

Choroby człowieka wywołane mutacjami genów kodujących koneksyny

Marcin Gradowski¹, Urszula Jankiewicz¹, *Paweł Kowalczyk²

¹Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

²Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

HUMAN DISEASES CAUSED BY MUTATIONS IN GENES ENCODING CONNEXIN

Summary

Intercellular communication plays an important role in maintaining the normal function of tissues and the regulation of proliferation, differentiation, and cell death. This is extremely important connexin transmembrane proteins forming structures called connexons. These structures are part of the water channels called gap-type connections. There are four types of these connections, depending on the isoforms constituent connexins. So far, humans understood 21 isoforms of connexins in mice 19th A connexin protein with a short half-life, the life cycle of these proteins is regulated by phosphorylation mechanism/dephosphorylation. Genes encoding these proteins are localized in humans on a number of chromosomes, may form clusters. Mutations in genes encoding connexin cause severe inherited disorders in humans, such as deafness, associated or not with a skin disease, or ODD syndrome, which is a condition pleiotropic. Because of the important role they play in the connexin intercellular communication, and indirectly in the maintenance of homeostasis of the whole organism, it is important to further study the properties and functions of these proteins.

Key words: connexin, connexons, gap junction, nervous system, disease, gen

WSTĘP

Koneksyny (Cx) należą do rodziny integralnych białek międzybłonowych, które razem tworzą heksagonalne struktury – kanały nazywane koneksonami. Sparowane koneksyny tworzą razem międzykomórkowe połączenia ściste, inaczej nazywane synapsami typu neksus; niezbędne są one do szybkiej międzykomórkowej komunikacji elektrycznej i wolniejszej w postaci przepływu nieorganicznych jonów, wtórnych przekaźników oraz innych molekuł o wielkości około 1-2 kDa, które rozpuszczają się w wodzie. U człowieka występuje 21 izoform białek z rodziny koneksyn. Izoformy te można spotkać w całym organizmie człowieka, w tych samych komórkach może występować kilka różnych koneksyn. Cx są białkami występującymi wyłącznie w organizmie kręgowców. U bezkręgowców występują homologiczne do koneksyn białka – ineksyny (Inx), które posiadają podobne funkcje i też budują połączenia ściste. Oprócz koneksyn w organizmie kręgowców znaleziono białka, które są podobne pod względem strukturalnym do koneksyn i ineksyn, nazwane paneksynami (1-3). Koneksyny mają podobną przestrzenną budowę cząsteczek, składającą się z N-terminalnego ogona, czterech domen transmembranowych, dwóch pętli zewnątrzkomórkowych, jednej pętli cytoplazmatycznej oraz ogona C-terminalnego. Różnice w obrębie tych struktur mają wpływ na właściwości każdej izoformy tego białka. Właściwości te

decydują, o jakim składzie koneksynowym powstaną koneksyny i w kolejności połączenia ściste oraz jakie będą właściwości tych kanałów. Pojedyncze koneksyny, jak i sparowane odpowiadają za homeostazę tkankową, procesy związane z gospodarką jonową komórki oraz regulację różnych procesów komórkowych, takich jak cykl komórkowy, rozwój, różnicowanie i migracja, a także za aktywację procesów związanych z apoptozą lub jej zahamowaniem (3, 4). Mutacje genów kodujących te białka prowadzą do chorób dziedzicznych organizmu człowieka. Tak więc koneksyny odpowiadają pośrednio za prawidłowe funkcjonowanie komórek, tkanek i całego organizmu. Dlatego dalsze badania nad tymi białkami pozwolą nam na dokładniejsze ich poznanie i w konsekwencji leczenie chorób związanych z mutacją genów kodujących te białka (5).

DOMENY FUNKCJONALNE KONEKSYN I ICH FUNKCJE

Wszystkie dotychczas poznane koneksyny mają zbliżoną budowę. Cząsteczka każdej koneksyny zbudowana jest z czterech transmembranowych domen (TM1-4) o charakterze hydrofobowym, jednej pętli wewnątrzkomórkowej (CL) oraz dwóch pętli pozakomórkowych (E1-2). Prócz tego w cytoplazmie zanurzone są końce – aminowy (NT) pochodzący od pierwszej domeny transmembranowej oraz koniec karboksylowy (CT) pochodzący od czwartej domeny transmembranowej. Ta klasyczna

topologia została potwierdzona przez wiele badań nad Cx26, Cx32 i Cx43 (5, 6) (ryc. 1, 2).

