

Received: 2013.05.23
Accepted: 2014.02.19
Published: 2014.05.30

Rola izomerazy disiarczkowej w aktywacji integrzyn

Role of protein disulfide isomerase in activation of integrins

Marcin Popielarski, Halszka Ponamarczuk, Katarzyna Sobierajska, Maria Świątkowska

Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Integryny należą do dużej rodziny transbłonowych receptorów adhezyjnych, których głównym zadaniem jest odbieranie i przekazywanie sygnałów biochemicznych i mechanicznych przez błonę komórkową w obu kierunkach. Integryny i ich ligandy odgrywają główną rolę w licznych fizjologicznych i patologicznych procesach, takich jak migracja, różnicowanie komórek, hemostaza, angiogeneza, inwazja nowotworów i gojenie się ran. Sygnały powstające wewnątrz komórki powodują przejście integryny w stan zdolny do wiązania liganda na skutek zmian konformacyjnych wewnątrz jej cząsteczki. Wiązanie zewnątrzkomórkowych ligandów indukuje również zmiany w strukturze cząsteczki integryny, które są przekazywane do wnętrza komórki. Przejście integrzyn z postaci nieaktywnej do postaci sprzyjającej wiązaniu liganda towarzyszy reorganizacja wiązań disiarczkowych wewnątrz jej cząsteczki. Powstawanie, redukcja i reorganizacja wiązań disiarczkowych katalizowana jest przez izomerazę disiarczkową (PDI). PDI zidentyfikowano na powierzchni wielu typów komórek, takich jak: komórki śródbłonna, wątroby, nowotworowe, trzustki i typu B. Izomeraza disiarczkowa występuje na powierzchni płytek krwi, gdzie odgrywa ważną rolę w procesach adhezji, agregacji i wydzielania. PDI bezpośrednio oddziałuje z integrzynami, a wymiana: grupa tiolowa-disiarczek może wpływać na zmiany przestrzenne podczas aktywacji integrzyn. W pracy omówiono strukturę przestrzenną integrzyn, a także rolę reorganizacji wiązań disiarczkowych w procesie ich aktywacji.

Słowa kluczowe:

integryny • PDI • grupy tiolowe • wiązania disiarczkowe • stan redoks • Ero1 • reakcje utleniania i redukcji

Summary

Integrins belong to a large family of transmembrane cell adhesion receptors that communicate biochemical and mechanical signals in a bidirectional manner across the plasma membrane. Integrins and their ligands play a crucial role in a number of physiological and pathological processes, including cell migration, cell differentiation, hemostasis, adhesion, angiogenesis, cancer, cell invasiveness and wound healing. Intracellular signals switch integrins into a ligand-competent state as a result of conformational changes within the integrin molecule. Binding of extracellular ligands induces structural changes that can transmit signals to the cell interior. Transition of integrins from an inactive to a ligand binding state involves rearrangement of the disulfide bonding pattern. The rearrangement of disulfide bonds is modulated by protein disulfide isomerase (PDI). PDI has been found on the surface of several types of cells, including endothelial cells, hepatocytes, cancer cells, pancreatic cells and B cells. PDI was identified on the platelet surface, where it plays an important role in platelet reactions such as adhesion, aggregation and secretion. PDI was found to directly interact with integrins. Disulfide-thiol exchange mediated by PDI appears to be involved in the conformational changes in integrin activation. In this report we describe the structure of integrin and the role of disulfide bond rearrangement in its activation.

Key words:

integrins • PDI • thiol groups • disulfide bonds • redox state • Ero1 • reduction-oxidation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1105766>

Word count: 5845

Tables: –

Figures: 10

References: 102

Adres autora: mgr Marcin Popielarski, Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 8/9 92-215 Łódź, e-mail: marcin.popielarski87@gmail.com

Wykaz skrótów: **ADMIDAS** – domena przylegająca do domeny MIDAS (adjusted to MIDAS), **CRRs** – regiony bogate w powtórzenia cysteinowe (cysteine-rich repeat regions), **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix), **EGF-like** – powtórzenia sekwencji aminokwasowych podobnych do sekwencji obecnych w naskórkowym czynniku wzrostu (epidermal growth factor-like), **ER** – siateczka śródplazmatyczna (endoplasmic reticulum), **Ero1** – białko o aktywności oksydoreduktazy umiejscowione w siateczce śródplazmatycznej (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1), **FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy, **GSH** – glutation w postaci zredukowanej, **GSSG** – glutation w postaci utlenionej, **Ig-SF** – nadrodzina immunoglobulin (immunoglobulin superfamily), **LIMBS** – domena indukowanego przez ligand wiązania jonów (ligand-associated metal binding site), **MAPK/ERK** – szlak transdukcji sygnału zależny od kinazy aktywowanej mitogenami (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase pathway), **MIDAS** – domena odpowiedzialna za aktywację białka zależną od wiązania jonów (metal ion dependent adhesion site), **PDI** – białkowa izomeraza wiązań disiarczkowych (protein disulfide isomerase), **PSI** – domena obecna w białkach należących do rodzin pleksyn semaforyn lub integryn (plexin/semaforin/integrin domain), **RGD** – motyw zawierający sekwencję aminokwasową Arg-Gly-Asp, **SDL** – pętla determinująca swoistość przyłączania liganda (specificity determining loop).

STRUKTURA INTEGRYN

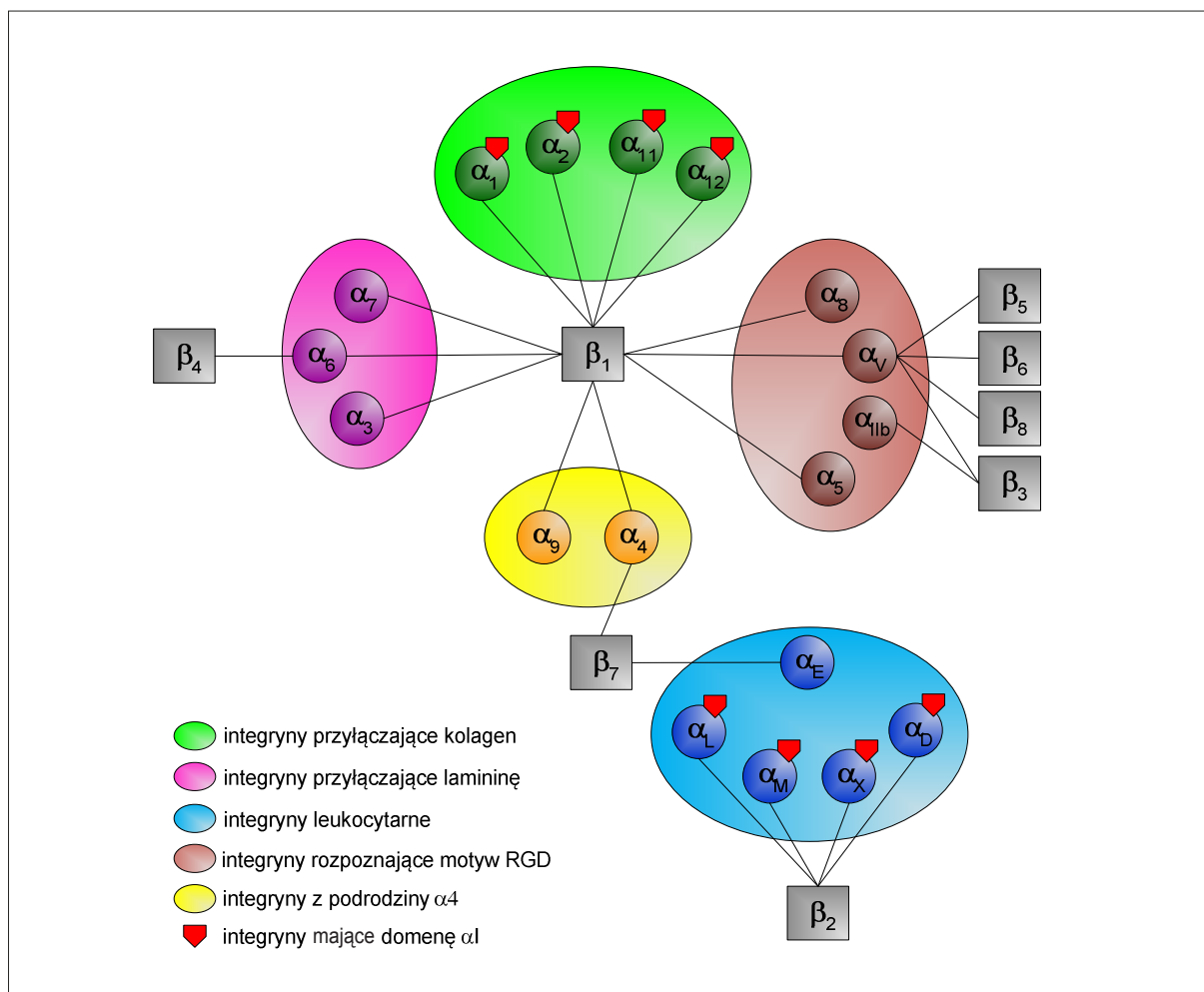
Wśród receptorów odpowiedzialnych za proces adhezji wyróżnia się receptory związane z adhezją między komórkami oraz receptory odpowiedzialne za adhezję komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – extracellular matrix). Do pierwszej grupy należą kadheryny oraz duża grupa białek powierzchniowych tworząca nadrodzinę immunoglobulin Ig-SF (immunoglobulin superfamily) [32]. Do drugiej grupy należą integryny, które występują jedynie w świecie zwierząt, ale są obecne już u prymitywnych organizmów wielokomórkowych, takich jak gąbki lub koralowce [12].

Integryny należą do rodziny receptorów glikoproteinowych. Podstawową właściwością integryn jest zdolność wiązania bardzo różnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak fibronektyna, fibrynogen, witronektyna, laminina, kolagen, plazminogen, osteopontyna, czynnik von Willebranda, czy sialoproteiny szkieletu macierzy. Mimo specjalizacji w kierunku wiązania białek macierzy zewnątrzkomórkowej, integryny mogą być zaangażowane w oddziaływania komórka-komórka [62]. Integryny są wykorzystywane przez mikroorganizmy chorobotwórcze np. echowirusy, adenowirusy, herpeswirusy, jako czynnik umożliwiający wnikanie ich do wnętrza komórek [76,91]. Pośredniczą w przekazywaniu sygnałów związanych z adhezją, migracją, proliferacją, różnicowaniem komórek oraz apoptozą [70]. Ze względu na bardzo dużą

różnorodność ligandów, są zaangażowane w podstawowe dla funkcjonowania organizmu procesy, takie jak utrzymywanie homeostazy, odpowiedź immunologiczną, generowanie stanów zapalnych, nowotworzenie, przemieszczanie się elementów morfotycznych krwi, aktywacja płytek krwi [30], chondrogeniza [5], czy miogeneza [69].

Cząsteczki integryn są zbudowane z łańcucha α i β tworzących niekowalencyjnie związany heterodimer. Wyróżniono 18 różnych łańcuchów α i 8 łańcuchów β , które mogą się łączyć ze sobą dając odpowiednio 24 kombinacje różnych heterodimerów [31]. Integryny są zbudowane z dużej N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej, domeny transbłonowej oraz krótkiej domeny cytoplazmatycznej [1,86,87].

Ze względu na rodzaj przyłączanego liganda integryny można przyporządkować do odpowiednich grup: integryny przyłączające lamininę ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$), przyłączające kolagen ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_{11}\beta_1$), leukocytarne ($\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$) oraz rozpoznające motyw RGD ($\alpha_5\beta_2$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_V\beta_8$, $\alpha_{IIb}\beta_3$). Inny rodzaj klasyfikacji dotyczy występowania w łańcuchu α -swoistego - około 180-200-aminokwasowego regionu wewnętrznego o charakterze kwasowym, określanego mianem domeny α I. Wyróżnia się podjednostki α , które mają domenę α I (α_1 , α_{10} , α_{11} , α_L , α_M , α_X , α_D , α_E) oraz pod-



Ryc.1. Schemat podziału integrin w zależności od tworzących je podjednostek oraz rodzaju przyłączanego liganda. Warto zwrócić uwagę, że jedynie podjednostki α_4 , α_6 i α_V wykazują zdolność tworzenia w pełni funkcjonalnej cząsteczki integriny z więcej niż jedną podjednostką β

jednostki α niemające domeny αI (α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , α_7 , α_8 , α_9 , α_V , α_{1b}) (ryc. 1) [79].

