji poniżej pierwszego kodonu startu AUG (ryc. 1) [56]. W sekwencji genu *PDE3B* nie znaleziono alternatywnych miejsc startu transkrypcji ani translacji, stąd uważa się, że różnice w długości sekwencji aminokwasowej białka *PDE3B* są raczej wynikiem częściowej proteolizy zachodzącej podczas izolacji tej izoformy (ryc. 1). Dlatego też przyjęto, iż gen *PDE3B* koduje tylko jedną izoformę białkową.

Najnowsze badania donoszą o istnieniu polimorfizmów w obrębie genów kodujących obie izoformy PDE3. Polimorfizm *PDE3B* wynika z pojedynczej lub podwójnej substitucji w eksonie 4 lub w obrębie intronów 5 i 12 [37,51]. Natomiast w przypadku genu *PDE3A* obserwuje się insercję zasady w pozycji -1200 w promotorze genu *PDE3A*, co prawdopodobnie tłumaczy lekooporność niektórych pacjentów wobec leków zawierających inhibitory PDE3 [4].

Sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe tych samych izoform PDE3 u różnych gatunków ssaków charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa. Dla szczura, myszy i człowieka obserwuje się zgodność powyżej 80% (tabela 1, wartości zaznaczone na zielono), przy czym sekwencje szczurze i mysie wykazują podobieństwo na poziomie prawie 95%, co tłumaczyć można pokrewieństwem filogenetycznym tych gatunków (tabela 1, wartości zaznaczone na żółto). Nie obserwuje się natomiast tej zależności między izoformami *PDE3A* i *PDE3B* w obrębie jednego gatunku. Stopień podobieństwa sekwencji wynosi prawie 60% (tabela 1). Mimo tych różnic, dane doświadczalne wykazują, że *PDE3A* i *PDE3B* cechują się bardzo podobnymi właściwościami kinetycznymi, choć na podstawie wartości  $V_{max}$  uznaje się, że *PDE3A* wolniej hydrolizuje cGMP niż *PDE3B* (tabela 2).

#### WZÓR EKSPRESJI TKANKOWEJ POSZCZEGÓLNYCH IZOFORM PDE3

Wysoka ekspresja *PDE3A* charakterystyczna jest dla tkanek układu krwionośnego, np. płytek krwi oraz miocytów

sercowych [29,54]. Obserwuje się prawie 15-krotnie wyższy poziom ekspresji tej fosfodiesterazy w sercu w porównaniu do innych tkanek oraz około 10-krotnie wyższy poziom w porównaniu z innymi fosfodiesterazami. Pokazuje to niezwykłą swoistość umiejscowienia w tkance organizmu, a co za tym idzie selektywną funkcję *PDE3A*. Ponadto obecność tej fosfodiesterazy stwierdzono w tkankach trzustki, pęcherza moczowego, żołądka oraz w oocytach [19,29]. Natomiast izoforma *PDE3B* występuje w płucach, hepatocytach, spermatocytach, limfocytach T i makrofagach [29,58]. Wysoką ekspresję *PDE3B* obserwuje się w ludzkich i szczurzych tkankach tłuszczowych oraz w wątrobie [29]. W dużych ilościach transkrypt *PDE3B* obecny jest także w zarodkowym nabłonku czuciowym [48]. W rozwiniętym ośrodkowym układzie nerwowym względnie wysokim poziomem ekspresji obu genów *PDE3* cechuje się mózdzek oraz ciało prążkowane, w innych częściach mózgu ekspresja utrzymuje się na niskim poziomie [29,60]. Ta mnogość występowania *PDE3* w różnych tkankach możliwa jest dzięki istnieniu licznych izoform, które mimo znacznych różnic w sekwencji mają podobne właściwości.

#### UNIKALNA BUDOWA DOMENY KATALITYCZNEJ PDE3

Selektywność działania *PDE3* jest ściśle związana ze swoją budową domeny katalitycznej. Cechą charakterystyczną *PDE3* jest 44-aminokwasowy insert znajdujący się w tej domenie, niespotykany w fosfodiesterazach należących do innych rodzin. Umiejscowiony jest między helisami 6 i 7, lecz nie przyjmuje żadnej uporządkowanej struktury drugorzędowej (ryc. 2) [25]. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej insertów w *PDE3A* i *PDE3B* wynosi tylko 38,6%, mimo to na obu końcach i w środku insertów znajdują się silnie konserwowane trójaminokwasowe sekwencje. Substytucje aminokwasów w ich obrębie prowadzą do znaczącego obniżenia aktywności *PDE3*, natomiast usunięcie insertu całkowicie znosi aktywność katalityczną, co wskazuje na ważną rolę insertu w aktywacji enzymu [55].

Późniejsze badania zespołu Hunga z 2006 r. dowodzą, iż insert odpowiedzialny jest za wiązanie cAMP w domenie katalitycznej *PDE3*, gdzie odbywa się hydroliza wiązania fosfodiesterowego w cyklicznym nukleotydzie. Przypuszcza się, że oddziaływanie cAMP z resztami aminokwasowymi insertu skutkuje przyjęciem przez insert konformacji ułatwiającej wprowadzenie cAMP do miejsca aktywnego

Tabela 1. Porównanie sekwencji nukleotydydowej i aminokwasowej izoform PDE3 u myszy, szczura i człowieka. Porównanie sekwencji wykonano w programie ClustalW, natomiast stopień podobieństwa obliczono wykorzystując jedną z funkcji programu JalView