LOKALIZACJA TKANKOWA KONEKSYN

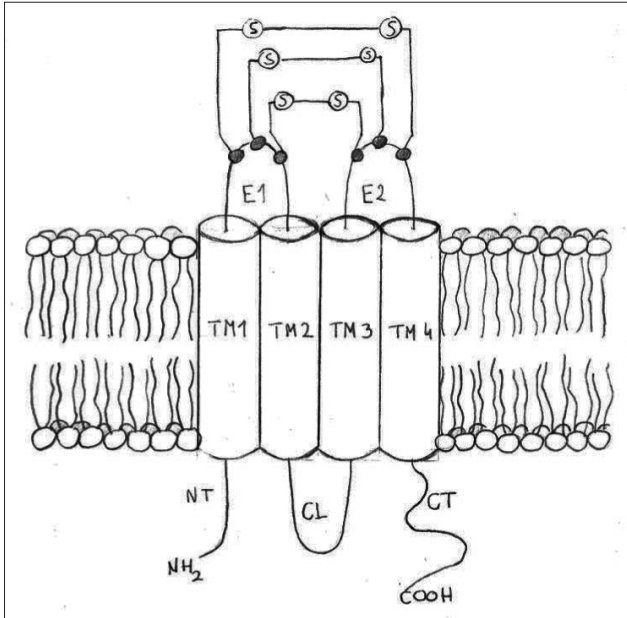
Można stwierdzić, że przedstawiciele białek z rodziny koneksyn występują niemalże w każdej komórce

organizmu kręgowców. W tabeli 1 przedstawiono miejsca występowania koneksyn w organizmie człowieka. Wynika z niej, że różne komórki organizmu mogą kodować kilka różnych (nie zawsze tych samych) koneksyn.