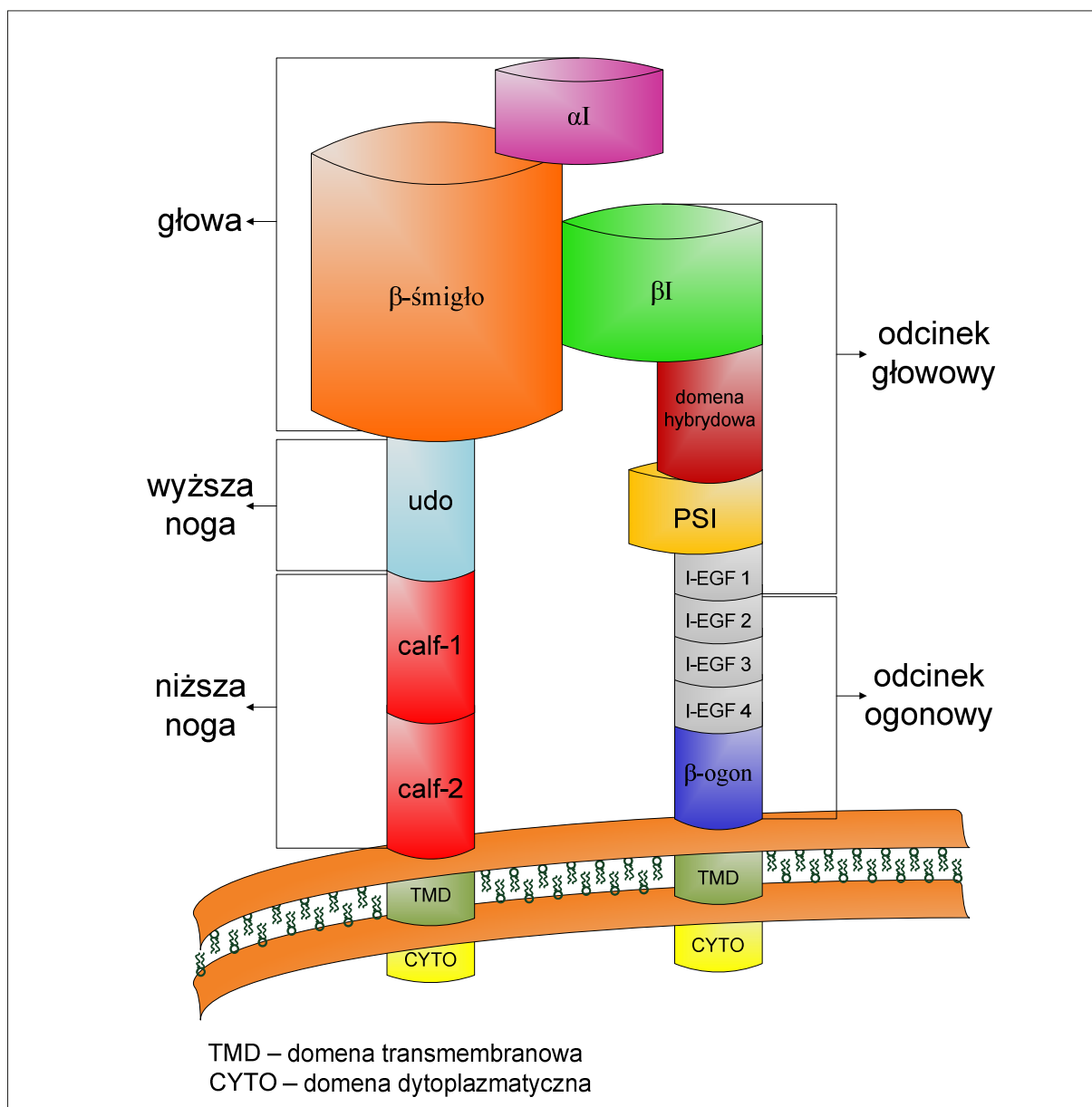
Strukturę przestrzenną integrin opisuje się jako podobną do sylwetki ludzkiej, gdzie globularna „głowa” oparta jest na dwóch „nogach” przechodzących w domenę transbłonową (ryc. 2). Do interakcji między podjednostką α i β dochodzi głównie w obrębie „głowy” [29]. W miejscu interakcji może się tworzyć tzw. motyw wiązania typu RGD, do którego przyłącza się sekwencja Arg-Gly-Asp cząsteczki liganda [99].

W obrębie „głowy” podjednostkę α tworzy struktura β -śmigła (β -propeller) składająca się z siedmiu motywów β -kartki. Jeżeli w podjednostce α danego typu występuje domena αI , to jest umiejscowiona między drugim a trzecim motywem β -kartki. W strukturze β -śmigła są obecne motywy spinki do włosów typu β (β -hairpin), które wiążą jony Ca^{2+} stabilizując całą strukturę „głowy”. W obrębie „nogi” podjednostki α wyróżniamy obszar „wyższej nogi” utworzony przez strukturę określaną mianem uda (thigh) oraz obszar „niższej nogi” składający się z dwóch domen typu „łydka” (calf), odpowiednio calf-1 i calf-2, które są

siadają z regionem transbłonowym. Między strukturą „uda” oraz domeną calf-1 jest obecny region wiążący jony Ca^{2+} określany mianem „kolana” (genu), będący miejscem, w którym dochodzi do zagięcia podjednostki α wówczas, gdy jest ona w konformacji nieaktywnej [48].

Podjednostka β w obrębie „odcinka głowowego” składa się z domeny βI wykazującej duże podobieństwo do domeny αI oraz hybrydowej i PSI (plexin/semaphorin/integrin domain). Nazwa pochodzi od białek, w których ta domena występuje. W regionie „odcinka ogonowego” podjednostkę β tworzą cztery powtórzenia EGF-like (epidermal growth factor-like) oraz terminalna domena β -ogona (β -tail) [57]. Zarówno domena PSI, jak i regiony I-EGF są bogate w reszty cysteinowe tworzące między sobą wiązania disiarczkowe [71,98].

Dojrzałe, w pełni funkcjonalne podjednostki α , takie jak α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , α_7 , α_8 , α_9 , α_V , α_{1b} i α_E powstają w wyniku obróbki potranslacyjnej polegającej na proteolitycznym trawieniu odpowiednich prekursorów. Enzymatyczne cięcie białka odbywa się w obrębie motywu: Arg-Xxx-Arg/



Ryc. 2. Schemat budowy integryn. Stosunek wielkości domen pokazanych na rycinie w przybliżeniu odpowiada realnemu stosunkowi wielkości domen w obrębie białka

Lys-Arg lub motywu: His-Xxx-Xxx-Xxx-Arg/Lys-Arg i prowadzi do utworzenia C-końcowego lekkiego łańcucha oraz N-końcowego ciężkiego łańcucha. Łańcuch lekki ma masę około 25 kDa i jest zbudowany z domeny cytoplazmatycznej, transbłonowej i fragmentu regionu zewnątrzkomórkowego. Łańcuch ciężki ma masę 120 kDa i składa się z pozostałej części domeny zewnątrzkomórkowej. Oba łańcuchy połączone są mostkiem disiarczkowym. Proces cięcia jest przeprowadzany przez konwertazę białkową podobną do furyny (furin-like protein convertase) [46].

Domena αI (lub αA) obecna w podjednostce α wykazuje homologię do tzw. domeny A obecnej w czynniku von Willebranda, która jest odpowiedzialna za wiązanie kolagenu. Domena αI przyjmuje kształt określany mianem konfor-

macji Rossmanna (Rossmann fold) utworzony z siedmiu α -heliksów otaczających centralnie położoną strukturę β -kartki [45]. W obrębie domeny αI występuje motyw adhezji zależnej od jonów metalu MIDAS (metal ion dependent adhesion site). Region MIDAS w warunkach fizjologicznych przyląca jony Mg^{2+} lub Mn^{2+} [99] w obrębie pięciu bocznych łańcuchów umiejscowionych na trzech różnych pętlach. Pierwsza z pętli zawiera trzy reszty aminokwasowe charakterystyczne dla całej domeny αI : Asp-Xxx-Ser-Xxx-Ser. Druga pętla zawiera resztę treoniny (Thr), a trzecia resztę kwasu asparaginowego (Asp) [24].

W integrzynach niemających domeny αI jej rolę przejmuje domena określana jako βI , αI -like, αA -like, lub βA , która zawiera motyw strukturalnie homologiczny do motywu

MIDAS oraz sekwencję Asp-Xxx-Ser-Xxx-Ser. Domena β I różni się od domeny α I tym, że zawiera dwa dodatkowe segmenty. Jeden z tych segmentów oddziałuje z obszarem β -śmigła w podjednostce α , podczas gdy drugi jest określany jako pętla determinująca swoistość przyłączania liganda SDL (specificity determining loop). W domenie β I jest obecna także domena przylegająca do domeny MIDAS, tzw. ADMIDAS (adjusted to MIDAS) oraz region indukowanego przez ligand wiązania jonów LIMBS (ligand-associated metal binding site). Zarówno ADMIDAS jak LIMBS w odróżnieniu od kasety MIDAS mogą wiązać jony Ca^{2+} [57]. Przyłączenie jonów Ca^{2+} do regionu ADMIDAS powoduje hamowanie przyłączania liganda, podczas gdy przyłączenie Mn^{2+} stymuluje adhezję [56,75].

Wiązanie jonów dwuwartościowych jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania integrzyn. W zależności od rodzaju jonu, jego rola w pośredniczeniu przyłączania liganda może być różna. Jony Mn^{2+} i Mg^{2+} stymulują procesy adhezyjne. Funkcja jonów Ca^{2+} zależy od ich stężenia: duże stężenie jonów Ca^{2+} działa hamująco na adhezję, natomiast małe stężenie jonów Ca^{2+} w połączeniu z optymalnym lub zbliżonym do optymalnego stężeniem jonów Mg^{2+} stymuluje przyłączenie liganda do integryny [56]. W przypadku jonów Ca^{2+} również miejsce wiązania pełni istotną rolę w stymulacji bądź hamowaniu adhezji. Niewielkie stężenie jonów Ca^{2+} powoduje ich wiązanie do regionu LIMBS inicjując stymulację rozpoznawania i przyłączania liganda. Duże stężenie natomiast jest skorelowane z wiązaniem się jonów Ca^{2+} do regionu ADMIDAS i inhibicją adhezji [57].

MECHANIZM AKTYWACJI INTEGRYN

Aktywacja integrzyn może się odbywać na dwa sposoby, w zależności od kierunku, z którego pochodzi sygnał aktywacji: z zewnątrz komórki (outside-in signaling) oraz z wnętrza komórki (inside-out signaling). W przypadku przekazywania sygnału typu outside-in przyłączenie liganda do zewnątrzkomórkowych domen integryny prowadzi do przemieszczenia części głowowej obu podjednostek, wydłużenia integryny w obszarze „kolana” oraz wyprostowania całej struktury. Następnym wyprostowania integryny jest rozsuniecie się domen tworzących obszar „nóg”, temu procesowi towarzyszy rozsuniecie się regionów transbłonowych i cytoplazmatycznych obu podjednostek. Zaktywowane w ten sposób cząsteczki integryny wykazują zwiększone powinowactwo do ligandów i zaczynają tworzyć skupiska (clustering), co inicjuje procesy adhezyjne między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową [24]. Ponadto po rozsunieciu „nóg” integryny, domeny cytoplazmatyczne mogą oddziaływać z wewnątrzkomórkowymi białkami odpowiedzialnymi za transdukcję sygnału, np. w przypadku integryny $\alpha_v\beta_3$ i szlaku kinazy MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase pathway) biorącej udział w odpowiedzi komórki na czynniki wzrostu [20]. Szlaki przekazywania sygnału uruchomione w wyniku aktywacji integrzyn, regulują zachowanie komórek, ich kształt, polarność, zdolność do przemieszczania się, wzrostu i różnicowania oraz mogą blokować procesy apoptotyczne [24].

Model aktywacji inside-out zakłada, że do przejścia integryny w stan aktywny nie jest wymagane przyłączenie liganda [102]. Aktywacja typu inside-out przebiega z udziałem wewnątrzkomórkowych białek związanych ze szkieletem cytoplazmatycznym: kindlin, talin oraz migflin [28,29]. Kindliny są odpowiedzialne za etap rekrutacji migflin w pobliżu domen cytoplazmatycznych integrzyn. Migfliny przeprowadzają proces przemieszczenia filamentów cytoszkieletu z dala od integrzyn. Cytoplazmatyczne domeny integrzyn wolne od blokujących je filamin pochodzących z filamentów cytoszkieletu mogą oddziaływać z talinami odpowiedzialnymi za finalny etap aktywacji, który prowadzi do rozsunienia obu podjednostek integrzyn [56,82].

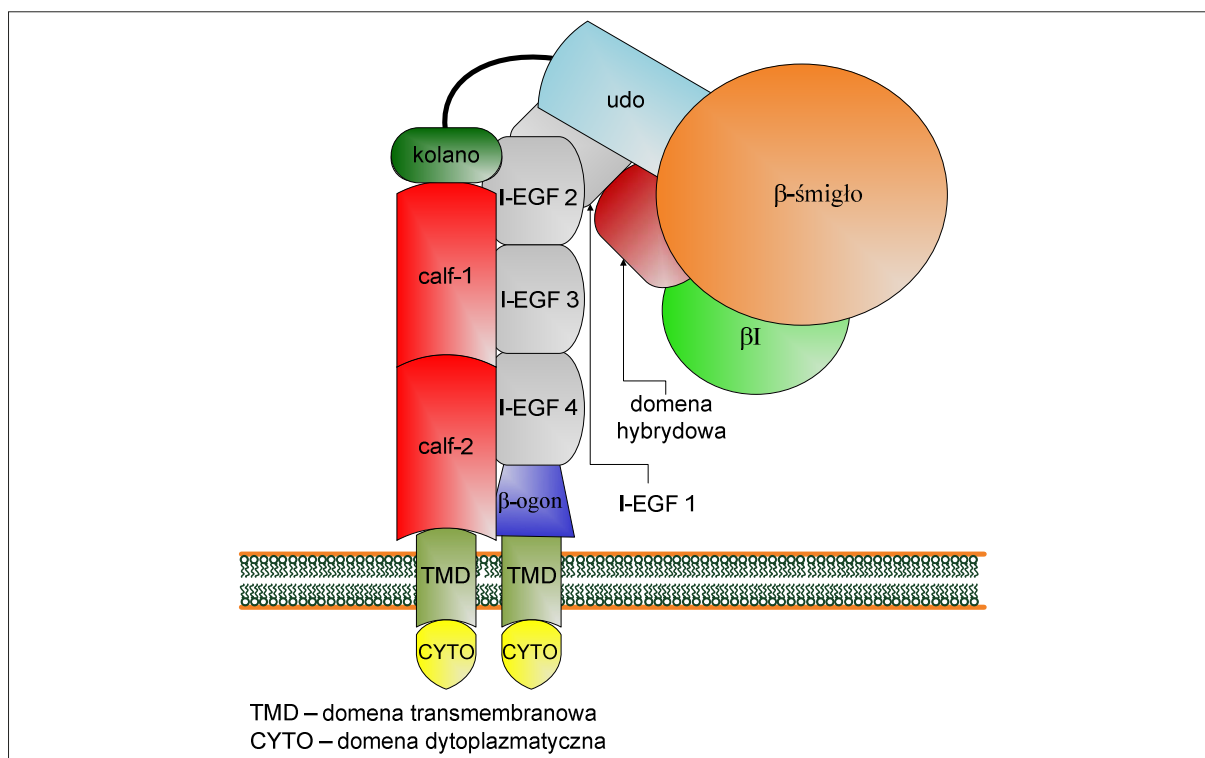
Integryny występują w trzech konformacjach: zamkniętej, zaktywowanej (wydłużonej zamkniętej) oraz aktywnej (wydłużonej otwartej). Podstawowym elementem, który ulega zmianie podczas przechodzenia z konformacji zamkniętej (ryc. 3) do zaktywowanej (ryc. 4) jest wydłużenie integryny w miejscu zgięcia, które leży między domeną calf-1 i udem w podjednostce α oraz domeną I-EGF1 i I-EGF2 w podjednostce β . Proces ten prowadzi do swoistego „wyprostowania” przestrzennej struktury całego białka i jest stabilizowany przez separację domen transbłonowych oraz regionu „niższych nóg” [73,75].