Izoforma (gatunek)	Sekwencje nukleotydydowe		Sekwencje aminokwasowe	
	długość sekwencji [pz]	stopień podobieństwa [%]	długość sekwencji [aa]	stopień podobieństwa [%]
PDE3A1 (człowiek)	3426	59,10%	1141	43,14%
PDE3B (człowiek)	3339		1112	
PDE3A2 (człowiek)	2460	58,59%	819	48,58%
PDE3B (człowiek)	3339		1112	
PDE3A (mysz)	3167	58,65%	1141	42,86%
PDE3B (mysz)	3300		1099	
PDE3A (szczur)	3327	59,23%	1141	42,99%
PDE3B (szczur)	3426		1108	
PDE3A (mysz)	3167	94,54%	1141	96,14%
PDE3A (szczur)	3426		1141	
PDE3A2 (człowiek)	2460	82,69%	819	85,7%
PDE3A (szczur)	3426		1141	
PDE3A2 (człowiek)	2460	83,62%	819	84,85%
PDE3A (mysz)	3167		1141	
PDE3A1 (człowiek)	3426	82,96%	1141	84,29%
PDE3A (szczur)	3426		1141	
PDE3A1 (człowiek)	3426	83,66%	1141	83,68%
PDE3A (mysz)	3167		1141	
PDE3B (szczur)	3327	94,94%	1108	94,17%
PDE3B (mysz)	3300		1099	
PDE3B (człowiek)	3339	82,77%	1112	79,20%
PDE3B (szczur)	3327		1108	
PDE3B (mysz)	3300	83,49%	1099	80,50%
PDE3B (człowiek)	3339		1112	

Tabela 2. Wartości kinetyczne dla poszczególnych izoform PDE3

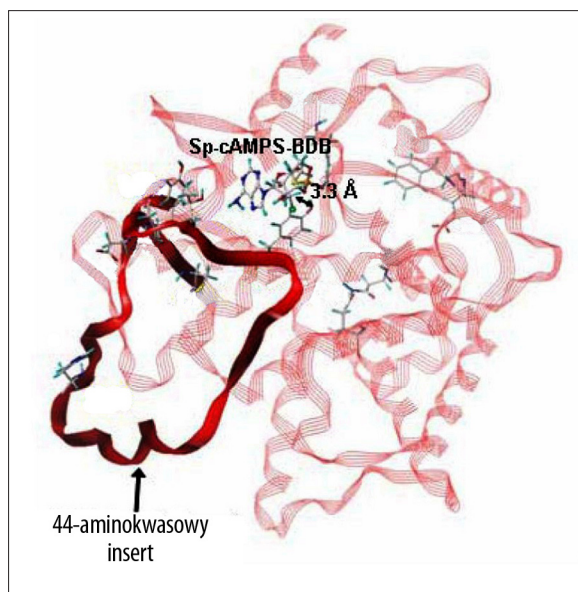
Izoforma PDE3	$K_m$ [ $\mu$ M]		$V_{max}$ [ $\mu$ mol/min/mg]		Gatunek
	cGMP	cAMP	cGMP	cAMP	
PDE3A*	0,02–0,15	0,18	0,34	3,0–6,0	człowiek
PDE3B**	0,28	0,38	2,0	8,5	szczur

\* [18]; \*\* [10].

w fosfodiesterazie [25]. PDE3 są fosfodiesterazami dwu-substratowymi o wysokim powinowactwie względem obu cyklicznych nukleotydów, jednak mechanizm ułatwiający wprowadzenie cAMP do miejsca aktywnego sprawia, że  $V_{max}$  dla cAMP jest 4–18 razy wyższe niż dla cGMP

(tabela 2). W związku z tym uważa się, iż cGMP jest inhibitorem kompetycyjnym hydrolizy cAMP [3]. Stałą inhibicji ( $K_i$ ) wyznaczono w warunkach *in vitro* i wynosi ona 0,06  $\mu$ M [21], potwierdzono także, że inhibicja ta zachodzi w układzie *in vivo* [35].





Ryc. 2. Molekularny model ludzkiej PDE3A z zaznaczonym insertem. Analog cAMP, Sp-cAMPS-BDB wskazuje na umiejscowienie kieszeni wiążącej cAMP (na podstawie [25], zmodyfikowano)

W przeciwieństwie do cAMP mechanizm wiązania cGMP do miejsca aktywnego enzymu nie jest wyjaśniony. Nie stwierdzono oddziaływania cGMP z insertem, co w połączeniu z wysokim powinowactwem tego nukleotydu do miejsca aktywnego PDE3 [24] i niewielkim tempem jego hydrolizy sugerować może mechanizm inhibicji kompetycyjnej, w którym związanie cGMP uniemożliwia wprowadzenie do miejsca katalitycznego cAMP związanego z insertem. Opisany mechanizm inhibicji kompetycyjnej wskazuje na ważną funkcję PDE3 w sprzężeniu szlaków sygnałowych cyklicznych nukleotydów.

### REGULACJA AKTYWNOŚCI FOSFODIESTERAZ RODZINY 3

#### Domena regulatorowa determinuje umiejscowienie PDE3 w komórce

Domena regulatorowa znajdująca się na N-końcu PDE3 zapewnia, podobnie jak i domena katalityczna, swoiste własności PDE3 m.in. determinując wewnątrzkomórkowe umiejscowienie białka, za co odpowiedzialne są dwa regiony hydrofobowe. Większy region, NHR1, znajdujący się bliżej końca N białka tworzy sześć hydrofobowych helis pozwalających na zakotwiczenie PDE3 w błonach. Natomiast mniejszy region, NHR2, odpowiedzialny jest za kierowanie enzymu w odpowiednią lokalizację komórkową [52] oraz uczestniczy w oddziaływaniach z białkami błonowymi [56]. Badania wykazują, że usunięcie regionu NHR1 skutkuje pojawieniem się PDE3 we frakcji cytosolowej, natomiast brak obu hydrofobowych regionów powoduje całkowitą rozpuszczalność izoform [27]. Izoformy PDE3, ze względu na alternatywne składanie mRNA, charakteryzują się różnymi długościami domeny N-końcowej (ryc. 1), co warunkuje zróżnicowaną lokalizację subkomórkową [56]. Izoformy PDE3A1 i PDE3B, mające oba regiony NHR, występują w komórce głównie w postaci nierozpuszczalnej. Związane są nie tylko z błoną komórkową, ale również z siateczką śródplazmatyczną [52], aparatem Golgiego, endosomami [16] oraz z błoną jądrową [32]. Natomiast dwie