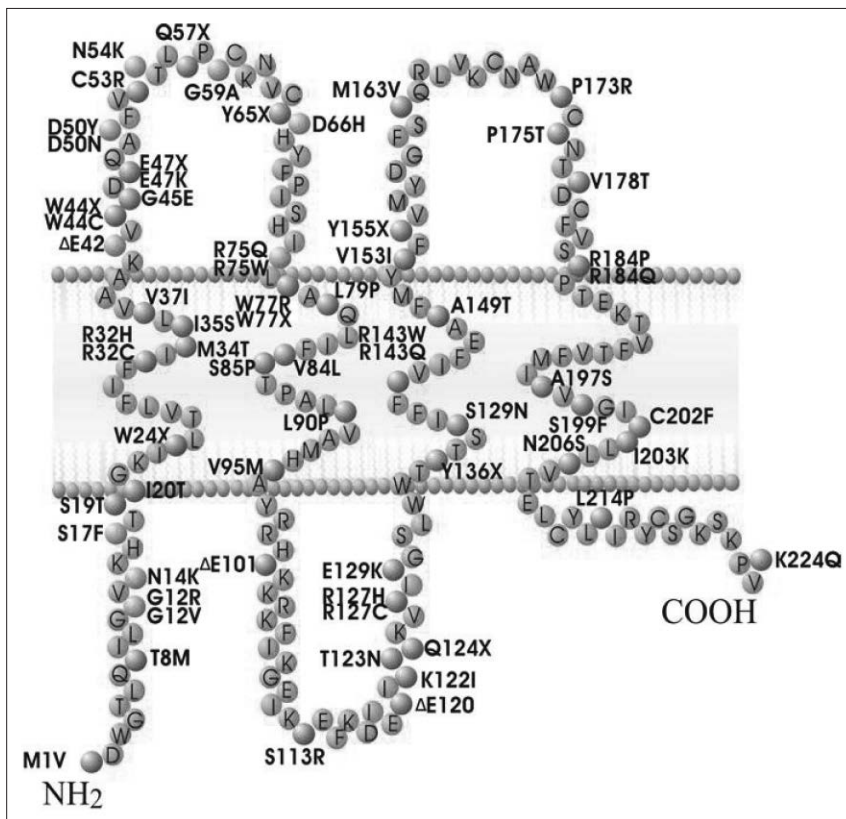
GENY KODUJĄCE KONEKSYNY

Do chwili obecnej rozpoznano w genomie człowieka 21, a u myszy 20 genów kodujących białka z rodziny koneksyn, z czego 19 tworzy ortologiczne pary. U człowieka, w odróżnieniu od myszy, występują geny kodujące *hCx25* i *hCx59*, natomiast gen kodujący koneksynę *Cx33* jest charakterystyczny dla myszy. Ponadto koneksyny kodowane przez geny ortologi mogą funkcjonować w innych narządach u myszy i u człowieka. Dla przykładu: *hCx30.2*, *hCx31.9*, *hCx40.1* i *hCx62* występują w mięśniu serca człowieka, czego nie stwierdzono dla ich mysich ortologów, odpowiednio: *mCx29*, *mCx30.2*, *mCx39* i *mCx57*. W genomie człowieka zidentyfikowano dwa pseudogeny koneksyn *GJA6P* i *GJA1P1*, kodujące odpowiednio: *hCx31.9* i *hCx43* (14). U człowieka geny te są zlokalizowane na kilku chromosomach, m.in. na chromosomie 1 stwierdzono obecność ośmiu genów koneksyn, na chromosomie 6 – cztery, na 13 – trzy, na 17 – dwa, a na 7, 10, 15 i X po jednym genie koneksyn.

Geny kodujące koneksyny mają podobne układy strukturalne: nieulegający translacji region 5' (5'-UTR) – ekson 1 jest oddzielony intronem o zmiennej wielkości od eksonu 2. Ekson 2 zawiera pełną sekwencję kodującą oraz region 3' (UTR) nieulegający translacji. Jednak po-



Ryc. 1. Model budowy koneksyny (1-5).



Ryc. 2. Miejsca mutacji Cx26. Kolorem szarym zaznaczono zarówno mutacje związane z głuchotą i chorobami skóry (5).

znano także geny koneksyn różniące się od tego układu, dla przykładu gen *Gjc1* (kodujący Cx45) zawiera trzy eksony, w tym dwa 5V-UTR, trzeci zawiera sekwencję kodującą białko.

CHOROBY WYWOŁANE MUTACJAMI GENÓW KODUJĄCYCH KONEKSYNY

Mutacje w genach kodujących koneksyny prowadzą do dysfunkcji koneksyn i zmiany ich właściwości, co z kolei prowadzi do kilku chorób dziedzicznych organizmu człowieka, takich jak zaćma, głuchota, choroby skóry, choroby neurodegeneracyjne, choroby zaburzające komunikację międzykomórkową czy choroby zaburzające

rozwój. Nonsensowne mutacje mogą doprowadzić do zaniku fałdowania białka lub braku jego oligomeryzacji, co prowadzi do nieprawidłowego działania białka. W konsekwencji nie mogą powstać prawidłowe koneksyny i/lub połączenia ściśle bądź powstają, ale wadliwe. Najczęściej omawianymi chorobami są głuchota, choroby skóry oraz zespół ODD (5, 7, 10-20).

MUTACJE CX26 ZWIĄZANE Z GŁUCHOTĄ I CHOROBIAMI SKÓRY

Z głuchotą i chorobami skóry związane są mutacje czterech znanych nam koneksyn – Cx26, Cx30, Cx30.3 i Cx31. Do chorób tych zalicza się zespół Vohwinkela,

Tabela 1. Miejsca występowania koneksyn w organizmie człowieka.