MODEL DZIAŁANIA INTEGRYN

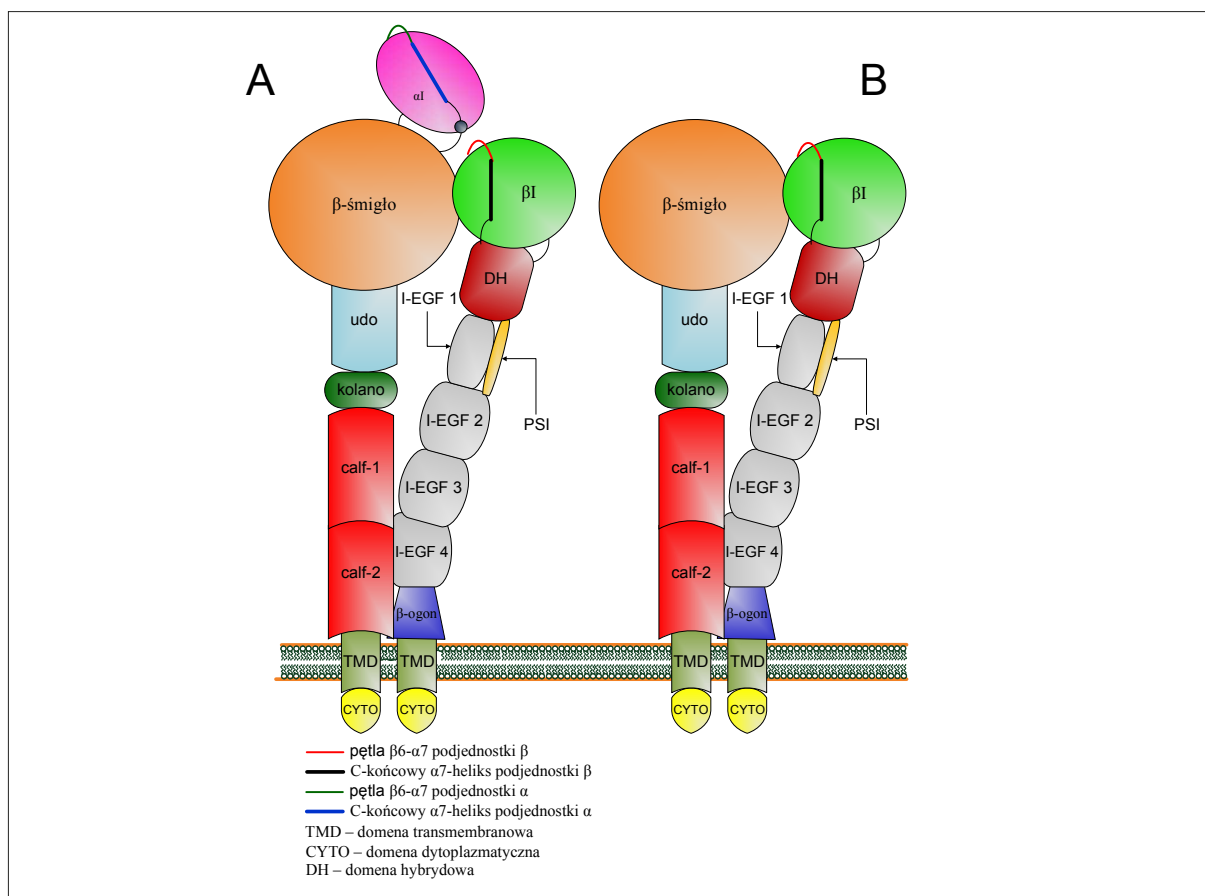
W obrębie domeny MIDAS podjednostki α pięć wspomnianych wcześniej reszt aminokwasowych (odpowiednio: dwie reszty seryny, dwie reszty kwasu asparaginowego i jedna reszta treoniny) tworzy tzw. podstawową i dodatkową domenę koordynacyjną, które otaczają dwuwartościowe jony metalu. Podstawowa domena koordynacyjna oddziałuje z jonem metalu bezpośrednio, podczas gdy dodatkowa domena koordynacyjna oddziałuje z jonem metalu za pośrednictwem cząsteczek wody dostarczających obdarzone ładunkiem ujemnym cząsteczki tlenu niezbędne do utworzenia wiązania koordynacyjnego z dodatnio naładowanym jonem metalu [21,89].

Gdy domena α I zmienia konformację z zamkniętej na otwartą reszty aminokwasowe zmieniają swoje położenie. Reszta kwasu asparaginowego przemieszcza się z podstawowej do dodatkowej domeny koordynacyjnej, a reszta treoniny w przeciwnym kierunku. Zmiana położenia reszt aminokwasowych zachodzi przez zmianę położenia łańcuchów bocznych domeny α I. Procesowi temu towarzyszy przemieszczanie się jonów metalu. Zmiana w podstawnikach koordynujących jon metalu dotyczy zamiany mającej ujemny ładunek elektryczny reszty asparaginy na pozbawioną ładunku resztę treoninową. Reakcja zwiększa elektrofilowość jonu metalu, co zapewnia łatwiejszą interakcję z ujemnie naładowanymi regionami liganda [21,72,89].

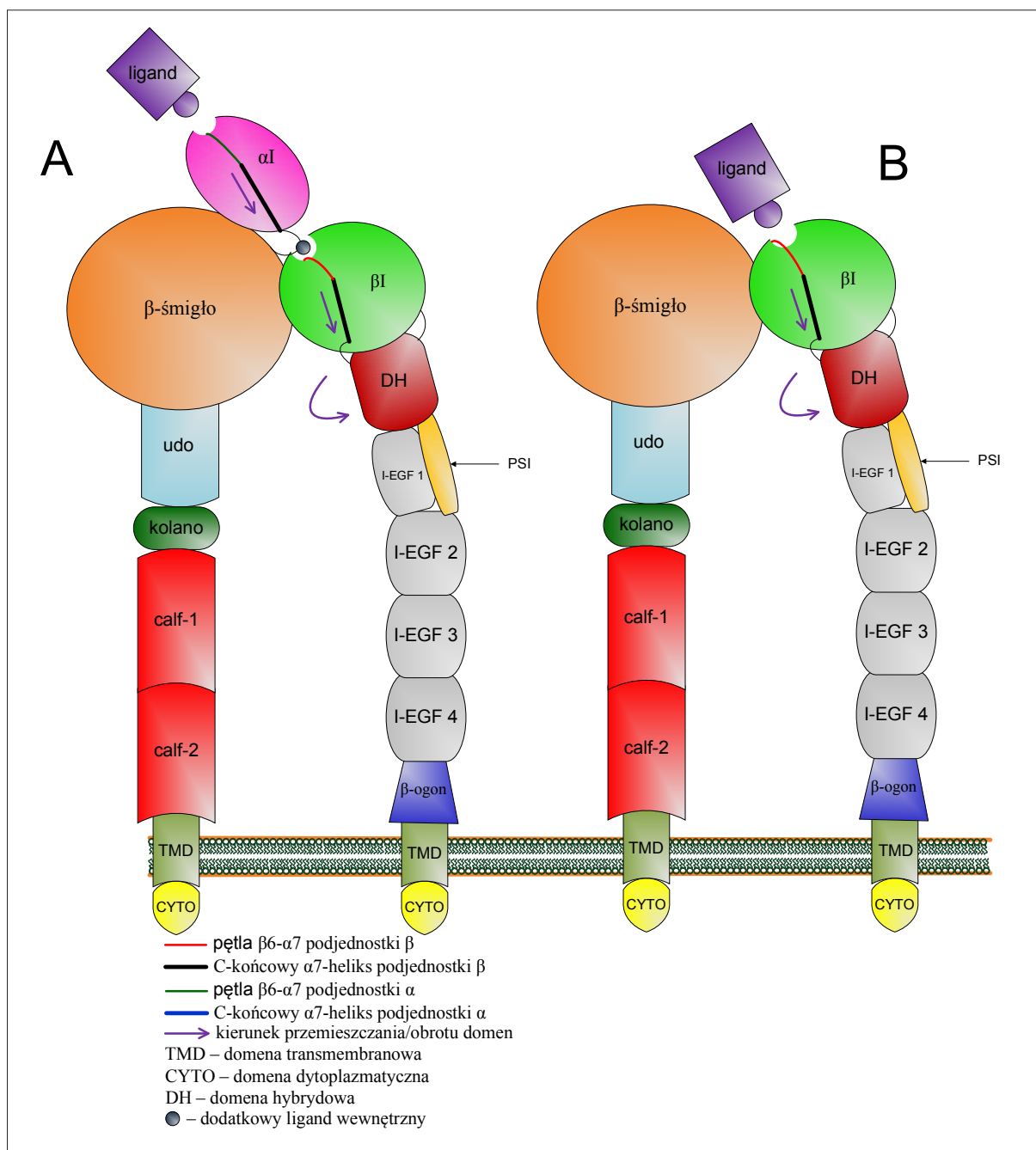
W konformacji otwartej integryny (ryc. 5) reszty aminokwasowe treoniny i seryny są obecne w podstawowej domenie koordynacyjnej, a dwie reszty kwasu asparaginowego wchodzą w skład dodatkowej domeny koordynacyjnej. W konformacji otwartej jedyną cząsteczkę tlenu



Ryc. 3. Schemat budowy integryny pozostającej w konformacji zamkniętej



Ryc. 4. Schemat budowy integryny zawierającej domenę αI (A) oraz integryny nie mającej domeny αI (B) pozostającej w konformacji zaktywowanej (wyprostowanej zamkniętej)



Ryc. 5. Schemat budowy integriny zawierającej domenę αI (A) oraz integriny niemającej domeny αI (B) pozostającej w konformacji aktywnej (wyprostowanej otwartej)

obdarzoną ładunkiem ujemnym obecna w podstawowej domenie koordynacyjnej dostarcza ligand, zazwyczaj za pośrednictwem reszty kwasu glutaminowego. Brak ujemnie naładowanych podstawników w podstawowej domenie koordynacyjnej w konformacji otwartej integriny umożliwia silne oddziaływania między ligandem a jonem metalu [21,45,89].

Rearanżacji łańcuchów bocznych domeny αI mających bezpośredni kontakt z ligandem towarzyszy przemieszczanie pętli $\beta 6$ - $\alpha 7$ w obrębie podjednostki αI . Mimo że

pętla $\beta 6$ - $\alpha 7$ nie jest częścią domeny MIDAS, ani też nie wiąże liganda, zmiana jej położenia umożliwia zmianę konformacji przestrzennej integriny [45,72,88].

W czasie „otwierania” części głowowej (ryc. 5) ruch pętli $\beta 6$ - $\alpha 7$ domeny αI wymusza przemieszczenie bocznej pętli $\beta 1$ - $\alpha 1$ domeny βI oraz przyłączonego do niej jonu metalu z motywu ADMIDAS w kierunku grupy karboksylowej liganda. Przemieszczenie powoduje przesunięcie pętli $\beta 6$ - $\alpha 7$ domeny βI , co powoduje wypchnięcie struktury $\alpha 7$ -heliksu wzdłuż podjednostki β w kierunku domeny

hybrydowej. Domena hybrydowa obraca się, a ruch jest przekazywany dalej w kierunku domeny PSI oraz I-EGF-1 powodując rozsuniecie się „nóg” podjednostki α oraz β . Przesunięcie pętli $\beta 6$ - $\alpha 7$ w kierunku domeny hybrydowej często jest określane jako podobne do ruchu tłoka (piston-like motion), ponieważ podczas obracania się domeny hybrydowej pętla $\beta 6$ - $\alpha 7$ zaczyna się przechylać do góry i do dołu, co w istocie może przypominać ruch tłoka połączonego z wałkiem rozrządu w silnikach samochodowych [24,47,75].

W przypadku integrzyn niemających w swojej cząsteczce domeny αI proces aktywacji przebiega podobnie. Różnicą jest brak etapów występujących w obrębie domeny αI , a ligand przylacza się do cząsteczki integryny za pośrednictwem motywu RGD (Arg-Gly-Asp) właściwego dla cząsteczek fibronektyny. Ligand łączy się w jednakowym stopniu do domeny βI z podjednostki β - za pośrednictwem reszty asparaginy oraz do struktury β -śmigła z podjednostki α - za pośrednictwem reszty argininy. Zmiany konformacji w miejscu wiązania liganda zachodzące podczas aktywacji integryny dotyczą jedynie podjednostki β . Przyłączenie liganda wymusza przemieszczenie pętli $\beta 6$ - $\alpha 7$ oraz $\alpha 7$ -heliksu podjednostki β w sposób analogiczny do ruchu pętli $\beta 6$ - $\alpha 7$ podjednostki αI w integrzynach ją zawierających [89,99].