pozostałe izoformy PDE3A spotyka się zarówno w postaci związanej z błonami, jak i w postaci rozpuszczalnej w cytosolu, co związane jest z częściowym lub całkowitym brakiem regionów NHR1 i NHR2 [56]. Domena regulatorowa determinując subkomórkowe umiejscowienie PDE3 zawęża jej funkcjonowanie do konkretnego przedziału komórkowego. Warunkuje to działalność PDE3 na skalę lokalną, w ściśle określonym miejscu w komórce, a przez to uczestnictwo w konkretnych kaskadach sygnałowych. Na przykład zarówno PDE3B, jak i receptor insuliny związane są z błoną komórkową w obrębie kaweoli, niewielkich wklęsłych błon komórkowej, nie dziwi więc uczestnictwo PDE3B w szlakach sygnałowych insuliny [40].

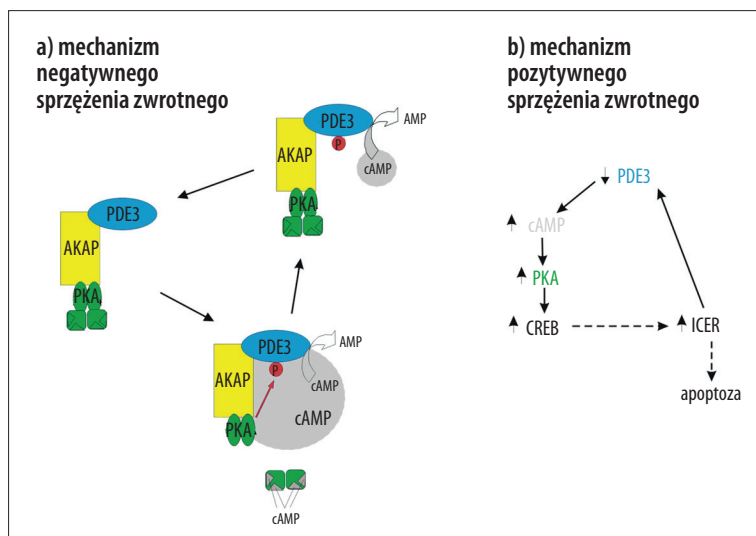
#### Fosforylacje PDE3 w domenach regulatorowych wzmagają aktywność katalityczną enzymu

PDE3 mimo unikalnego mechanizmu wprowadzania cAMP do miejsca katalitycznego wykazują małą aktywność katalityczną w porównaniu z fosfodiesterazami m.in. rodziny 1 i 2. Stąd też aktywność PDE3 wzmagana jest w wyniku modyfikacji białka przez swoiste kinazy. Jednocześnie taki mechanizm aktywacji determinuje udział PDE3 w kaskadach sygnałowych, gdzie niezbędne jest połączenie sygnału przekazywanego przez kinazy białkowe z metabolizmem cAMP. Aktywacja PDE3 przez swoiste kinazy białkowe wiąże się z fosforylacją określonych reszt seryny znajdujących się w domenie regulatorowej PDE3 między domenami hydrofobowymi [41]. *In vivo* PDE3 fosforylowana jest głównie w odpowiedzi na insulinę, glukagon, trombinę oraz hormony wzrostu [16,42], jednak nie każda fosforylacja w odpowiedzi na te czynniki prowadzi do aktywacji fosfodiesterazy [30]. W zależności od izoformy PDE3 i gatunku organizmu, z którego pochodzi, fosforylacji ulegają różne reszty seryny [28,47]. Ponadto, zależnie od pozycji reszty seryny, reakcję fosforylacji katalizuje kinaza białkowa A (PKA), kinaza białkowa B (PKB) [19,42] lub kinaza białkowa C (PKC) [26]. Niedawne doniesienie opublikowane przez zespół Rybalkina sugeruje także zaangażowanie kinazy białkowej G (PKG) w fosforylację PDE3A [50].

Aktywacja PDE3 w wyniku fosforylacji, ze względu na działalność fosfataz, przynosi jedynie krótkotrwały efekt. Może on zostać przedłużony przez wiązanie się białka 14-3-3 do niektórych fosforylowanych reszt seryny. Pełni ono funkcję ochronną, zapobiegając szybkiej defosforylacji PDE3, przez co przedłuża aktywność enzymu. Związanie białka 14-3-3 do obu izoform PDE3 zależne jest, podobnie jak i sama fosforylacja PDE3, od wielu czynników, m.in. fosforylowania odpowiedniej reszty seryny, typu kinazy katalizującej reakcję fosforylacji oraz czynnika zewnętrznego wywołującego fosforylację PDE3 [26,42,45]. Na przykład w odpowiedzi na trombinę i prostaglandynę E1 dochodzi do fosforylacji tych samych reszt serynowych, jednakże tylko w odpowiedzi na trombinę obserwuje się wiązanie białka 14-3-3 do PDE3A [26].