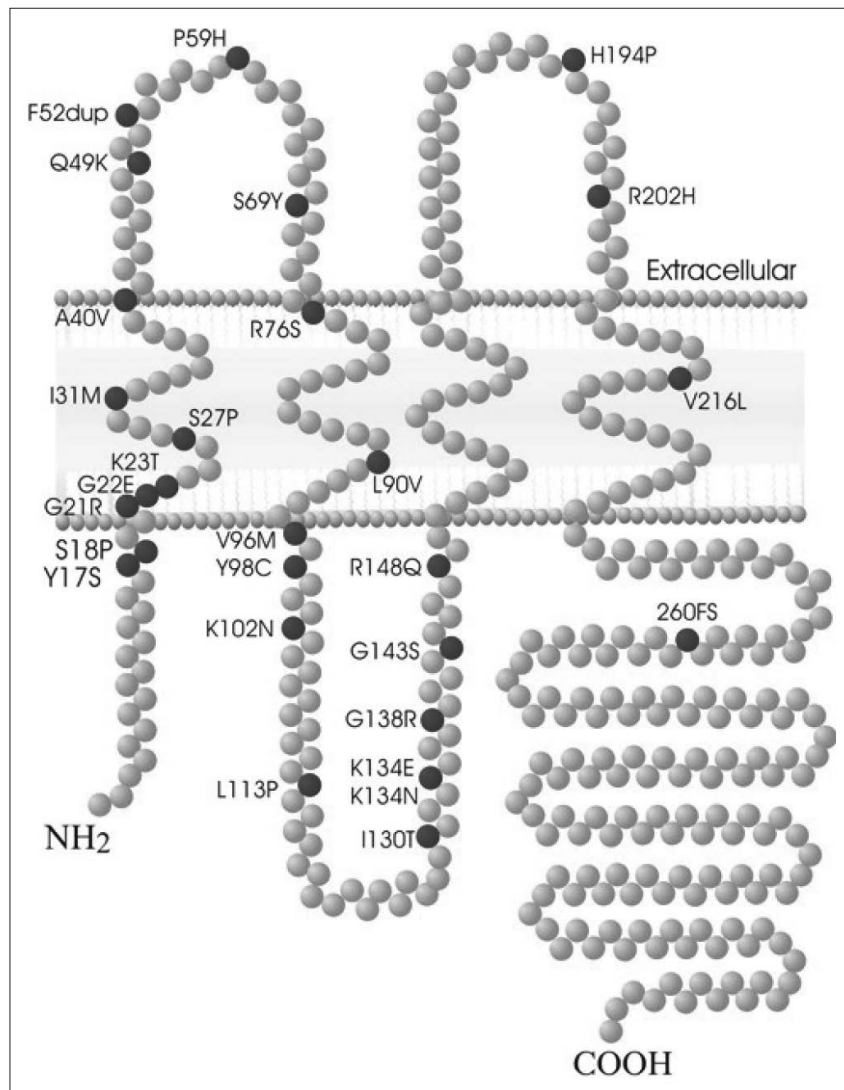
Nazwa wg Beyera (CxMW)	Nazwa wg HGNC	Położenie chromosomalne	Miejsca występowania w organizmie człowieka	Piśmiennictwo
hCx23	GLE1	6q24.1	soczewka	(7)
hCx25	GJB7	6q15	łożysko	(7)
hCx26	GJB2	13q11-q12	skóra, wątroba, nabłonek przewodu pokarmowego, łożysko, gruczoły sutkowe, błony śluzowe, trzustka, jelito, płuca, ślimak, OUN, macica, nerki	(3-5, 7, 10-12)
hCx30	GJB6	13q12	skóra, nerki, błony śluzowe, ślimak, OUN, rogówka	(7, 10)
hCx30.2 (hCx31.3)	GJC3	7q21.1	OUN, serce	(7, 13)
hCx30.3	GJB4	1p35-p34	skóra, łożysko, blastocysty, nerki	(4, 7, 10, 12)
hCx31	GJB3	1p34	łożysko, jądra, nerki, ślimak, oczy, OUN, skóra	(7, 11)
hCx31.1	GJB5 GJA6P	1p34.3	skóra, blastocysta	(7, 11)
hCx31.9	GJD3	17q21.1	jądra, serce	(7, 13)
hCx32	GJB1	Xp13.1	nerki, OUN, wątroba, trzustka, gruczoły sutkowe, nerki, tarczyca, nabłonek przewodu pokarmowego, macica	(3, 4, 7, 10)
hCx36	GJD2	15q13.1	ślinianki, trzustka, soczewka, układ nerwowy	(4, 7)
hCx37	GJA4	1p35.1	naczynia krwionośne, jądra, oocyty, żołądek, serce, nerki	(7, 14)
hCx40	GJA5	1q12.1	serce, naczynia krwionośne, nerki	(5, 7, 13)
hCx40.1	GJD4	10p11.22	rozwijające się mięśnie gładkie	(7)
hCx43	GJA1 GJA1P1	6q22-q23 5q21.3	serce, ślinianki, trzustka, kości, skóra, nerki, rogówka, płuca, soczewka, OUN, erytrocyty, mięśnie szkieletowe, mięśnie gładkie, macica	(4, 5, 7, 10-14)
hCx45	GJC1	17q21.31	jelita, skóra, płuca, blastocysta, OUN w okresie płodowym, serce, nerki	(5, 7, 10, 13)
hCx46	GJA3	13q12.11	nerki, soczewka, serce, płuca, kości, jądra, obwodowy układ nerwowy	(7, 10)
hCx47	GJC2	1q41-q42	OUN	(7)
hCx50	GJA8	1q21.1	soczewka, rogówka, siatkówka, serce, OUN	(7)
hCx59	GJA9	1p34	serce, mięśnie poprzecznie prążkowane	(7)
hCx62	GJA10	6q15-q16	serce, mięśnie poprzecznie prążkowane, jajniki, siatkówka	(7)