MODYFIKACJE MOSTKÓW DISIARCZKOWYCH W INTEGRYNACH

W cząsteczkach integrzyn region bogaty w cysteiny obejmuje obszar domen typu I-EGF. Każda z domen I-EGF zawiera osiem reszt cysteinowych, które tworzą między sobą mostki disiarczkowe w konfiguracji 1-5, 2-4, 3-6 oraz 7-8. Wyjątkiem jest domena I-EGF1, która nie ma wiązania 2-4. O ile wiązania 2-4, 3-6 oraz 7-8 występują w innych białkach zawierających domeny typu EGF-like, to wiązanie 1-5 jest charakterystyczne jedynie dla integrzyn. Integrzyny zawierające podjednostkę β typu β_3 , takie jak $\alpha_{IIB}\beta_3$ oraz $\alpha_V\beta_3$ mają dodatkowo sekwencję Cys-Xxx-Xxx-Cys powtórzoną pięciokrotnie oraz sekwencję Cys-Gly-Xxx-Cys powtórzoną czterokrotnie i będącą elementem dłuższego motywu Gly-Xxx-Cys-Xxx-Cys-Gly-Xxx-Cys-Xxx-Cys wchodzącego w skład tzw. regionów bogatych w powtórzenia cysteinowe CRRs (cysteine-rich repeat regions). Obecność mostków disiarczkowych w integrzynach jest związana z procesem składania w pełni funkcjonalnych cząsteczek białka z odpowiednich prekursorów. Dopiero dojrzałe cząsteczki integrzyn o prawidłowej strukturze przestrzennej są transportowane na powierzchnię komórek. Ponadto modyfikacje mostków disiarczkowych umożliwiają aktywację integrzyn w sposób alternatywny, niezależnie od przyłączenia liganda [7,33,80,97].

Rolę mostków disiarczkowych w regulacji procesów składania oraz w aktywacji cząsteczek integrzyn najlepiej obrazują eksperymenty, w których przeprowadzono modyfikacje polegające na podstawieniu reszty seryny w miejsce jednej lub obu cystein tworzących pierwotne wiązanie. Substytucja seryny w miejsce reszty cysteiny w wiązaniu Cys-567 i Cys-581 (wiązanie 2-4 w obrębie I-EGF4) oraz Cys-575 i Cys-586 (wiązanie 3-6 w I-EGF4) znacznie obniżają poziom ekspresji integrzyn $\alpha_{IIB}\beta_3$ oraz $\alpha_V\beta_3$ na powierzchni komórek, przez zaburzenia procesów składania białka, a tym samym wy-

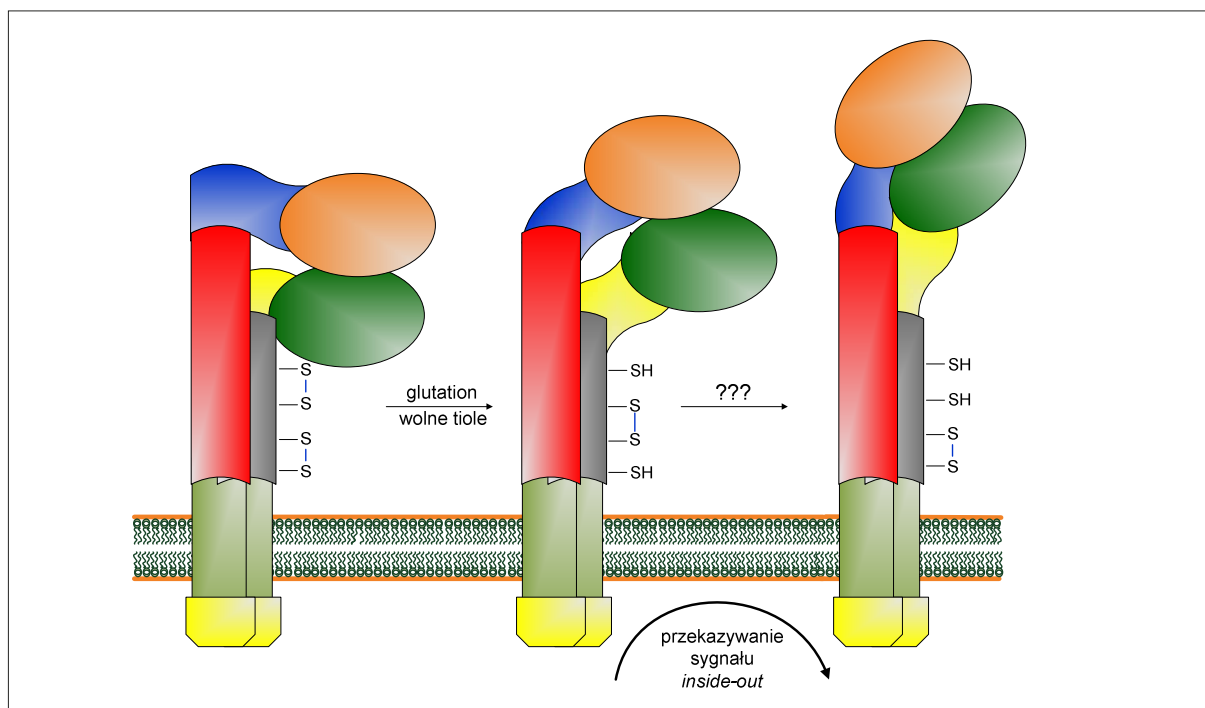
wołując nieprawidłowości w jego konformacji przestrzennej. Podobnie jest w przypadku zmian w tworzeniu wiązań między Cys-549-Cys-558 (wiązanie 5-6 w I-EGF3) oraz Cys-567-Cys-581 (1-3 w I-EGF4) [54]. Przekształcenia wiązania Cys-437-Cys-457 w obrębie domeny I-EGF1 w wyniku substytucji hamują umiejscawianie $\alpha_{IIB}\beta_3$ na powierzchni komórek znacznie silniej niż w przypadku takiej samej modyfikacji w integrynie $\alpha_V\beta_3$. Zmiany w wiązaniu Cys-473-Cys-503 na obszarze I-EGF2 bardziej obniżają poziom powierzchniowej ekspresji $\alpha_V\beta_3$ niż $\alpha_{IIB}\beta_3$. Natomiast przerwanie wiązania Cys-588-Cys-598 (5-6 w I-EGF3) nie ma żadnego wpływu na poziom ekspresji integrzyn na powierzchni komórek [33,54,55,68].

Modyfikacje mostków disiarczkowych w domenach I-EGF mogą wpływać także na ich aktywność. W przypadku integrzyn $\alpha_{IIB}\beta_3$ zaburzenia w obrębie wiązań Cys-549-Cys-558, Cys-536-Cys-544 oraz Cys-523-Cys-544 (wszystkie w domenie I-EGF3) powodują, że $\alpha_{IIB}\beta_3$ jest w stanie konstytutywnie aktywnym. Przekształcenia wiązań Cys-437-Cys-457 w I-EGF1 oraz Cys-473-Cys-503 w I-EGF2 utrzymują w stanie aktywnym zarówno $\alpha_{IIB}\beta_3$ jak i $\alpha_V\beta_3$ z silniejszym skutkiem w przypadku $\alpha_{IIB}\beta_3$. Natomiast zmiany w obrębie wiązania Cys-567-Cys-581 w I-EGF4 utrzymują $\alpha_{IIB}\beta_3$ w stanie nieaktywnym jednocześnie całkowicie uniemożliwiając aktywację [33,53,54,68].

Zarówno Cys-437 jak i Cys-457 to pierwsze reszty cysteinowe sekwencji Cys-Xxx-Xxx-Cys, które są typowe dla oksydoreduktaz, czyli enzymów katalizujących reakcje typu redoks. Ze względu na obecność tych sekwencji oraz to, że jej modyfikacje powodują przejście cząsteczki integryny w stan aktywny, sugeruje się, że integrzyny $\alpha_{IIB}\beta_3$ jak i $\alpha_V\beta_3$ mogą wykazywać endogenną aktywność izomerazy tiolowej. Aktywność ta przejawiałaby się potencjalną zdolnością integrzyn do przeprowadzania modyfikacji własnych mostków disiarczkowych za pośrednictwem reakcji utlenienia-redukcji [16,60,99].

W przypadku integrzyn mających podjednostkę β typu β_3 należy dodatkowo zwrócić uwagę na unikalne dla nich wiązanie Cys-560-Cys-583 łączące domenę I-EGF3 oraz I-EGF4. Przekształcenia wiązania łączącego dwie domeny I-EGF przez utworzenie wolnej grupy tiolowej w jednej z cystein indukują reorganizację obu domen względem siebie [55]. Substytucja seryny, argininy lub fenyloalaniny w miejsce Cys-560 inicjuje przejście integryny w stan aktywny, podczas gdy podstawienie seryny w pozycji Cys-583 bądź obu reszt cysteinowych jednocześnie nie powoduje takich skutków. W związku z powyższym możliwe, że za aktywację integrzyn nie odpowiada bezpośrednio proces rozerwania mostka disiarczkowego, ale prawdopodobnie będące następstwem tego mechanizmu pojawienie się wolnych grup tiolowych w reszcie cysteiny - w tym wypadku w Cys-560. Jest to szczególnie istotne spostrzeżenie ze względu na późniejsze rozważania dotyczące białek modyfikujących strukturę integrzyn. Podobny skutek konstytutywnej aktywacji obserwuje się w przypadku rozerwania wiązania Cys-523-Cys-544 w I-EGF3 w integrynie $\alpha_V\beta_3$ [54].

Integrzyny $\alpha_V\beta_3$ oraz $\alpha_{IIB}\beta_3$ zawierają motywy typowe dla biał-



Ryc. 6. Schemat sugerowanej roli glutationu i innych wolnych tioli osocza w procesie modyfikacji wiązań disiarczkowych integrzyn. Symbolem «???» oznaczono nieznane białko, które współdziałałoby z glutationem w mechanizmie aktywacji integrzyn (wyjaśnienie niżej)

łęk zaangażowanych w redukcję mostków disiarczkowych do wolnych grup tiolowych, a tym samym mogłyby przeprowadzać modyfikacje własnych mostków disiarczkowych indukując przejście do postaci aktywnej lub nieaktywnej bez obecności innych białek. Jednak dużo bardziej prawdopodobnym wydaje się, że za modyfikacje wiązań disiarczkowych w cząsteczkach integrzyn są odpowiedzialne nie same integryny, ale izomeryzy tiolowe.

W osoczu są obecne niskocząsteczkowe czynniki określane wspólnym mianem wolnych tioli, które mogłyby przeprowadzać reakcje typu redoks prowadzące do aktywacji integrzyn. Do grupy tej zalicza się glutation (GSH), cysteinę (CSH), cysteino-glicynę (CGSH) oraz homocysteinę (HCSH). Aktywność wolnych, niskocząsteczkowych tioli osocza jest związana z utrzymywaniem prawidłowego stanu redoks krwi na zasadzie czynnika buforującego, dostarczającego wolne grupy -SH lub mostki disiarczkowe niezbędne do reakcji utleniania-redukcji. Wolne tiole są zaangażowane w przemiany związane z utworzeniem bądź rozerwaniem wiązań disiarczkowych modyfikujące strukturę wielu białek obecnych zarówno na powierzchni komórek jak i w przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

Glutation zawiera zarówno wolne grupy tiolowe, jak i mostki disiarczkowe; w postaci utlenionej katalizuje utlenienie substratu, natomiast w zredukowanej przeprowadza reakcję odwrotną [6,60]. W prawidłowych komórkach występuje w dużym stężeniu, bo sięgającym nawet kilku milimoli na litr, tylko w obszarze siateczki śródplazmatycznej ER (endoplasmic reticulum). W obrębie ER przeważa glutation w postaci utlenionej, która

potencjalnie mogłaby generować nowe mostki disiarczkowe w integrzynach. Jednak w przestrzeni zewnątrzkomórkowej stężenie glutationu jest znacznie niższe. W osoczu waha się w granicach 3-25 μmoli . Istotne również jest to, że glutation w przeciwieństwie do ER, poza komórką występuje głównie w postaci zredukowanej w proporcji GSH/GSSG od 4:1 nawet do 13:1 [2,52]. W warunkach fizjologicznych glutation w postaci zredukowanej zwiększa liczbę wolnych grup tiolowych w podjednostce β zarówno w integrynie $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ jak i $\alpha_v\beta_3$ [7,60]. Możliwe, że liczba wolnych grup tiolowych generowanych przez glutation przyczynia się do powstania puli zapasowej wolnych grup -SH, które mogą zostać potencjalnie użyte do tworzenia nowych wiązań disiarczkowych przez enzymy [7].

Z pozostałych niskocząsteczkowych wolnych tioli osocza, cysteina osiąga stężenie rzędu 200 $\mu\text{moli/L}$, cysteino-glicyna 30 $\mu\text{moli/L}$, a homocysteina 10 $\mu\text{moli/L}$. Zarówno cysteiny jak i cysteino-glicyny obecne w osoczu osiągają wyższy poziom niż glutation, jednak prawdopodobieństwo, że samodzielnie przeprowadzają rearanżacje mostków disiarczkowych jest znikome. Prawdopodobnie wolne tiole osocza wykazują zdolność do częściowej aktywacji integrzyn. Jednak integryny pozostające w stanie częściowo aktywnym mogą być odporne na działanie czynników przeprowadzających pełną aktywację, a więc rola wolnych tioli polegałaby raczej na inhibicji niż aktywacji integrzyn. Możliwe jednak, że częściowa aktywacja jest tylko jednym z czynników w całym procesie. Wówczas wolne tiole osocza generowałyby w cząsteczkach integrzyn niezwiązane grupy -SH, które później biorą udział w procesie tworzenia nowych mostków disiarczkowych, katalizowanym przez oksydoreduktazy czy izomeryzy tiolowe

(ryc. 6) [3,49,84].