#### Transdukcja sygnału zależy od utworzenia makromolekularnego kompleksu PDE3 z białkami sygnałowymi

Fosforylacja określonych reszt serynowych znajdujących się w domenie regulatorowej PDE3 wpływa nie tylko na



Ryc. 3. Regulacja aktywności PDE3 przez sprzężenia zwrotne: (a) negatywne (na podstawie [17], zmodyfikowano) oraz (b) pozytywne (na podstawie [13], zmodyfikowano); szczegółowy opis w tekście

aktywację enzymu, ale także sprzyja tworzeniu oddziaływań z innymi białkami. Obserwuje się asocjację fosforylowanej PDE3 z aktywowanymi receptorami insuliny [49] oraz leptyny [14]. Natomiast izoformy PDE3 zakotwiczone w błonie komórkowej, w raftach lipidowych mogą asocjować z kaweoliną 1 [40]. Oddziaływania te spełniają ważną rolę zarówno w aktywacji PDE3, jak i w transdukcji odpowiedniego sygnału, zwłaszcza w przypadku sprzęgania przez PDE3 szlaków sygnałowych z udziałem kinaz białkowych i cAMP.

W wielu przypadkach aktywacja swoistej kinazy białkowej nie jest wystarczająca do aktywacji PDE3, wymagane jest natomiast utworzenie makromolekularnego kompleksu z udziałem PDE3. Na przykład w adipocytach aktywacja PDE3B w odpowiedzi na insulinę wymaga utworzenia makromolekuły, w skład której wchodzi m.in. receptor insuliny oraz PKB. Kinaza białkowa B jest niezbędnym elementem kompleksu, gdyż prawdopodobnie rekrutuje PDE3B do makromolekuły, a następnie ją fosforyluje [1]. Podobną zależność obserwuje się w kardiomiocytach mysich, gdzie w skład makromolekuły wchodzi m.in. PI3K odpowiedzialna za aktywację kinazy fosforylującej PDE3B oraz za rekrutację PDE3B do kompleksu makromolekularnego [43].

Podkreślić należy, że makrokompleksy, w skład których wchodzi PDE3, są ważnym elementem wielu kaskad sygnałowych. W komórkach śródbłonna kompleks tworzony przez PDE3B, EPAC1 oraz PI3K uczestniczy w szlakach sygnałowych prowadzących do angiogenezy. Udowodniono, że PDE3B zabezpiecza przed niepożądaną aktywacją EPAC1 przez chwilowe fluktuacje w podstawowej puli cAMP. Dzięki temu tylko silny wzrost stężenia cAMP, przewyższający wydajność PDE3B, doprowadza do aktywacji EPAC1, co z kolei wpływa na aktywację PI3K i prowadzi do aktywacji dalszej kaskady sygnałowej [57].

### Złożone mechanizmy regulacji aktywności PDE3

O ile aktywacja PDE3 jest głównie związana z jej fosforylacją w odpowiedzi na różne czynniki zewnątrzkomórkowe, o tyle regulacja aktywności PDE3 jest procesem o wiele bardziej skomplikowanym, w którym istotną rolę odgrywa

cGMP jako inhibitor kompetycyjny hydrolizy cAMP, ale także mechanizmy zwane sprzężeniami zwrotnymi. Na przykładzie komórek PC12 zasugerowano, że aktywność PDE3 może być regulowana przez negatywne sprzężenie zwrotne. W komórkach tych PDE3 wchodzi w skład złożonej makromolekuły. Wzrost stężenia cAMP wpływa na aktywację PKA (także należącej do kompleksu), która fosforyluje i aktywuje PDE3, co objawia się wzmoczoną hydrolizą cAMP. Lokalne obniżenie stężenia cAMP powoduje osłabienie, a w końcu całkowite zatrzymanie aktywacji PKA. W konsekwencji dochodzi do defosforylacji PDE3 i zahamowania aktywności enzymu. Podsumowując, jeśli wysoki poziom cAMP nie jest stale utrzymywany, dochodzi do szybkiej dezaktywacji PDE3 (ryc. 3a) [17].

Opisany został również proces nieprawidłowego zmniejszenia aktywności PDE3 oparty na mechanizmie pozytywnego sprzężenia zwrotnego. U ludzi z niewydolnością serca obserwuje się obniżoną ekspresję PDE3B oraz zmniejszenie ilości funkcjonalnego białka, a jednocześnie podniesienie ekspresji wczesnego represora indukowanego cAMP (ICER – inducible cAMP early repressor) [12]. Za aktywację genu kodującego ICER odpowiedzialny jest czynnik transkrypcyjny CREB, jednocześnie represor ICER powoduje wyciszenie ekspresji genów aktywowanych przez CREB. Badania wykazały, że ICER hamuje również ekspresję genu *PDE3B* prowadząc do wzmoczonej aktywacji szlaku cAMP/PKA, który bezpośrednio (PKA stabilizuje strukturę białka ICER) lub pośrednio przez fosforylację i aktywację CREB wpływa na zwiększenie ekspresji ICER (ryc. 3b). W ten sposób następuje zapętlenie, niski poziom PDE3B wpływa na podwyższenie ekspresji ICER, który z kolei hamuje ekspresję PDE3B [13]. W rezultacie długotrwały, wysoki poziom represora ICER powoduje wyciszenie ekspresji genów antyapoptotycznych i prowadzi do apoptozy kardiomiocytów.

### ROLA FOSFODIESTERAZ TYPU 3 W TRANSDUKCJI SYGNAŁU WEWNĄTRZ KOMÓRKI

#### Rola PDE3 jako fosfodiesterazy hydrolizującej cAMP

Komercyjna dostępność i mnogość selektywnych inhibitorów PDE3 sprzyja ich powszechnemu wykorzystaniu

w badaniach. Pozwoliło to na poznanie roli PDE3 w wielu procesach fizjologicznych, w których fosfodiesteraza, aktywowana przez swoistą kinazę białkową, odpowiedzialna jest głównie za hydrolizę cAMP w nieobecności cGMP. PDE3 pełni taką funkcję w agregacji płytek krwi [15], powstawaniu stanów zapalnych wywołanych endotoksyną [8] lub niedotlenieniem mięśnia sercowego [11] oraz prawdopodobnie w procesach związanych z uczeniem się i zapamiętywaniem [62]. Izoforma PDE3A jest niezwykle istotna w prawidłowym rozwoju, dojrzewaniu i owulacji oocytów. Nokaut genu *PDE3A* skutkuje wzmocnieniem sygnału przekazywanego przez szlak cAMP/PKA i zahamowaniem Cdc25B, fosfatazy aktywującej Cdc2, białka wymaganego do przejścia cyklu komórkowego z fazy G2 do fazy M. Prowadzi to do całkowitej bezpłodności myszy płci żeńskiej [2,34]. Podobna sytuacja zdarza się w komórkach mięśni gładkich naczyń, gdzie brak funkcjonalnego białka PDE3A rozregulowuje szlak cAMP/PKA oraz szlak kinaz białkowych ERK1/2, powodując zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 [2].