zespół KID (ang. *keratitis-ichthyosis-deafness*), zespół HID (ang. *hystrix-like-ichthyosis-deafness*), zespół Barta Pumpfrey'a i PKKs (ang. *palmoplantar keratoderma*) (5, 12-16). Ponieważ Cx26 występuje u człowieka najliczniej w warstwie podstawnej nabłonka dłoni i stóp, cechy tych chorób objawiają się poprzez nadmierne rogowacenie skóry dłoni i stóp, oprócz tego także poprzez hipertrofię komórek rogówki. Intrygujące jest to, że mutacje Cx26 powiązane są zarówno z samą głuchotą, jak i z głuchotą powiązaną z chorobą skóry. Miejsca mutacji równocześnie odpowiadające za oba schorzenia umiejscowione są na ogonku NT i pętli E1 koneksyny 26 (5). Cx26 są niezbędne do recyklingu potasu w ślimaku – części ucha środkowego. Ich mutacje związane są z głuchotą. Wiele tych mutacji związanych jest z interakcjami stabilizującymi strukturę monomeru i heksametru. Na przykład mutant Cx26 – W44C gromadzi się w cytoplazmie komórki, co związane jest z jego niemożnością do fałdowania, spowodowaną rozpadem hydrofobowego rdzenia monomeru Cx26. Innym przykładem jest mutant R184P niezdolny do oligomeryzacji. Wadliwa struktura mutantu R75W ukazuje, że ta mutacja związana jest z międzymonomerycznymi interakcjami w koneksynie i wyjaśnia wadliwość R75W (3, 5). Ukazano także, że mutant R75W tworzy niefunkcjonalne połączenia ściste i że dominuje nad ulegającą koekspresji „dziką” formą białka Cx26. Ponadto ma transdominacyjne właściwości blokujące koekspresję białka Cx43, co jest zjawiskiem ciekawym, gdyż „dzikie” typy Cx26 i Cx43 nie koolegomeryzują ze sobą. Następnym dobrze poznanym mutantem Cx26 odpowiadającym za oba schorzenia jest D66H. Mutanty D66H gromadzą się w sieci trans aparatu Golgiego, ponieważ te mutanty nie są zdolne do osiągnięcia membrany komórki i formowania funkcjonalnych kanałów połączeń ścisłych. Tak samo jak mutacja R75W, mutacja D66H występuje w pętli E1. Tłumaczy to niezdolność tych mutantów Cx26 do formowania funkcjonalnych kanałów i połączeń ścisłych. W dodatku D66H wykazuje takie same właściwości jak R75W wobec „dzikich” typów Cx26 i Cx43. Kolejny mutant Cx26 – G59A jest przykładem całkowitej dominacji i transdominacji nad „dziką” Cx26 (blokowanie koekspresji) i częściowej transdominacyjnej inhibicji aktywności koneksyn 32 i 43. G59A dociera do membrany komórki, ale nie buduje funkcjonalnych połączeń ścisłych. Badane mutanty sklasyfikowano w dwie grupy, pierwsza grupa określa mutanty, które docierają do błony i budują niefunkcjonalne połączenia, druga grupa zawiera mutanty, które nie docierają do błony komórki i pozostają przy organellum. Jednak mutanty obu grup docierają do miejsc, gdzie powinna zachodzić oligomeryzacja koneksyn i przechodzą przez mechanizm sprawdzania poprawności białek – ERAD (ang. *Endoplasmic reticulum associated protein degradation*). Z badań nad tymi mutantami Cx26 (powodującymi równocześnie głuchotę i choroby skóry) wysunięto hipotezę, że mutacje, które zachodzą w obrębie tej koneksyny, zwiększają zdolność mutantów do interakcji z jedną lub więcej koneksynami ulegającymi ekspresji w naskórku. Skutkiem tego może być utrata bądź częściowa redukcja GJIC (ang. *Gap Junctional*