BUDOWA IZOMERAZY DISIARCZKOWEJ

Białkowa izomeraza disiarczkowa (PDI) (protein disulfide isomerase) została odkryta już w 1963 r. przez dwie niezależne grupy badaczy: Venetianera i Strauba oraz Goldberga i wsp. [27,85]. PDI jest enzymem o aktywności oksydoreduktazy, przeprowadzającym reakcje redukcji przez tworzenie wolnych grup tiolowych oraz utleniania przez tworzenie mostków disiarczkowych w białkach substratowych. Aktywność PDI dotyczy przede wszystkim białek umiejscowionych w obrębie siateczki śródplazmatycznej. Tworzenie mostków disiarczkowych przez PDI w białkach, które ulegają dojrzewaniu w obszarze światła ER (ER lumen) jest nieodłącznym elementem procesów składania prawidłowych, w pełni funkcjonujących cząsteczek białkowych z odpowiednich prekursorów. Białkowa izomeraza disiarczkowa należy do nadrodziny tioredoksyn (thioredoxin superfamily) obejmującej białka mające w swojej cząsteczce elementy strukturalne zbliżone do tioredoksyny, która jest cytosolowym białkiem zaangażowanym w reakcje typu redoks opierające się na wymianach grup tiolowych. PDI ulega ekspresji w większości prawidłowo funkcjonujących tkanek i narządów, a stanowi około 1% wszystkich białek znajdujących się w organizmie człowieka. Występuje przede wszystkim wewnątrz komórki, w siateczce śródplazmatycznej i aparacie Golgiego. Obecna jest także na powierzchni komórek: płytek krwi [22], limfocytów [10], tyreocytów [94], neutrofilów [9] oraz komórek śródbłónki [23]. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej oddziałuje z trombospondyną, fibrynogenem oraz czynnikiem von Willebranda [96]. Doniesienia o umiejscowieniu PDI w innych przestrzeniach komórkowych, takich jak jądro komórkowe, mitochondria i cytosol [67,83,93] wydają się kontrowersyjne.

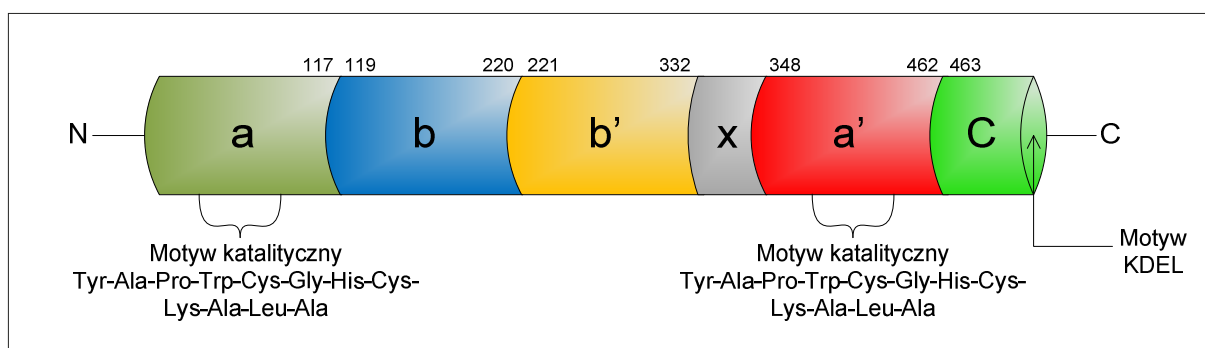
Białkowa izomeraza disiarczkowa jest białkiem o masie około 55 kDa i zawiera 491 aminokwasów tworzących cztery podstawowe domeny strukturalne: a, b, b', a'. Dodatkowymi elementami wchodzącymi w skład dojrzałej cząsteczki białka są: 17-19-aminokwasowa wstawka między domeną b' i a', tzw. x-łącznik (x-linker) oraz region C-końcowy o charakterze silnie kwasowym (ryc. 7) [29].

Domeny a i a' są domenami katalitycznymi, zawierają motyw Cys-Xxx-Xxx-Cys właściwy dla białek, których funkcją jest związana z metabolizmem grup -SH. Domeny a i a' wykazują 36,8% homologii względem siebie oraz stosunkowo wysoki stopień homologii z tioredoksyną [28]. Domeny b i b' nie zawierają katalitycznie aktywnych reszt cysteinowych. Nie wykazują homologii do domen a i a', natomiast względem siebie mają jedynie 19,3% homologii. Krótkie odcinki między domeną a i b oraz między b i b' zawierają zaledwie kilka aminokwasów, co ogranicza elastyczność ruchów wszystkich czterech domen w przestrzeni. Rola obszarów b i b' jest związana głównie z rozpoznawaniem i przyłączaniem substratu. Obecność regionów b i b' w cząsteczce PDI pozwala na oddalenie domen katalitycznych względem siebie w przestrzeni, a tym samym umożliwia ich prawidłowe funkcjonowanie [29,42].

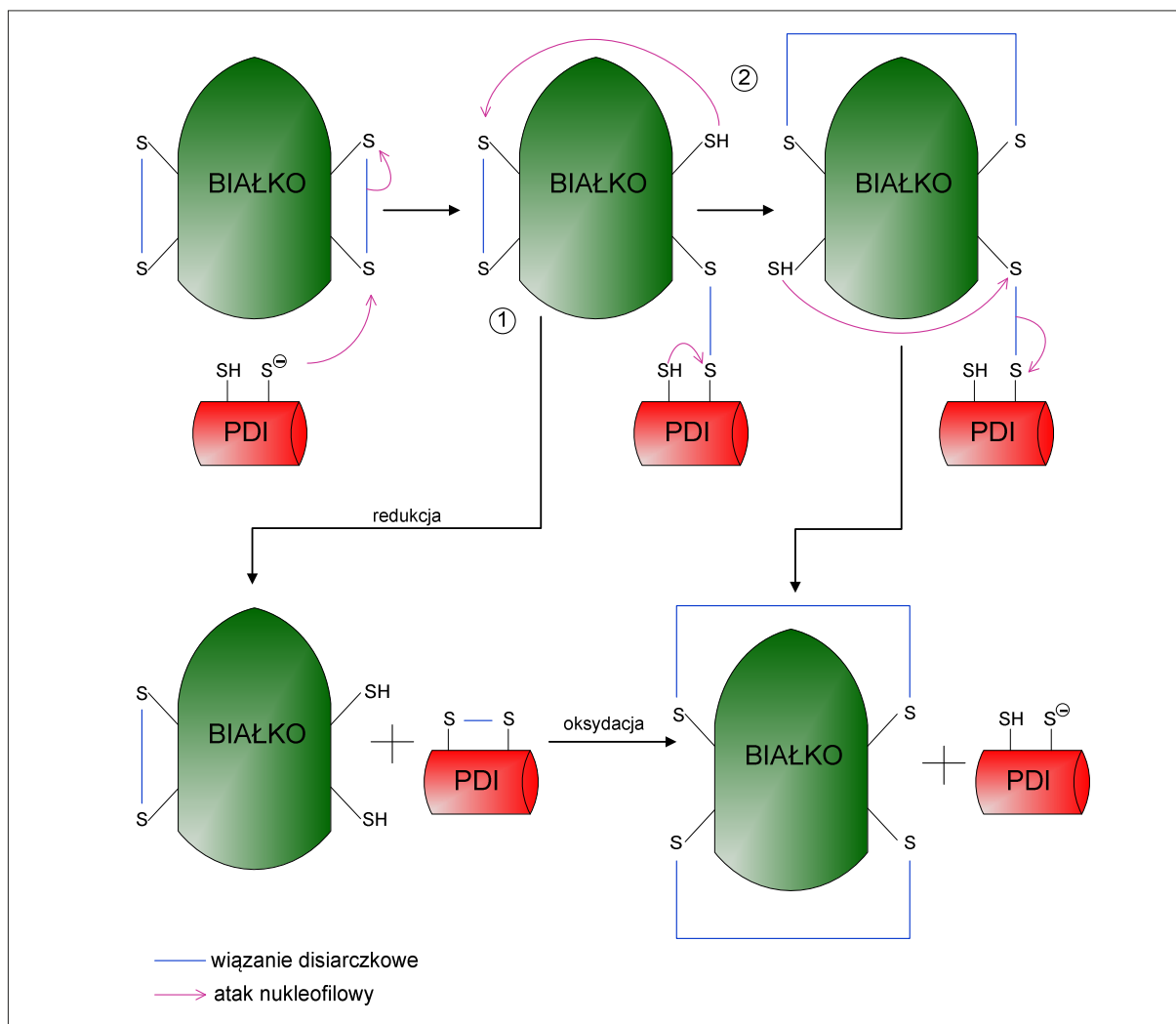
W obrębie domeny x-łącznika wyróżniamy region N-końcowy oraz C-końcowy. Odcinek N-końcowy jest zbudowany z siedmiu aminokwasów i układa się równolegle względem domeny b' łącząc się z nią za pomocą wiązań hydrofobowych. Dwunastoaminokwasowy odcinek C-oddziałuje z domeną a' w sposób stosunkowo swobodny, bez udziału silnych wiązań hydrofobowych bądź mostków solnych. Obecność x-łącznika w cząsteczce PDI zapewnia całemu białku ograniczoną możliwość zmian konformacji przestrzennej [42].

Bogaty w podstawniki o charakterze kwasowym C-końiec cząsteczki PDI zawiera motyw Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL), za pomocą którego oddziałuje z receptorem obecnym w ER. Motyw KDEL jest elementem sygnałowym, uniemożliwiającym sekrecję białek funkcjonujących w obrębie ER poza obszar siateczki śródplazmatycznej oraz kierującym białka z innych regionów komórki do wnętrza ER [14,39,44].

Konformacja przestrzenna PDI jest określana mianem tzw. struktury tioredoksyny (thioredoxin fold), która występuje w wielu białkach zaangażowanych w przemiany związane z grupami tiolowymi np. w peroksydazie glutationu, S-transferazie glutationowej. Struktura tioredoksyny składa się z trzech warstw, z których każda zawiera motyw α - β - α . Motyw ten jest zbudowany z dwóch struktur α -heliksu ułożonych po jednej stronie czteroniciowej struktury β -kartki oraz pojedynczej struktury α -heliksu umiejscowionej po stronie przeciwnej. Spośród czterech



Ryc.7. Budowa strukturalna białka PDI z zaznaczeniem sekwencji ograniczających katalityczne cysteiny w domenie a oraz a'



Ryc. 8. Model działania PDI według mechanizmu cyklicznych reakcji redukcji i oksydacji (1) oraz według mechanizmu bezpośredniej izomeryzacji (2)

nici struktury β -kartki trzy są ułożone przeciwnielegle [64].

Sekwencje katalityczne Cys-Xxx-Xxx-Cys domen a i a' są umiejscowione w α 2-heliksie, gdzie N-końcowa cysteina tworząca domenę katalityczną znajduje się na samym N-końcu heliksu, podczas gdy C-końcowa cysteina wykazuje jedynie ograniczony kontakt z substratami. Cysteina umiejscowiona bliżej N-końca białka jest odpowiedzialna za tworzenie wiązania disiarczkowego z częścią liganda, podczas gdy cysteina położona bliżej C-końca PDI inicjuje rozerwanie tego wiązania i uwolnienie liganda. C-końcowa cysteina nie jest potrzebna do przeprowadzenia reakcji bezpośredniej izomeryzacji, ale jest niezbędna w funkcjonowaniu PDI w cyklicznych reakcjach utlenienia i redukcji oraz w tzw. drodze ucieczki (escape pathway), czyli uwolnienia PDI z połączenia disiarczkowego z substratem, gdzie PDI zostało kinetycznie zablokowane podczas tworzenia produktu pośredniego [40,41,90].

PDI w stanie zredukowanym wykazuje zdolność do prze-

prowadzania reakcji redukcji wiązań disiarczkowych oraz reakcji izomeryzacji. Ponieważ katalizowanie reakcji izomeryzacji jest podstawową funkcją PDI wydaje się, że białko to powinno przyjmować w komórce głównie postać zredukowaną. Jednak stan redoks PDI jest bardzo płynny i zmienia się w zależności od warunków panujących w komórce zwłaszcza pod wpływem zmian równowagi redoks w ER [29].