Ponadto PDE3 uczestniczy w regulacji kurczliwości mięśnia sercowego, w którym aktywowana jest w odpowiedzi na związanie agonisty do receptora  $\beta$ -adrenergicznego zależnie od PI3K $\gamma$  [33] oraz w regulacji kurczliwości naczyń mięśni gładkich, gdzie ekspresja tej fosfodiesterazy jest zmienna i zależna od stadium rozwoju komórki [36]. Również w kaskadach sygnałowych aktywowanych przez insulinę PDE3 pełni ważną rolę. Zaangażowana jest mianowicie w regulację transportu glukozy z krwi do komórek, co związane jest z efektem antylipolitycznym insuliny [63].

Jednak fosfodiesteraza ta, modulując stężenie cAMP, odpowiedzialna jest za kontrolę uwalniania insuliny. Badania wykazują, że już niewielka nadekspresja izoformy PDE3B w komórkach  $\beta$  znacznie osłabia sekrecję insuliny w odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy we krwi oraz prowadzi do zaburzeń w szkieletce komórkowym wysepki Langerhansa, co objawia się nietolerancją glukozy i skutkować może rozwojem cukrzycy typu 2 [9,20].

Badania na komórkach PC12 potwierdzają także zaangażowanie PDE3 w regulację odpowiedzi na nerwowy czynnik wzrostu (NGF) i naskórkowy czynnik wzrostu (EGF). Wzrost stężenia cAMP w wyniku zahamowania aktywności tej fosfodiesterazy skutkuje aktywacją PKA i zwiększeniem fosforylacji kinaz białkowych ERK1/2, w konsekwencji prowadząc do różnicowania komórek PC12 [17,22]. Natomiast w komórkach mezangium (tkanki łącznej umiejscowionej między naczyniami w ciałkach nerkowych) zahamowanie aktywności PDE3 i w konsekwencji wzrost stężenia cAMP prowadzi do zależnej od PKA fosforylacji swoistych reszt serynowych w kinazie białkowej Raf-1 uniemożliwiając aktywację tego białka, co prowadzi do zahamowania aktywacji szlaku kinaz białkowych ERK1/2 i objawia się zatrzymaniem proliferacji tych komórek [7].

### **Rola PDE3 w łączeniu szlaków sygnałowych cyklicznych nukleotydów w odpowiedzi na peptydy natriuretyczne**

Dwusubstratowość PDE3, a zarazem hamowanie ich aktywności przez cGMP, umożliwia połączenie szlaków

sygnałowych cyklicznych nukleotydów. Jest to druga, oprócz sprzęgania sygnału przekazywanego przez kinazy białkowe ze szlakami zależnymi od cAMP, funkcja PDE3 w transdukcji sygnału. Łączenie kaskad sygnałowych cyklicznych nukleotydów przez PDE3 jest dobrze scharakteryzowane w szlakach sygnałowych peptydów natriuretycznych. Zarówno receptory peptydów natriuretycznych [6], jak i izoforma PDE3B zakotwiczone są w błonie komórkowej w obrębie raft lipidowych zwanych kaweolami [40]. Ponieważ struktury te wprowadzają przedziałowość wewnątrz komórki, PDE3 uczestniczyć może także w odpowiedzi na inne czynniki zewnątrzkomórkowe, których receptory znajdują się w obrębie kaweoli [40].

Rola PDE3 w szlakach sygnałowych peptydów natriuretycznych związana jest z kontrolą poziomu cAMP w odpowiedzi na zmieniające się stężenie cGMP. Peptydy natriuretyczne aktywując receptory sprzężone z cyklazami guanylanowymi, NPR-A i NPR-B, wpływają na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cGMP. Powoduje to kompetycyjne hamowanie aktywności PDE3 [53] i w następstwie wzrost stężenia cAMP oraz aktywację PKA [46]. W miocytach sercowych kaskada ta prowadzi do fosforylacji przez PKA kanałów wapniowych typu L [61], co skutkuje zwiększonym napływem jonów wapnia do wnętrza komórki [53]. Fizjologicznym efektem tej kaskady sygnałowej jest zwiększenie częstości skurczu mięśnia sercowego w sposób bezpośredni [53] lub pośredni przez wzmocnienie sygnału pochodzącego z aktywowanych receptorów  $\beta$ -adrenergicznych [46].

Jednakże do niedawna powszechnie uważano, iż hamowanie aktywności PDE3 przez peptydy natriuretyczne skutkuje zmniejszeniem częstości skurczu mięśnia sercowego, a więc efektem odwrotnym. Przekonanie to potwierdzają badania wykonane na komórkach prawego nerwu błędnego, w którym peptydy natriuretyczne wpływają na podwyższenie stężenia cGMP i zahamowanie aktywności PDE3. To skutkuje aktywacją szlaku cAMP/PKA i fosforylacją kanałów wapniowych typu L i N powodując napływ jonów wapniowych z przestrzeni synaptycznej do komórki. W konsekwencji prowadzi to do uwolnienia acetylocholinu do przestrzeni synaptycznej i objawia się zwolnieniem częstości akcji serca oraz zmniejszeniem siły skurczu mięśnia sercowego [23]. Jak można zaobserwować, w następstwie aktywacji receptorów natriuretycznych i kaskady sygnałowej: wzrost stężenia cGMP  $\rightarrow$  hamowanie aktywności PDE3  $\rightarrow$  wzrost stężenia cAMP, w różnych typach komórek obserwuje się odmienny efekt biologiczny.