Intercellular Communication – komunikacja międzykomórkowa ścisłych połączeń) (5).

MUTACJE CX43 ZWIĄZANE Z ZESPOŁEM ODD

Zespół ODD (dysplazja oczno-zębowo-palcowa, ang. *oculodentodigital dysplasia*) jest niezwykle rzadką chorobą plejotropiczną spowodowaną mutacją autosomalną dominującą genu kodującego Cx43. Objawami ODD mogą być syndaktylia, niesymetryczność budowy twarzoczaszki, zwiększona łamliwość paznokci, postępująca utrata słuchu, defekty w owłosieniu głowy, defekty w budowie soczewki oka i ślimaka (ucho środkowe), nienormalności w uzębieniu oraz choroby układu nerwowego i serca. Wszystkie te schorzenia związane są z dwudziestoma ośmioma mutacjami koneksyny 43. Tylko jedna z tych mutacji jest mutacją przesunięcia ramki odczytu w obrębie ogona CT, która powoduje utratę wielu miejsc fosforylacji oraz miejsc wiążących białka. Jak wcześniej wspomniano, choroba ta jest bardzo rzadka, a większość ludzi nią dotkniętych żyje bardzo długo przy dobrym zdrowiu. Wszystkie mutacje Cx43, w tym Y17S, G21R, A40V, F52dup (duplikacja kodonu w E1), L90V, I130T, K134E, G138R i R202H zostały dobrze poznane i wiadomo, że wszystkie prowadzą do utraty funkcji koneksyny. Mutanty Cx43, podobnie jak mutanty Cx26 można podzielić na dwie grupy: do pierwszej należą mutanty, które docierają do błony i tworzą niefunkcjonalne struktury podobne do połączeń ścisłych, do drugiej zaś należą mutanty, które nie osiągają błony komórki i zalegają w jej wnętrzu. Niektóre mutanty Cx43 mają działanie blokujące koekspresję „dzikiego” 43 typu koneksyny. Wyniki badań dotyczących inhibicyjnego działania mutantów G21R oraz G138R na koekspresję „dzikiego” typu Cx43 pokazały, że ilość białek mutantu w stosunku do „dzikich” białek Cx43 była ~5-krotnie większa. Inne badania ukazały również, że funkcjonalność niektórych mutantów można przywrócić poprzez wprowadzenie „dzikich” form białka Cx43. Do tej pory jednak nie udało się stworzyć modelu ludzkiego ODD u zwierzęcia, co pomogłoby w głębszym zbadaniu tej choroby. Przypadkowe generacje z użyciem mutagenu u myszy ukazały jedynie podobne cechy ODD do ludzkiego modelu tej choroby. Uważna analiza genetyczna mysiego modelu ODD ujawniła mutacje G60S znajdującą się w pętli E1. U człowieka w porównywalnym modelu Cx43 myszy najbliższą mutacją jest P59H. Wykazuje ona podobne właściwości do mysiej mutacji G60S. Ilość zmutowanych białek P59H u człowieka i G60S u myszy występuje w proporcji 1:1 względem „dzikich” Cx43. Dalsze studia ujawniły stan GJIC w komórkach warstwy ziarnistej jajników tych myszy na poziomie około 10-20% prawidłowych połączeń. Sugeruje to, że mutant dominująco blokuje działanie ulegających koekspresji „dzikich” form Cx43. Ponadto zredukowana ilość połączeń u tych zwierząt związana jest z utratą białek Cx43 i jeszcze wyraźniej wskazuje na to, że mutant odpowiada za destabilizację „dzikich” form Cx43. Wykazano, że u myszy ablacja genu kodującego koneksynę Cx43 jest letalna. Natomiast w przypadku człowieka obserwujemy zdolność do przeżycia, co sugeruje, że u ludzi zachodzi zjawisko kompensacji funkcji tej koneksyny przez inne białka z tej rodziny (5) (ryc. 3).