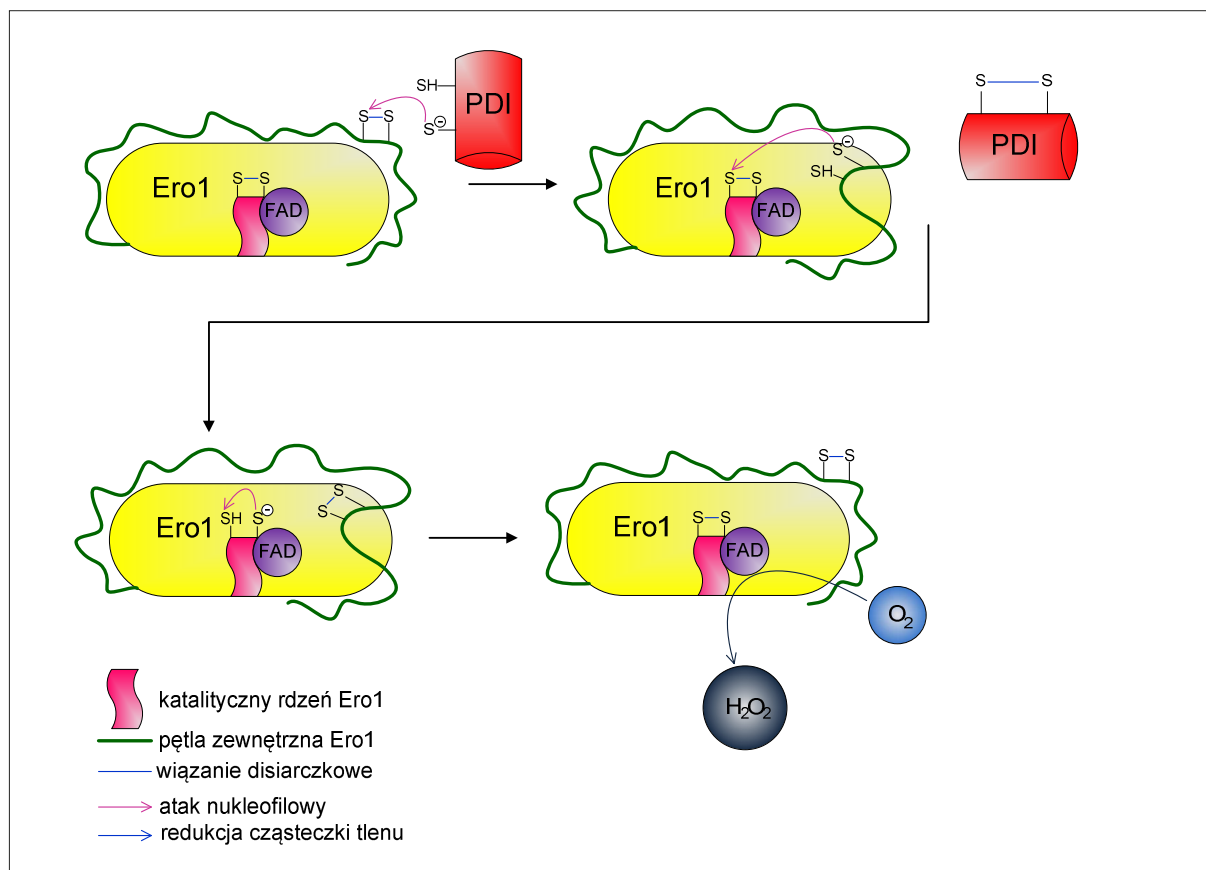
Za wiązanie białek substratowych do PDI odpowiadają niekatalityczne domeny b i b'. Część liganda przylacza się głównie do regionu tworzącego swego rodzaju „kiesz” ograniczoną z obu stron przez domeny b i b'. Kiesz zawiera znaczną liczbę podstawników hydrofobowych między heliksami α 1 i α 3: Phe-233, Ala-228, Phe-232, Ile-284, Phe-287, Phe-288, Leu-303, Met-307 [42]. Proces wiązania substratów przeprowadzany przez domenę b' występuje wtedy, gdy substratami są duże i średnie białka. Jest również bardzo wrażliwy na konformacyjne zaburzenia struktury pozostałych domen PDI [36]. Krótkie peptydy oraz białka o nie do końca zdefi-

niowanej lub nieprawidłowej strukturze przestrzennej (misfolded proteins) są wiązane dodatkowo przez domenę b z niewielkim współudziałem obszaru a' [36,37]. Istotny dla wiązania substratu jest także 26-aminokwasowy region o charakterze silnie kwasowym obejmujący ostatni α -heliks domeny a' oraz pierwszą połowę domeny C. Pełni jedynie rolę pomocniczą, gdyż PDI wiąże substraty przede wszystkim za pośrednictwem wiązań hydrofobowych [38,59].

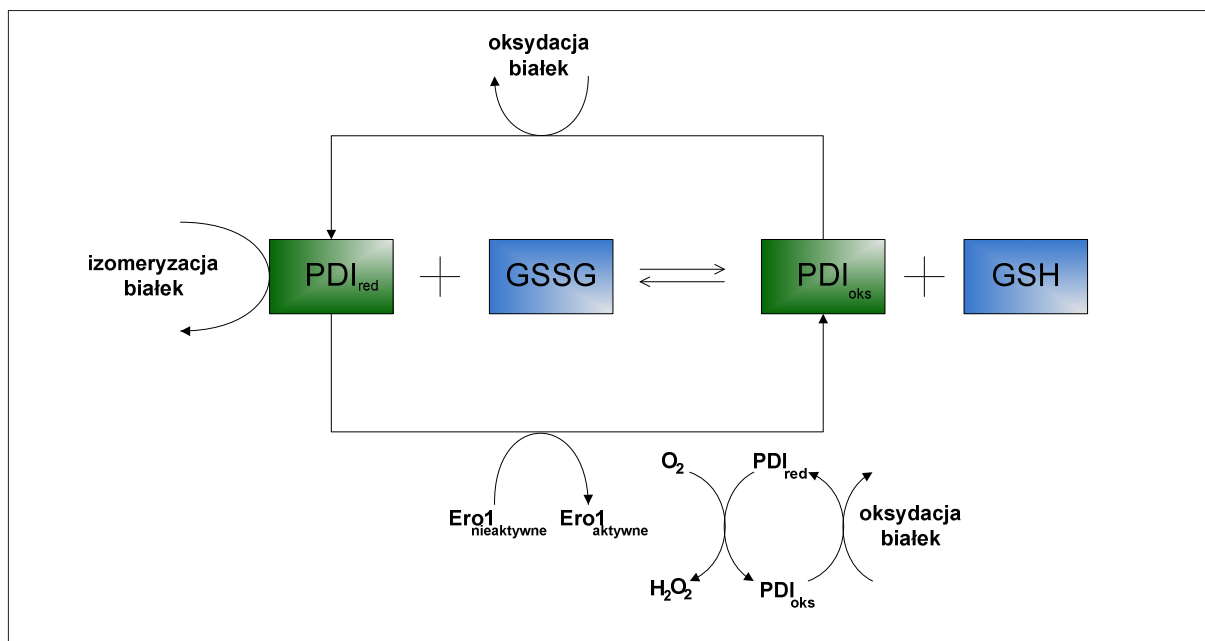
Z pozostałych motywów istotnych dla funkcjonowania PDI należy wymienić zachowane ewolucyjnie podstawniki prolinowe (Pro-61 i Pro-405) umiejscowione w regionie centralnym α 2-heliksu, które wprowadzają skręt do struktury przestrzennej α -heliksu i umożliwiają jej zawinięcie dookoła struktury β -kartki. Innym ważnym elementem są pary podstawników obdarzonych ładunkiem elektrycznym, które są ulokowane od spodniej strony centrum aktywnego PDI: Glu-47 i Lys-81 w domenie a oraz Glu-391 i Lys-424 w domenie a'. Podstawniki te są istotne dla katalitycznych właściwości PDI, gdyż są zaangażowane w reakcje związane z transferem protonów podczas reakcji utleniania-redukcji przeprowadzanych przez PDI [19].

Białkowa izomeraza disiarczkowa wykazuje niewielkie

możliwości zmian konformacyjnych w obrębie własnej cząsteczki. Uwzględniając, że większość substratów PDI to białka w fazie składania możliwym wydaje się, że to właśnie substraty PDI, a nie samo PDI zmieniają swoją konformację w czasie interakcji. Świadczy o tym to, że białka w fazie składania są mniej stabilne i łatwiej ulegają modyfikacjom przestrzennym. Niemniej jednak PDI będąc w postaci zredukowanej łączy się z innymi substratami niż w utlenionej, a więc pewne zmiany konformacji PDI muszą wystąpić [44]. Jedną z takich zmian może być przemieszczenie bocznego łańcucha argininy w pozycji 120 domeny a. Boczny guanylowy łańcuch Arg-120 przemieszcza się w pobliżu jednej z katalitycznych cystein C-końca: Cys-56, która jest częściowo schowana wewnątrz domeny katalitycznej. Przemieszczenie Arg-120 z jednej strony może „wypychać” Cys-56 na zewnątrz, tym samym ułatwiając jej kontakt z ligandem, a z drugiej dostarcza ładunek dodatni w pobliżu Cys-56 niezbędny do przeprowadzenia reakcji utleniania-redukcji [43]. Kolejnym elementem biorącym udział w zmianach konformacyjnych PDI jest domena x-łącznika, ze szczególnym uwzględnieniem tryptofanu (Trp) w pozycji 364. Domena x zmienia swoją konformację w sposób, który powoduje ograniczenie przestrzenne regionu wiążącego substrat - utworzenie „kieszeni” z obszaru b i b' na skutek zagięcia struktury PDI. Taki mechanizm może modyfikować swoistość wią-



Ryc. 9. Reakcja utlenienia PDI przeprowadzana przez Ero1, której towarzyszy wymiana elektronów z FAD oraz redukcja cząsteczki tlenu z utworzeniem nadtlenu wodoru



Ryc.10. Model współdziałania PDI, glutationu i Ero1 na obszarze ER

zania substratu. Niewykluczone, że powoduje również przesunięcie domeny b' względem a', co wymusza zmiany przestrzenne w obrębie cząsteczki substratu [92].

Białkowa izomeraza disiarczkowa pełni funkcje białka chaperonowego zarówno względem białek mających wiązania disiarczkowe [63,95,101], jak i białek, które ich nie mają [15,74]. Aktywność nie ma związku z domenami katalitycznymi PDI, choć wymaga obecności pełnej, niezaburzonej struktury przestrzennej. Właściwości chaperonowe PDI wiążą się przede wszystkim z procesem składania białek i mogą być blokowane przez przyłączenie peptydu o niewielkich rozmiarach do regionu b' lub usunięcie regionu C-końcowego wraz z fragmentem domeny a' [65]. Aktywność chaperonowa PDI jest niezbędna w procesie rozpoznawania liganda i poprzedza wiązanie białek za pomocą mostków disiarczkowych. PDI wykazuje także aktywność antychaperonową, która w warunkach *in vitro* sprowadza się do rozerwania wiązań hydrofobowych wewnątrz substratu i ekspozycji grup hydrofobowych na zewnątrz cząsteczki substratu, co prowadzi do jego agregacji. Jednak w warunkach *in vivo* lub przy wysokim stężeniu PDI także *in vitro*, wyeksponowane grupy hydrofobowe są wiązane przez inne białka chaperonowe (lub przez samo PDI), uniemożliwiając agregację protein. Antychaperonowa aktywność PDI może więc nie mieć znaczenia z fizjologicznego punktu widzenia [29].

MECHANIZM DZIAŁANIA

Aktywność PDI jest związana z tworzeniem, redukcją i izomeryzacją wiązań disiarczkowych w białkach. Zasada funkcjonowania PDI jest zbliżona do sposobu funkcjonowania glutationu w utlenionej postaci, tzn. PDI w postaci utlenionej katalizuje przeniesienie wiązania disiarczkowego

obecnego w jego własnej cząsteczce na cząsteczkę modyfikowanego białka, a tym samym przechodzi do stanu zredukowanego. PDI może przeprowadzać reakcje tworzenia mostków disiarczkowych na dwa sposoby: w wyniku cyklicznych reakcji utlenienia i redukcji oraz za pośrednictwem bezpośredniej izomeryzacji (ryc. 8). Reakcje katalizowane przez PDI najprawdopodobniej zależą od rodzaju substratu. Mechanizm cyklicznych reakcji utlenienia i redukcji polega na redukcji pierwotnego wiązania disiarczkowego w substracie i powstania wolnych grup tiolowych, a następnie utworzenia nowego wiązania w innym miejscu. W przypadku reakcji izomeryzacji dochodzi do ataku nukleofilowego wolnej grupy tiolowej enzymu na mostek disiarczkowy substratu z utworzeniem przejściowego wiązania międzycząsteczkowego, które także podlega nukleofilowemu atakowi wolnej grupy tiolowej substratu z utworzeniem nowego mostka łączącego dwie cysteiny, z których tylko jedna tworzyła pierwotne wiązanie [29].

Aktywność PDI jest nierozdzielnie związana z białkiem Ero1 (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1), które jest enzymem o właściwości oksydoreduktazy katalizującym reakcje izomeryzacji wiązań disiarczkowych w białkach siateczki śródplazmatycznej. U ssaków występuje dwóch przedstawicieli rodziny Ero1: Ero1 α , który ulega ekspresji w odpowiedzi na hipoksję [26] i czynniki stresowe [50] oraz Ero1 β ulegający ekspresji w sytuacji, gdy w ER dochodzi do akumulacji białek, których proces składania nie przebiegł do końca prawidłowo [61]. Ero1 α wiąże się z cząsteczką PDI za pośrednictwem domeny b' i przeprowadza reakcję utlenienia w obrębie domeny katalitycznej a' [29].

Ero1 α zawiera aż 15 podstawników cysteinowych konserwatywnych ewolucyjnie tworzących łącznie różne kombinacje mostków disiarczkowych: Cys-94-Cys-99, Cys-94-

Cys-104, Cys-94-Cys-131, Cys-85-Cys391, Cys-394-Cys397, Cys-208-Cys241 [4]. Oprócz wiązań disiarczkowych pełniących rolę strukturalną w cząsteczce Ero1 α są obecne dwie pary cystein o charakterze katalitycznym: Cys-352-Cys-355 w obrębie centrum aktywnego na obszarze rdzenia oraz Cys-100-Cys-105 umiejscowione w pętli zewnętrznej i nazywane cysteinami „komunikacji wahadłowej” (shuttle cysteins) [25].