Najnowsze badania wykazują, że zahamowanie aktywności PDE3 w odpowiedzi na peptydy natriuretyczne pobudza uwalnianie katecholamin zarówno z zakończeń nerwów współczulnych, jak i z komórek PC12 różnicowanych NGF. Sugeruje się także, że PDE3 nie jest bezpośrednio hamowana przez cGMP, lecz przez kinazę białkową G, aktywowaną podwyższonym stężeniem tego cyklicznego nukleotydu. Obniżenie aktywności PDE3 skutkuje, tak jak opisano wyżej, aktywacją szlaku cAMP/PKA i w konsekwencji wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, co przekłada się na uwalnianie katecholamin z komórki [5]. W warunkach fizjologicznych zahamowanie uwalniania katecholamin w odpowiedzi na peptyd natriuretyczny, poprzez oddziaływanie na aktywność PDE3,



stwarzałyby nowe możliwości w terapii pacjentów z guzem chromochłonnym rdzenia nadnerczy [44].

## PODSUMOWANIE

Fosfodiesterazy rodziny 3 są fosfodiesterazami dwusubstratowymi hydrolizującymi oba cykliczne nukleotydy, mimo to badania wykazują, że ich główną funkcją w komórce jest hydroliza cAMP. Swoiste właściwości PDE3 wynikające z budowy i złożonych sposobów regulacji decydują o szczególnej roli w łączeniu szlaków cyklicznego AMP z innymi kaskadami sygnałowymi. Opisano dwa odmienne mechanizmy działania PDE3. Niespotykany w innych

fosfodiesterazach sposób wprowadzania cAMP do miejsca katalicznego enzymu oraz wyjątkowa regulacja aktywności PDE3 przez cGMP, który kompetycyjnie hamuje się hydrolizę cAMP, powoduje że PDE3 odpowiedzialne są za sprzężanie szlaków sygnałowych tych cyklicznych nukleotydów. Natomiast fosforylacja określonych reszt serynowych, powodująca wzrost aktywności katalicznej PDE3, pozwala na zaangażowanie tej fosfodiesterazy w łączenie kaskad sygnałowych kinaz białkowych z metabolizmem cAMP. Te dwie odmienne funkcje PDE3 determinują jej udział w różnorodnych procesach komórkowych m.in. w odpowiedzi na peptydy natriuretyczne oraz niektóre hormony i czynniki wzrostu.