Ryc. 3. Cx43. Kolorem czarnym zaznaczone są miejsca mutacji koneksyny (5).

PODSUMOWANIE

Dalsze badania nad mutacjami koneksyn powiązany-
mi z różnymi schorzeniami ujawnią i pomogą zrozumieć
mechanizmy działania mutacji, a także pomogą leczyć
choroby związane z nimi. □

Piśmiennictwo

1. Laird DW: The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trend in Cell Biology* 2009; 20(2): 92-101. 2. Derangeon M, Spray DC, Bourmeyster N et al.: Reciprocal influence of connexins and apical junction proteins on their expressions and functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1788: 768-778. 3. Maeda S, Tsukihara T: Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 1115-1129. 4. Plotek W: Budowa i funkcja synaps elektrycznych (*gap junctions*) w ośrodkowym układzie nerwowym. *Anestezjologia i Ratownictwo* 2008; 2: 274-282. 5. Laird DW: Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006; 394: 527-543. 6. Peracchia C, Wang XG: Connexin domains relevant to chemical gating of gap junctions channels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1997; 30: 577-690. 7. Rutkowski R, Kosztyla-Hojna B, Kańczuga-Koda L et al.: Struktura i fizjologiczna funkcja białek koneksynowych. *Postępy Hig Med Dośw* 2008

(online); 62: 632-641. 8. Krzymowski T, Przała J, Dusza L et al.: Fizjologia zwierząt. Wyd. VII, PWRiL, Warszawa 2005: 17-33. 9. Krechowicki A, Czerwiński F: *Zarys anatomii człowieka*. Wyd. VII, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006: 224-225. 10. Hanner F, Soresen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J: Connexins and the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: R1143-R1155. 11. Ahmad S, Martin PEM, Evans WH: Assembly of gap junction channels. *Eur J Biochem* 2001; 268: 4544-4552. 12. Lin X, Gemel J, Glass A et al.: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 48: 238-245. 13. Söhl G, Willecke K: Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* 2004; 62: 228-232. 14. Burra S, Jiang JX: Regulation of cellular function by connexin hemichannels. *Int J Biochem Mol Biol* 2011; 2: 119-128. 15. Peracchia C, Sotkis A, Wang XG et al.: Calmodulin directly gates junction channels. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(34): 26220-26224. 16. Török K, Stauffer K, Evans WH: Connexin 32 of gap junctions two cytoplasmic calmodulin – binding domains. *Biochem J* 1997; 326:479-483. 17. Solan JL, Lampe PD: Connexin 43 Phosphorylation – Structural Changes and Biological Effects. *Biochem J* 2009; 419(2): 261-272. 18. Haefliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA et al.: Four novel members of connexin family of gap junction proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(3): 2057-2064. 19. Grümmer R, Winterhager E: Blastocyst – Mediatel

induction of endometria connexins: an inflammatory response. Journal of Reproductive Immunology 2011; 90: 9-13. **20.** Eyra TA, Ducleazau, Sneddon TP et al.: The Hugo Gene Nomenclature Database, 2006 updates. Nucleic Acids Research 2006; 34: D319-D321. **21.** Maeda S, Nakagawa S, Suga M et al.: Structure of connexin 26 gap junction channel at 3,5Å resolution. Nature 2009; 458: 597-604. **22.** Sawicki W: Histologia.

Wyd. V, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008: 262-277, 348. **23.** Bruzzone R, White TW, Paul DL: Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. Eur J Biochem 1996; 238: 1-27. **24.** Shiblyama J, Gutierrez C, Gonzales D et al.: Effect of Charge Substitutions at Residue His 142 on Voltage Gating of Connexin 43 Channels. Biophysical Journal 2006; 91: 4054-4063.

nadesłano: 15.07.2013
zaakceptowano do druku: 27.08.2013

Adres do korespondencji:
*Paweł Kowalczyk
Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów SGGW
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
tel.: +48 728-862-717
e-mail: pawel_kowalczyk@sggw.pl