Mechanizm przyłączenia Ero1 do PDI jest związany z przemieszczeniem obecnej w Ero1 struktury spinki do włosów typu β , bogatej w reszty alaniny i tryptofanu w kierunku aromatycznych podstawników domeny b' PDI. Wiązanie Ero1 do PDI przypomina proces rozpoznawania i opłaszczania niezłożonych białek, a więc opiera się na właściwościach chaperonowych PDI. Skuteczność przyłączania Ero1 zależy nie od konformacji przestrzennej PDI, ale od stanu redoks białka i osiąga najwyższy poziom, gdy PDI jest w postaci zredukowanej. Utworzenie wiązań hydrofobowych między strukturą spinki typu β Ero1 a kieszenią wiążącą substraty PDI umożliwia kontakt między grupami tiolowymi PDI a disiarczkami obecnymi w zewnętrznej pętli Ero1 [51]. Zewnętrzna pętla Ero1 charakteryzuje się dużą ruchliwością i elastycznością, które umożliwiają jej pełnienie roli pośrednika między cząsteczką PDI a centrum katalitycznym Ero1. Mechanizm działania zewnętrznej pętli Ero1 przypomina nieco model funkcjonowania promu lub wahadłowca (stąd też nazwa „shuttle cysteins”) kursującego między jednym brzegiem a drugim. Centrum katalityczne Ero1 jest umiejscowione w regionie rdzeniowym białka, który cechuje się małą elastycznością i mobilnością, a więc cysteiny centrum katalitycznego nie mogą wchodzić w bezpośredni kontakt z PDI. Disiarczki znajdujące się w centrum aktywnym Ero1 przeprowadzają więc reakcję utleniania cystein pętli zewnętrznej, która następnie przemieszcza się w kierunku domen a i a' PDI. W następnym etapie disiarczki pętli zewnętrznej Ero1 katalizują utlenienie grup tiolowych PDI z utworzeniem mostka disiarczowego w centrum aktywnym PDI. Ostatnim etapem procesu jest „powrót promu na pierwotny brzeg” - zewnętrzna pętla Ero1 zawierająca reszty cysteinowe, które uległy redukcji w wyniku utleniania PDI cofa się w stronę centrum aktywnego. Zredukowane disiarczki pętli zewnętrznej przenoszą elektrony na disiarczki centrum katalitycznego, które ulegają zależnemu od dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD) ponownemu utlenieniu. Procesowi towarzyszy przeniesienie elektronów na tlen cząsteczkowy i w rezultacie utworzenie nadtlenu wodoru [8,81]. Możliwe, że oprócz FAD występują także inne czynniki funkcjonujące jako akceptory elektronów w procesie reoksydacji Ero1 np. cytochrom C, cytochrom b5 [28] (ryc. 9).

Aktywność PDI, jak wspomniano wcześniej, wiąże się również z obecnością glutationu. Glutation w postaci zredukowanej współzawodniczy z wolnymi grupami tiolowymi białek, w tym także PDI, o utlenienie przeprowadzane przez Ero1, co może mieć bezpośrednie przełożenie na utrzymanie Ero1 w stanie zredukowanym. Ero1 w stanie zredukowanym nie może przeprowadzać procesu utlenie-

nia PDI i tym samym glutation hamuje tworzenie wiązań disiarczkowych w białkach obecnych w ER [53]. Glutation w postaci utlenionej przeprowadza reakcję utlenienia PDI przez reakcję sieciowej izomeryzacji, której towarzyszy redukcja cząsteczki glutationu. Glutation funkcjonuje także jak bufor stanu redoks PDI obecnego w ER, czyli jest swego rodzaju zapasem zarówno czynników redukujących jak utleniających, co pozwala komórkom na szybką reakcję w zależności od równowagi redoks w ER. Ze względu na niższe stężenie glutationu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w porównaniu do ER, jego rola jako buforu stanu redoks PDI poza komórką jest słabsza [29] (ryc. 10).

ROLA PDI W AKTYWACJI INTEGRYN

Aktywacja integryn reguluje wiele procesów, takich jak stany zapalne, hemostaza, adhezja, migracja, proliferacja komórek, angiogeneza i przerzutowanie komórek nowotworowych. Molekularny mechanizm przejścia integryny w postać aktywną polega na zmianie struktury przestrzennej receptora prowadzącej do ekspozycji domeny wiążącej ligand. W ostatnim czasie pojawiło się coraz więcej dowodów potwierdzających rolę reorganizacji wiązań disiarczkowych w procesie aktywacji integryn. Cząsteczka integryny jest bogata w reszty cysteinowe tworzące mostki disiarczkowe, nadające im odpowiednią konformację. Powstawanie wiązań disiarczkowych, ich redukcja i izomeryzacja są katalizowane przez izomerazę disiarczkową (PDI). Proces agregacji płytek krwi jest przykładem udziału PDI w aktywacji integryn. W nieaktywnych płytkach krwi liczba cząsteczek PDI na ich powierzchni wynosi w przybliżeniu 2400 cząsteczek na płytkę. Natomiast w czasie aktywacji liczba ta wzrasta aż do 6500 kopii PDI na płytkę [11]. PDI występuje na powierzchni pochodzących z płytek krwi mikropęcherzyków, które są najliczniej występującymi mikropęcherzykami we krwi [66]. Sposób w jaki PDI unika retencji do wnętrza ER zależnej od sekwencji KDEL oraz jest transportowane na zewnątrz komórki i pozostaje przyłączone do błony komórkowej płytek krwi nie jest wyjaśniony. Prawdopodobnie PDI transportowane jest z ER na zewnątrz płytek w wyniku tworzenia pęcherzyków, a do błony komórkowej przytwierdza się na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych [17].

Stosując przeciwciała anty-PDI wykryto, że blokowanie aktywności PDI powodowało hamowanie agregacji płytek krwi, w którą zaangażowana była integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$. Przeciwciała anty-PDI blokowały także niezależną od systemów przekazywania sygnału aktywację $\alpha_{IIb}\beta_3$ indukowaną przez jony Mn^{2+} [23]. PDI może być zaangażowane w drugą fazę agregacji płytek, która wymagałaby zmian konformacyjnych w obrębie integryn. Użycie bacytracyny, inhibitora PDI powodowało zahamowanie drugiego, nieodwracalnego etapu agregacji płytek, a jedynie w niewielkim stopniu zahamowanie pierwszego etapu [24]. Jednym z potencjalnych miejsc działania PDI w integrynie $\alpha_{IIb}\beta_3$, jest wiązanie Cys-663-Cys-687, które jest allosterycznym mostkiem disiarczkowym łatwo ulegającym przecięciu. Rozerwanie tego wiązania powoduje utrzymywanie in-

tegryny $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ w stanie konstytutywnie aktywnym warunkującym konformację przestrzenną, która umożliwia wiązanie fibrynogenu [13]. Blokowanie aktywności PDI prowadzi także do zahamowania późniejszych etapów krzepnięcia: wytwarzania i akumulacji trombiny, która przekształca fibrynogen do fibryny tworzącej szkielet zakrzepu [18].

Innym przykładem potwierdzającym rolę PDI w aktywacji integrzyn są procesy zachodzące w komórkach śródbłónka naczyniowego. Ekspozycja komórek śródbłónka naczyniowego na działanie jonów Mn^{2+} nasila zjawiska adhezyjne. Jony Mn^{2+} indukują zwiększenie powinowactwa integryny $\alpha_v\beta_3$ do liganda, prawdopodobnie pod wpływem zwiększonej ekspresji grup tiolowych na powierzchni cząsteczki. Proces ten nie może być traktowany jako etap „aktywacji” integryny $\alpha_v\beta_3$ *sensu stricto* ponieważ obecność samych jonów Mn^{2+} nie może wymusić zmian konformacyjnych w kierunku utworzenia trwale aktywnej cząsteczki integryny [78]. Dodanie jonów Ca^{2+} do komórek traktowanych wcześniej Mn^{2+} zmniejsza zdolność integryny $\alpha_v\beta_3$ do wiązania fibrynogenu, a więc powoduje reakcję powrotu do stanu nieaktywnego [100]. Sytuacja wydaje się jeszcze bardziej skomplikowana, gdyż w przypadku integryny $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ traktowanie komórek śródbłónka naczyniowego jonami Mn^{2+} , powoduje jedynie niewielkie nasilenie adhezji, a więc integryny $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ muszą się różnić odpowiedzią na jony Mn^{2+} . Istotne jest również to, że najmniejszym elementem integryny $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ zdolnym do odpowiedzi na aktywację jonami wapnia jest region calf-2 w podjednostce α , który nie zawiera żadnych potencjalnych miejsc wiązania jonów dwuwartościowych [47].

Jony Mn^{2+} inicjują tworzenie kompleksów między integryną $\alpha_v\beta_3$ oraz PDI. Kompleksy te są stosunkowo trwałe i ulegają dysocjacji dopiero po zajściu reakcji utleniania-redukcji. Analizując procesy, w których inkubacja komór-

rek śródbłónka naczyniowego z jonami Mn^{2+} bezpośrednio aktywuje integryny i to, że jony Mn^{2+} samodzielnie nie mogą inicjować wszystkich etapów aktywacji, ale indukują tworzenie kompleksów $\alpha_v\beta_3$ z PDI otrzymamy wyraźne potwierdzenie teorii, że to właśnie PDI pełni główną rolę w mechanizmie aktywacji integrzyn zależnym od reorganizacji wiązań disiarczkowych. [77,78].

W przypadku płytek krwi PDI tworzy kompleksy z integryną $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ oraz białkiem Ero1 α , które funkcjonuje jako elementarny czynnik przeprowadzający PDI ze stanu nieaktywnego do aktywnego na zasadzie reakcji utleniania-redukcji. PDI, $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ oraz Ero1 α tworzą kompleksy zarówno kowalencyjnie, jak i niekowalencyjnie związane, a przy tym cechujące się różną wielkością, bo wahającą się w granicach 250-300 kDa. Różna wielkość kompleksów PDI i Ero1 α może obrazować różne etapy wiązania tych dwóch białek i byłaby kolejnym dowodem na ich wspólną interakcję na powierzchni płytek krwi [77]. Oddziaływanie między integryną, PDI i Ero1 na powierzchni komórek może być jednym z mechanizmów aktywacji integrzyn.

W ciągu ostatnich lat obserwuje się szybki postęp w poznaniu i zrozumieniu struktury i funkcji integrzyn, co doprowadziło do wykrycia nowych terapeutycznych kompleksów przeciwdziałających procesom zakrzepowym i zapalnym. Poznanie mechanizmu aktywacji integrzyn jest istotne ze względu na poszukiwanie nowych terapii w przypadku zawałów serca, zatorów żylnych czy przerzutowania nowotworów. Integryny są jedynymi receptorami niekonstytutywnie aktywnymi. Aktywacja integrzyn prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie ich cząsteczki, co umożliwia wiązanie liganda. Podczas reakcji ligand-receptor, integryny funkcjonują jako allosteryczny receptor zdolny do przejścia ze stanu o niewielkim do stanu o dużym powinowactwie do liganda. Przejściu towarzyszą zmiany konformacyjne receptora. Ostatnie lata dostarczyły przekonują-

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adair B.D., Yeager M.: Three-dimensional model of the human platelet integrin $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 14059-14064
- [2] Anderson M.E., Meister A.: Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 9530-9533
- [3] Andersson A., Isaksson A., Brattström L., Hultberg B.: Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. *Clin. Chem.*, 1993; 39: 1590-1597
- [4] Appenzeller-Herzog C., Riemer J., Christensen B., Sorensen E.S., Ellgaard L.: A novel disulphide switch mechanism in Ero1 α balances ER oxidation in human cells. *EMBO J.*, 2008; 27: 2977-2987
- [5] Aszodi A., Hunziker E.B., Brakebusch C., Fässler R.: β_1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.*, 2003; 17: 2465-2479
- [6] Baciuc P.C., Suleiman E.A., Deryugina E.I., Strongin A.Y.: Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro- α_v integrin regulates cross-talk between $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins in breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 2003; 291: 167-175
- [7] Beglova N., Blacklow S.C., Takagi J., Springer T.A.: Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat. Struct. Biol.*, 2002; 9: 282-287
- [8] Benham A.M., Cabibbo A., Fassio A., Bulleid N., Sitia R., Braakman L.: The CXXCXXC motif determines the folding, structure and stability of human Ero1-L α . *EMBO J.*, 2000; 19: 4493-4502
- [9] Bennett T.A., Edwards B.S., Sklar L.A., Rogelj S.: Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes. *J. Immunol.*, 2000; 164: 4120-4129
- [10] Bi S., Hong P.W., Lee B., Baum L.G.: Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 10650-10655
- [11] Burgess J.K., Hotchkiss K.A., Suter C., Dudman N.P., Szöllösi J., Chesterman C.N., Chong B.H., Hogg P.J.: Physical proximity and functional association of glycoprotein 1b α and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 9758-9766