## PIŚMIENICTWO

- Ahmad F., Lindh R., Tang Y., Weston M., Degerman E., Manganiello V.C.: Insulin-induced formation of macromolecular complexes involved in activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B (PDE3B) and its interaction with PKB. *Biochem. J.*, 2007; 404: 257–268
- Begum N., Shen W., Manganiello V.: Role of PDE3A in regulation of cell cycle progression in mouse vascular smooth muscle cells and oocytes: implications in cardiovascular diseases and infertility. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2011; 11: 725–729
- Bender A.T., Beavo J.A.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.*, 2006; 58: 488–520
- Bristow M.R., Taylor M.R., Slavov D., Blain-Nelson P.L., Nunley K.R., Medway A.M., Sucharov C.C.: A polymorphism in the Pde3a gene promoter that prevents cAMP-induced increases in transcriptional activity, and may protect against Pde3a inhibitor drug tolerance. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2010; 55: A10–A13
- Chan N.Y., Seyed N., Takano K., Levi R.: An unsuspected property of natriuretic peptides: promotion of calcium-dependent catecholamine release via protein kinase G-mediated phosphodiesterase type 3 inhibition. *Circulation*, 2012; 125: 298–307
- Chen W., Gaßner B., Börner S., Kuhn M.: Atrial natriuretic peptide increases the albumin permeability of mouse skeletal muscle microcirculation by the caveolae-mediated transcellular pathway. *BMC Pharmacology*, 2011; 11(Suppl.1): P16
- Cheng J., Thompson M.A., Walker H.J., Gray C.E., Diaz Encarnacion M.M., Warner G.M., Grande J.P.: Differential regulation of mesangial cell mitogenesis by cAMP phosphodiesterase isozymes 3 and 4. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2004; 287: F940–F953
- Choi W.I., Kwon K.Y., Seo J.W., Beagle J., Quinn D.A., Hales C.A.: The role of phosphodiesterase 3 in endotoxin-induced acute kidney injury. *BMC Infect. Dis.*, 2009; 9:–80
- Degerman E., Ahmad F., Chung Y.W., Guirguis E., Omar B., Stenson L., Manganiello V.: From PDE3B to the regulation of energy homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2011; 11: 676–682
- Degerman E., Belfrage P., Newman A.H., Rice K.C., Manganiello V.C.: Purification of the putative hormone-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase from rat adipose tissue using a derivative of cilostamide as a novel affinity ligand. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 5797–5807
- Di Paola R., Mazzon E., Paterniti I., Impellizzeri D., Bramanti P., Cuzzocrea S.: Olprinone, a PDE3 inhibitor, modulates the inflammation associated with myocardial ischemia – reperfusion injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011; 650: 612–620
- Ding B., Abe J., Wei H., Huang Q., Walsh R.A., Molina C.A., Zhao A., Sadoshima J., Blaxall B.C., Berk B.C., Yan C.: Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation*, 2005; 111: 2469–2476
- Ding B., Abe J., Wei H., Xu H., Che W., Aizawa T., Liu W., Molina C.A., Sadoshima J., Blaxall B.C., Berk B.C., Yan C.: A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 14771–14776
- Elbatarny H.S., Maurice D.H.: Leptin-mediated activation of human platelets: involvement of a leptin receptor and phosphodiesterase 3A-containing cellular signaling complex. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2005; 289: E695–E702
- Feijge M.A., Ansink K., Vanschoonbeek K., Heemskerk J.W.: Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type-3. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 67: 1559–1567
- Geoffroy V., Fouque F., Lugnier C., Desbuquois B., Benelli C.: Characterization of an *in vivo* hormonally regulated phosphodiesterase 3 (PDE3) associated with a liver Golgi-endosomal fraction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001; 387: 154–162
- Gormand A.: The crosstalk between the ERK and the cAMP signaling pathways in PC12 cells. PhD thesis, University of Glasgow, 2008
- Grant P.G., Colman R.W.: Purification and characterization of a human platelet cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemistry*, 1984; 23: 1801–1807
- Han S. J., Vaccari S., Nedachi T., Andersen C.B., Kovacina K.S., Roth R.A., Conti M.: Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. *EMBO J.*, 2006; 25: 5716–5725
- Härndahl L., Wierup N., Enerbäck S., Mulder H., Manganiello V.C., Sundler F., Degerman E., Ahrén B., Holst L.S.:  $\beta$ -cell-targeted overexpression of phosphodiesterase 3B in mice causes impaired insulin secretion, glucose intolerance, and deranged islet morphology. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 15214–15222
- Harrison S.A., Reifsnnyder D.H., Gallis B., Cadd G.G., Beavo J.A.: Isolation and characterization of bovine cardiac muscle cGMP-inhibited phosphodiesterase: a receptor for new cardiotoxic drugs. *Mol. Pharmacol.*, 1986; 29: 506–514
- Herbst K.J., Allen M.D., Zhang J.: Spatiotemporally regulated protein kinase A activity is a critical regulator of growth factor-stimulated extracellular signal-regulated kinase signaling in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2011; 31: 4063–4075
- Herring N., Zaman J.A., Paterson D.J.: Natriuretic peptides like NO facilitate cardiac vagal neurotransmission and bradycardia via a cGMP pathway. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2001; 281: H2318–H2327
- Hung S.H., Liu A.H., Pixley R.A., Francis P., Williams L.D., Matsko C.M., Barnes K.D., Sivendran S., Colman R.F., Colman R.W.: A new nonhydrolyzable reactive cGMP analogue, (Rp)-guanosine-3',5'-cyclic-S-(4-bromo-2,3-dioxobutyl)monophosphorothioate, which targets the cGMP binding site of human platelet PDE3A. *Bioorg. Chem.*, 2008; 36: 141–147
- Hung S.H., Zhang W., Pixley R.A., Jameson B.A., Huang Y.C., Colman R.F., Colman R.W.: New insights from the structure-function analysis of the catalytic region of human platelet phosphodiesterase 3A: a role for the unique 44-amino acid insert. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 29236–29244
- Hunter R.W., Mackintosh C., Hers I.: Protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of PDE3A regulate cAMP levels in human platelets. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 12339–12348
- Kenan Y., Murata T., Shakur Y., Degerman E., Manganiello V.C.: Functions of the N-terminal region of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE 3) isoforms. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 12331–12338
- Kitamura T., Kitamura Y., Kuroda S., Hino Y., Ando M., Kotani K., Konishi H., Matsuzaki H., Kikkawa U., Ogawa W., Kasuga M.: Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 6286–6296
- Lakics V., Karran E.H., Boess F.G.: Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*, 2010; 59: 367–374
- Lindh R., Ahmad F., Resjö S., James P., Yang J.S., Fales H.M., Manganiello V., Degerman E.: Multisite phosphorylation of adipocyte and hepatocyte phosphodiesterase 3B. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1773: 584–592



- [31] Lugnier C.: Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.*, 2006; 109: 366–398
- [32] Lugnier C., Keravis T., Le Bec A., Pauvert O., Proteau S., Rousseau E.: Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1472: 431–446
- [33] Marcantoni A., Levi R.C., Gallo M.P., Hirsch E., Alloati G.: Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) controls L-type calcium current (I<sub>Ca,L</sub>) through its positive modulation of type-3 phosphodiesterase (PDE3). *J. Cell. Physiol.*, 2006; 206: 329–336
- [34] Masciarelli S., Horner K., Liu C., Park S. H., Hinkley M., Hockman S., Nedachi T., Jin C., Conti M., Manganiello V.: Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J. Clin. Invest.*, 2004; 114: 196–205
- [35] Maurice D.H., Haslam R.J.: Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol. Pharmacol.*, 1990; 37: 671–681
- [36] Maurice D.H., Palmer D., Tilley D.G., Dunkerley H.A., Netherton S.J., Raymond D.R., Elbatarny H.S., Jimmo S.L.: Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol. Pharmacol.*, 2003; 64: 533–546
- [37] Miki T., Taira M., Hockman S., Shimada F., Lieman J., Napolitano M., Ward D., Makino H., Manganiello V.C.: Characterization of the cDNA and gene encoding human PDE3B, the cGMP1 isoform of the human cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase family. *Genomics*, 1996; 36: 476–485
- [38] Movsesian M., Stehlik J., Vandeput F., Bristow M.R.: Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Heart Fail. Rev.*, 2009; 14: 255–263
- [39] Movsesian M., Wever-Pinzon O., Vandeput F.: PDE3 inhibition in dilated cardiomyopathy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2011; 11: 707–713
- [40] Nilsson R., Ahmad F., Swärd K., Andersson U., Weston M., Manganiello V., Degerman E.: Plasma membrane cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B (PDE3B) is associated with caveolae in primary adipocytes. *Cell. Signal.*, 2006; 18: 1713–1721
- [41] Omori K., Kotera J.: Overview of PDEs and their regulation. *Circ. Res.*, 2007; 100: 309–327
- [42] Palmer D., Jimmo S.L., Raymond D.R., Wilson L.S., Carter R.L., Maurice D.H.: Protein kinase A phosphorylation of human phosphodiesterase 3B promotes 14-3-3 protein binding and inhibits phosphatase-catalyzed inactivation. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 9411–9419
- [43] Patrucco E., Notte A., Barberis L., Selvetella G., Maffei A., Brancaccio M., Marengo S., Russo G., Azzolino O., Rybalkin S.D., Silengo L., Altruda F., Wetzker R., Wymann M.P., Lembo G., Hirsch E.: PI3K $\gamma$  modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*, 2004; 118: 375–387
- [44] Porzionato A., Macchi V., Rucinski M., Malendowicz L.K., De Caro R.: Natriuretic peptides in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 2010; 280: 1–39
- [45] Pozuelo Rubio M., Campbell D.G., Morrice N.A., Mackintosh C.: Phosphodiesterase 3A binds to 14-3-3 proteins in response to PMA-induced phosphorylation of Ser428. *Biochem. J.*, 2005; 392: 163–172
- [46] Qvigstad E., Moltzau L.R., Aronsen J.M., Nguyen C.H., Hougen K., Sjaastad I., Levy F.O., Skomedal T., Osnes J.B.: Natriuretic peptides increase  $\beta$ 1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition. *Cardiovasc. Res.*, 2010; 85: 763–772
- [47] Rahn T., Rönstrand L., Leroy M.J., Wernstedt C., Tornqvist H., Manganiello V.C., Belfrage P., Degerman E.: Identification of the site in the cGMP-inhibited phosphodiesterase phosphorylated in adipocytes in response to insulin and isoproterenol. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 11575–11580
- [48] Reinhardt R.R., Chin E., Zhou J., Taira M., Murata T., Manganiello V.C., Bondy C.A.: Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Clin. Invest.*, 1995; 95: 1528–1538
- [49] Rondinone C.M., Carvalho E., Rahn T., Manganiello V.C., Degerman E., Smith U.P.: Phosphorylation of PDE3B by phosphatidylinositol 3-kinase associated with the insulin receptor. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 10093–10098
- [50] Rybalkin S.D., Rybalkina I.G., Beavo J.A.: Phosphorylation of cAMP hydrolyzing PDE (PDE3A) by cGMP-dependent protein kinase (PKG) in human platelets. *BMC Pharmacology*, 2007; 7(Suppl.1): S29
- [51] Sano R., Miki T., Suzuki Y., Shimada F., Taira M., Kanatsuka A., Makino H., Hashimoto N., Saito Y.: Analysis of the insulin-sensitive phosphodiesterase 3B gene in type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2001; 54: 79–88
- [52] Shakur Y., Takeda K., Kenan Y., Yu Z.X., Rena G., Brandt D., Houslay M.D., Degerman E., Ferrans V.J., Manganiello V.C.: Membrane localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3). Two N-terminal domains are required for the efficient targeting to, and association of, PDE3 with endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 38749–38761
- [53] Springer J., Azer J., Hua R., Robbins C., Adamczyk A., McBoyle S., Bissell M.B., Rose R.A.: The natriuretic peptides BNP and CNP increase heart rate and electrical conduction by stimulating ionic currents in the sinoatrial node and atrial myocardium following activation of guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2012; 52: 1122–1134
- [54] Sun B., Li H., Shakur Y., Hensley J., Hockman S., Kambayashi J., Manganiello V.C., Liu Y.: Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. *Cell. Signal.*, 2007; 19: 1765–1771
- [55] Tang K.M., Jang E.K., Haslam R.J.: Expression and mutagenesis of the catalytic domain of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3) cloned from human platelets. *Biochem. J.*, 1997; 323: 217–224
- [56] Wechsler J., Choi Y.H., Krall J., Ahmad F., Manganiello V.C., Movsesian M.A.: Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 38072–38078
- [57] Wilson L.S., Baillie G.S., Pritchard L.M., Umana B., Terrin A., Zaccolo M., Houslay M.D., Maurice D.H.: A phosphodiesterase 3B-based signaling complex integrates exchange protein activated by cAMP 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signals in human arterial endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 16285–16296
- [58] Witwicka H., Kobińska M., Siednienko J., Mitkiewicz M., Gorczyca W.A.: Expression and activity of cGMP-dependent phosphodiesterases is up-regulated by lipopolysaccharide (LPS) in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1773: 209–218
- [59] Wróblewska H., Gorczyca W.A.: Fosfodiesterazy cyklicznego cGMP. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2001; 55: 611–627
- [60] Xu Y., Zhang H.T., O'Donnell J.M.: Phosphodiesterases in the central nervous system: implications in mood and cognitive disorders. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2011; 204: 447–485
- [61] Yan X., Gao S., Tang M., Xi J., Gao L., Zhu M., Luo H., Hu X., Zheng Y., Hescheler J., Liang H.: Adenylyl cyclase/cAMP-PKA-mediated phosphorylation of basal L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mouse embryonic ventricular myocytes. *Cell Calcium*, 2011; 50: 433–443
- [62] Zhao J., Harada N., Kurihara H., Nakagata N., Okajima K.: Cilostazol improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 2010; 58: 774–783
- [63] Zmuda-Trzebiatowska E., Oknińska A., Manganiello V., Degerman E.: Role of PDE3B in insulin-induced glucose uptake, GLUT-4 translocation and lipogenesis in primary rat adipocytes. *Cell. Signal.*, 2006; 18: 382–390

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.