- [12] Burke R.D.: Invertebrate integrins: structure, function and evolution. *Int. Rev.Cytol.*, 1999; 191: 257-284
- [13] Butta N., Arias-Salgado E.G., González-Manchón C., Ferrer M., Larrucea S., Ayuso M.S., Parrilla R.: Disruption of the β_3 663-687 disulfide bridge confers constitutive activity to β_3 integrins. *Blood*, 2003; 102: 2491-2497
- [14] Cabrera M., Muñoz M., Hidalgo J., Vega L., Martín M.E., Velasco A.: The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol. Biol. Cell*, 2003; 14: 4114-4125
- [15] Cai H., Wang C.C., and Tsou C.L.: Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 24550-24552
- [16] Calvete J.J., Henschen A., González-Rodríguez J.: Complete localization of the intrachain disulphide bonds and the N-glycosylation points in the alpha-subunit of human platelet glycoprotein IIb. *Biochem. J.*, 1989; 261: 561-568
- [17] Chen K., Detwiler T.C., Essex D.W.: Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *Br. J. Haematol.*, 1995; 90: 425-431
- [18] Cho J., Furie B.C., Coughlin S.R., Furie B.: A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 1123-1131
- [19] Dyson H.J., Jeng M.F., Tennant L.L., Slaby I., Lindell M., Cui D.S., Kuprin S., Holmgren A.: Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in *Escherichia coli* thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp26 and Lys57. *Biochemistry*, 1997; 36: 2622-2636
- [20] Eliceiri B.P., Klemke R., Stromblad S., Cheres D.A.: Integrin $\alpha V\beta 3$ requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J. Cell Biol.*, 1998; 140: 1255-1263
- [21] Emsley J., Knight C.G., Farndale R.W., Barnes M.J., Liddington R.C.: Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha 2\beta 1$. *Cell*, 2000; 101: 47-56
- [22] Essex, D.W.: Redox control of platelet function. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 1191-1225
- [23] Essex D.W., Chen K., Swiatkowska M.: Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood*, 1995; 86: 2168-2173
- [24] Essex D.W., Li M.: Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br. J. Haematol.*, 1999; 104: 448-454
- [25] Frand A.R., Kaiser C.A.: Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, 2000; 11: 2833-2843
- [26] Gess B., Hofbauer K.H., Wenger R.H., Lohaus C., Meyer H.E., Kurtz A.: The cellular oxygen tension regulates expression of the endoplasmic reticulum oxidoreductase ER01-L α . *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 2228-2235
- [27] Goldberger R.F., Epstein C.J., Anfinsen C.B.: Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1963; 238: 628-635
- [28] Gross E., Sevier C.S., Heldman N., Vitu E., Bentzur M., Kaiser C.A., Thorpe C., Fass D.: Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 299-304
- [29] Hatahet F., Ruddock L.W.: Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 2807-2850
- [30] Humphries M.J.: Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000; 28: 311-339
- [31] Hynes R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002; 110: 673-687
- [32] Hynes R.O., Zhao Q.: The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.*, 2000; 150: F89-F96
- [33] Kamata T., Ambo H., Puzon-McLaughlin W., Tieu K.K., Handa M., Ikeda Y., Takada Y.: Critical cysteine residues for regulation of integrin $\alpha 1\beta 3$ are clustered in the epidermal growth factor domains of the $\beta 3$ subunit. *Biochem. J.*, 2004; 378: 1079-1082
- [34] Kamata T., Handa M., Sato Y., Ikeda Y., Aiso S.: Membrane-proximal α/β stalk interactions differentially regulate integrin activation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 24775-24783
- [35] Kiema, T., Lad Y., Jiang P., Oxley C.L., Baldassarre M., Wegener K.L., Campbell I.D., Ylanne J., Calderwood D.A.: The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol. Cell*, 2006; 21: 337-347
- [36] Klappa P., Hawkins H.C., Freedman R.B.: Interactions between protein disulfide isomerase and peptides. *Eur. J. Biochem.*, 1997; 248: 37-42
- [37] Klappa P., Koivunen P., Pirneskoski A., Karvonen P., Ruddock L.W., Kivirikko K.I., Freedman R.B.: Mutations that destabilize the a' domain of human protein-disulfide isomerase indirectly affect peptide binding. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 13213-13218
- [38] Klappa P., Ruddock L.W., Darby N.J., Freedman R.B.: The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. *EMBO J.*, 1998; 17: 927-935
- [39] Koivunen P., Pirneskoski A., Karvonen P., Ljung J., Helaakoski T., Notbohm H., Kivirikko K.I.: The acidic C-terminal domain of protein disulfide isomerase is not critical for the enzyme subunit function or for the chaperone or disulfide isomerase activities of the polypeptide. *EMBO J.*, 1999; 18: 65-74
- [40] Kortemme T., Creighton T.E.: Ionisation of cysteine residues at the termini of model α -helical peptides: relevance to unusual thiol pK_a values in proteins of the thioredoxin family. *J. Mol. Biol.*, 1995; 253: 799-812
- [41] Kortemme T., Darby N.J., Creighton T.E.: Electrostatic interactions in the active site of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, 1996; 35: 14503-14511
- [42] Kozlov G., Määttänen P., Thomas D.Y., Gehring K.: A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J.*, 2010; 277: 3924-3936
- [43] Lappi A.K., Lensink M.F., Alanen H.I., Salo K.E., Lobell M., Juffer A.H., Ruddock L.W.: A conserved arginine plays a role in the catalytic cycle of the protein disulphide isomerases. *J. Mol. Biol.*, 2004; 335: 283-295
- [44] Laurindo F.R., Pescatore L.A., Fernandes D.C.: Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012; 52: 1954-1966
- [45] Lee J.O., Rieu P., Arnaout M.A., Liddington R.: Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, 1995; 80: 631-638
- [46] Lissitzky J.C., Luis J., Munzer J.S., Benjannet S., Parat F., Chrétien M., Marvaldi J., Seidah N.G.: Endoproteolytic processing of integrin pro- α subunits involves the redundant function of furin and pro-protein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem. J.*, 2000; 346: 133-138
- [47] Loftus J.C., Liddington R.C.: Cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 2302-2306
- [48] Luo B.H., Carman C.V., Springer T.A.: Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007; 25: 619-647
- [49] Mansoor M.A., Svoldal A.M., Ueland P.M.: Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal. Biochem.*, 1992; 200: 218-229
- [50] Marciniak S.J., Yun C.Y., Oyadomari S., Novoa I., Zhang Y., Jungreis R., Nagata K., Harding H.P., Ron D.: CHOP induces death by pro-

moting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.*, 2004; 18: 3066-3077

[51] Masui, S., Vavassori, S., Fagioli, C., Sitia, R., Inaba K.: Molecular bases of cyclic and specific disulfide interchange between human ERO1 α protein and protein-disulfide isomerase (PDI). *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 16261-16271

[52] Meister A.: A glutathione metabolism. *Methods Enzymol.*, 1993 39: 1590-1597

[53] Molteni S.N., Fassio A., Ciriolo M.R., Filomeni G., Pasqualetto E., Fagioli C., Sitia R.: Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 32667-32673

[54] Mor-Cohen R., Rosenberg N., Einav Y., Zelzion E., Landau M., Mansour W., Averbukh Y., Seligsohn U.: Unique disulfide bonds in epidermal growth factor (EGF) domains of $\beta 3$ affect structure and function of $\alpha \text{IIb}\beta 3$ and $\alpha \text{v}\beta 3$ integrins in different manner. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 8879-8891

[55] Mor-Cohen R., Rosenberg N., Landau M., Lahav J., Seligsohn U.: Specific cysteines in $\beta 3$ are involved in disulfide bond exchange-dependent and -independent activation of $\alpha \text{IIb}\beta 3$. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 19235-19244

[56] Mould A.P., Akiyama S.K., Humphries M.J.: Regulation of integrin $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 26270-26277

[57] Mould A.P., Barton S.J., Askari J.A., Craig S.E., Humphries M.J.: Role of ADMIDAS cation-binding site in ligand recognition by integrin $\alpha 5\beta 1$. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 51622-51629

[58] Mould A.P., Humphries M.J.: Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004; 16: 544-551

[59] Noiva R., Freedman R.B., Lennarz W.J.: Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 19210-19217

[60] O'Neill S., Robinson A., Deering A., Ryan M., Fitzgerald D.J., Moran N.: The platelet integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ has an endogenous thiol isomerase activity. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 36984-36990

[61] Pagani M., Fabbri M., Benedetti C., Fassio A., Pilati S., Bullied N.J., Cabibbo A., Sitia R.: Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-L β (ERO1-L β), a human gene induced in the course of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 23685-23692

[62] Plow E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J., Smith J.W.: Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 21785-21788

[63] Puig A., Gilbert H.F.: Protein disulfide isomerase activity exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 7764-7771

[64] Qi Y., Grishin N.V.: Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins*, 2005; 58: 376-388

[65] Quan H., Fan G., Wang C.C.: Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 17078-17080

[66] Raturi A., Miersch S., Hudson J.W., Mutus B.: Platelet microparticle-associated protein disulfide isomerase promotes platelet aggregation and inactivates insulin. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008; 1778: 2790-2796

[67] Rigobello M.P., Donella-Deana A., Cesaro L., Bindoli A.: Distribution of protein disulfide isomerase in rat liver mitochondria. *Biochem. J.*, 2001; 356: 567-570

[68] Ruiz C., Liu C.Y., Sun Q.H., Sigaud-Fiks M., Fressinaud E., Muller J.Y., Nurden P., Nurden A.T., Newman P.J., Valentin N.: A point mutation in the cysteine-rich domain of glycoprotein (GP) IIIa results in the expression of a GPIIb-IIIa ($\alpha \text{IIb}\beta 3$) integrin receptor locked in a high-affinity state and a Glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Blood*, 2001; 98: 2432-2441

[69] Schwander M., Leu M., Stumm M., Dorchies O.M., Ruegg U.T., Schittny J., Müller U.: $\beta 1$ integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell*, 2003; 4: 673-685

[70] Schwartz M.A., Schaller M.D., Ginsberg M.H.: Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1995; 11: 549-599

[71] Shi M., Sundramurthy K., Liu B., Tan S.M., Law S.K., Lescar J.: The crystal structure of the plexin-semaphorin-integrin domain/hybrid domain/I-EGF1 segment from the human integrin $\beta 2$ subunit at 1.8-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 30586-30593

[72] Shimaoka M., Xiao T., Liu J.H., Yang Y., Dong Y., Jun C.D., McCormack A., Zhang R., Joachimiak A., Takagi J., Wang J.H., Springer T.A.: Structures of the αL domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*, 2003; 112: 99-111

[73] Smagghe B.J., Huang P.S., Ban Y.E., Baker D., Springer T.A.: Modulation of integrin activation by an entropic spring in the β -knee. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 32954-32966

[74] Song J.L., Wang C.C.: Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese. *Eur. J. Biochem.*, 1995; 231: 312-316

[75] Springer T.A., Dustin M.L.: Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2012; 24: 107-115

[76] Stewart P.L., Nemerow G.R.: Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends Microbiol.*, 2007; 15: 500-507

[77] Swiatkowska M., Padula G., Michalec L., Stasiak M., Skurzynski S., Cierniewski C.S.: Ero1 α is expressed on blood platelets in association with protein-disulfide isomerase and contributes to redox-controlled remodeling of $\alpha \text{IIb}\beta 3$. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 29874-29883

[78] Swiatkowska M., Szymański J., Padula G., Cierniewski C.S.: Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with $\alpha \text{v}\beta 3$ integrin on endothelial cells. *FEBS J.*, 2008; 275: 1813-1823

[79] Takada Y., Ye X., Simon S.: The integrins. *Genome Biol.*, 2007; 8: 215

[80] Takagi J., Beglova N., Yalamanchili P., Blacklow S.C., Springer T.A.: Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin β subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 11175-11180

[81] Tavender T.J., Bulleid N.J.: Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum. *Antioxid. Redox Signal.*, 2010; 13: 1177-1187

[82] Tu Y., Wu S., Shi X., Chen K., Wu C.: Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*, 2003; 113: 37-47

[83] Turano C., Coppari S., Altieri F., Ferraro A.: Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J. Cell. Physiol.*, 2002; 193: 154-163

[84] Ueland P.M., Mansoor M.A., Guttormsen A.B., Müller F., Aukrust P., Refsum H., Svandal A.M.: Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status a possible element of the extracellular antioxidant defense system. *J. Nutr.*, 1996; 126: 1281S-1294S

[85] Venetianer P. Straub F.B.: Enzymic formation of the disulfide bridges of ribonuclease. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1963; 24: 41-53

[86] Vinogradova O., Haas T., Plow E.F., Qin J.: A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the αIIb -subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 1450-1455

[87] Vinogradova O., Vaynberg J., Kong X., Haas T.A., Plow E.F., Qin J.: Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 4094-4099

- [88] Vorup-Jensen T., Ostermeier C., Shimaoka M., Hommel U., Springer T.A.: Structure and allosteric regulation of the $\alpha X\beta 2$ integrin I domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 1873-1878
- [89] Vorup-Jensen T., Waldron T.T., Astrof N., Shimaoka M., Springer T.A.: The connection between metal ion affinity and ligand affinity in integrin I domains. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1774: 1148-1155
- [90] Walker K.W., Gilbert H.F.: Scanning and escape during protein-disulfide isomerase assisted protein folding. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 8845-8848
- [91] Wan S.W., Lin C.F., Lu Y.T., Lei H.Y., Anderson R., Lin Y.S.: Endothelial cell surface expression of protein disulfide isomerase activates $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins and facilitates dengue virus infection. *J. Cell. Biochem.*, 2012; 113: 1681-1691
- [92] Wang L., Wang L., Vavassori S., Li S., Ke H., Anelli T., Degano M., Ronzoni R., Sitia R., Sun F., Wang C.C.: Crystal structure of human ERp44 shows a dynamic functional modulation by its carboxy-terminal tail. *EMBO Rep.*, 2008; 9: 642-647
- [93] Wilkinson B., Gilbert H.F.: Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1699: 35-44
- [94] Willems S.H., Tape C. J., Stanley P.L., Taylor N. A., Mills I.G., Neal D.E., McCafferty J., Murphy G.: Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem. J.*, 2010; 428: 439-450
- [95] Winter J., Klappa P., Freedman R.B., Lilie H., Rudolph R.: Catalytic activity and chaperone function of human protein-disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 310-317
- [96] Xie L., Chesterman C.N., Hogg P.J.: Reduction of von Willebrand factor by endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.*, 2000; 84: 506-513
- [97] Xiong J.P., Mahalingham B., Alonso J.L., Borrelli L.A., Rui X., Anand S., Hyman B.T., Rysiok T., Müller-Pompalla D., Goodman S.L., Arnaout M.A.: Crystal structure of the complete integrin $\alpha V\beta 3$ ectodomain plus an α/β transmembrane fragment. *J. Cell Biol.*, 2009; 186: 589-600
- [98] Xiong J.P., Stehle T., Goodman S.L., Arnaout M.A.: A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 40252-40254
- [99] Xiong J.P., Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman S.L., Arnaout M.A.: Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, 2002; 296: 151-155
- [100] Yan B., Hu D.D., Knowles S.K., Smith J.W.: Probing chemical and conformational differences in the resting and active conformers of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 7249-7260
- [101] Yao Y., Zhou Y.C., Wang C.: Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2. *EMBO J.*, 1997; 16: 651-658
- [102] Ye F., Hu G., Taylor D., Ratnikov B., Bobkov A.A., McLean M.A., Sligar S.G., Taylor K.A., Ginsberg M.H.: Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J. Cell Biol.*, 2010; 188: 157-173

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.