

Drugi glasnici u staničnoj jezgri

Hrvoje Banfić i Mirza Žižak

UDK 612.216

Prispjelo: 10. lipnja 1995.

Zavod za fiziologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta
u Zagrebu

Sposobnost stanice da odgovori na vanjski podražaj uključuje prijenos poruke kroz staničnu membranu i njeno prevođenje u unutrašnji signal, druge glasnike, koji kontroliraju mnoge stanične procese, kao što su rast stanice, diferencijaciju i proliferaciju. Važnu ulogu u prijenosu poruke imaju fosfoinozitidi, mali membranski lipidi, čijom razgradnjom uz pomoć fosfolipaze C, nastaju drugi glasnici: inozitol-(1,4,5)-trifosfat, inositol-(1,3,4,5)-tetrafosfat i *sn*-1,2-diacilglicerol. Inozitol-(1,4,5)-trifosfat oslobađa se u citoplazmu u kojoj zajedno sa svojim fosforiliranim oblikom, inositol-(1,3,4,5)-

-tetrafosfatom, mobilizira kalcij iz unutarstaničnih rezervoara, dok *sn*-1,2-diacilglicerol aktivira protein kinazu C. Nedavne studije su sugerirale postojanje zasebnog signalnog sustava u jezgrama, budući da su u njima nađene gotovo sve komponente dobro proučenog signalnog sustava stanične membrane, kontroliranoga preko površinskih receptora. Zasad još ostaje da se razjasni da li je jezgrin signalni sustav dio općeg signalnog sustava započetog na staničnoj membrani, ili je on zaseban i neovisan o njemu?

Ključne riječi: drugi glasnici, stanična jezgra

Prijenos poruke (*signala*) kroz staničnu membranu i unutar stanice sačinjen je od niza biokemijskih reakcija međusobno povezanih u jednu cjelinu, nazvanu signalni put. Danas su poznata dva takva signalna puta: jedan posredovan cAMP-om, a drugi inozitol lipidima. Za drugi način prijenosa interes znanstvenika traje već više od 15 godina, no, i pored toga, biokemijske su osnove i mehanizam prijenosa poruke u dijelu signalnog puta, koji se odvija unutar stanice, ostale nerazjašnjene. Početak priče o ovom sustavu započinje sredinom 70-tih godina kada Hokin i Hokin (21) izvješćuju o povećanom fosfolipidnom obrtaju potaknutom acetilkolinom u stanicama pankreasa i mozga. Ubrzo nakon toga otkrivena je veza između razgradnje inozitol-lipida i aktivacije receptora, te veza između aktivacije receptora i mobilizacije kalcija unutar stanice (32). Mehanizam i funkcija te povezanosti ostala je nepoznatom sve do početka 80-tih g. kad je PtdIns(4,5)P₂ pokazan kao glavni supstrat razgradnje, a Ins(1,4,5)P₃ kao produkt te razgradnje (33). Ovo je predstavljalo prekretnicu u povijesti signalnog sustava. Naime, Ins(1,4,5)P₃ je, na osnovi tih nalaza, povezan sa mobilizacijom kalcija unutar stanice, što ga je promoviralo u drugog glasnika (4). Nekako u isto vrijeme otkrivena je protein

kinaza C čije se djelovanje moglo kontrolirati diacilglicerolom i forbol esterom (36). U slijedećem koraku pokazano je da pod fiziološkim uvjetima PLC preferira PtdIns(4,5)P₂ kao supstrat (23). Konačno su 1984. godine svi dotadašnji nalazi objedinjeni i detaljno opisani u radovima Berridge-a i Irvina (4) i Nishizuke i sur. (36). Tada nastaju osnove današnjeg znanja o sustavu prijenosa poruke kroz staničnu membranu posredovanog inozitol-lipidima.

Središnje mjesto u tom sustavu zauzima aktivacija fosfolipaze C, potaknuta vezanjem biološki aktivnih tvari (agonista) za receptore smještene na površini stanične membrane. Posljedica aktivacije je razgradnja PtdIns(4,5)P₂ i nastanak drugih glasnika: Ins(1,4,5)P₃ i *sn*-1,2-diacilglicerola (DAG). Aktivacija PLC potaknuta je na 2 načina; jedan je G-proteinom regulirana aktivnost, dok je u drugom aktivnost regulirana tirozin-kinazom. Novonastali drugi glasnici imaju različitu sudbinu i funkciju unutar stanice. Ins(1,4,5)P₃ se oslobađa u citoplazmu, gdje zajedno sa svojim fosforiliranim oblikom Ins(1,3,4,5)P₄ sudjeluje u prolaznom (oscilacijskom) povećanju koncentracije kalcija u citoplazmi (*kalcijev signal*), čija je učestalost ovisna o aktivaciji receptora. Svoj učinak ostvaruju vezanjem za specifične Ins(1,4,5)P₂- i Ins(1,3,4,5)P₂-

receptore smještene na skladištima kalcija i na citoplazmatskoj strani stanične membrane. Oslobođeni kalcij se u citoplazmi ponaša kao tipični drugi glasnik, potičući dodatno oslobađanje kalcija iz kalcij-ovisnih skladišta kalcija i aktivirajući kalcij/kalmodulin kinazu (3). DAG glasničku ulogu ostvaruje unutar stanične membrane, gdje zajedno sa fosfatidil-serinom i kalcijem sudjeluje u aktivaciji PKC (18). Čitav proces aktivacije započinje prijenosom neaktivne PKC iz citoplazme u unutrašnji sloj stanične membrane. Međusobnim reagiranjem regulacijske domene i sučimbenika njene aktivacije potaknuta je promjena strukture PKC i posljedična aktivacija katalitičke domene. Konačni ishod je fosforilacija (aktivacija) serinskih i treoninskih ostataka ciljnih bjelančevina i ostvarenje nekog funkcionalnog učinka (17).

Zahvaljujući postupcima kloniranja i enzimskog pročišćavanja, otkrivena je među bjelančevinama uključenih u signalni put velika različitost u strukturi i raspodjeli po tkivima i unutar stanica. Danas je poznato najmanje 8 izooblika PLC, podijeljenih u nekoliko obitelji (obitelj β , γ , δ i ϵ), čija je zajednička značajka specifična razgradnja polifosfoinozitida PtdIns, PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P₂, bez istodobnog učinka na PtdIns(3)P PtdIns(3,4)P₂ i PtdIns(3,4,5)P₃ (14). G-proteinom posredovana aktivacija PLC specifična je za PLC- β i za još nedovoljno istražen, PLC- ϵ izooblik (13), dok je trioizin-kinazom regulirana aktivnost specifična za PLC- γ izooblik (39). Više od 20 izooblika G-proteina svrstano je u 4 skupine; Gs, Gi, Gq i G₁₂ (5,19), od kojih su se za fosfoinozitiidni signalni put pokazali važnim jedino članovi obitelji Gq-proteina (26). Kloniranjem iz različitih specijesa, tkiva i staničnih linija dobiveno je 10 izooblika PKC podijeljenih u tri skupine (37). Međutim, još ne postoje podaci koji bi govorili o specifičnosti pojedinog izooblika za fosfoinozitiidni signalni put.

"Ulaskom" poruke u stanicu naglo se smanjuje naše znanje o njenoj daljnjoj sudbini. Nedvojbeno je da poruka, nastala vezanjem različitih čimbenika rasta za receptore, na površini stanice završava u jezgri budući da su aktivacije gena, proliferacija i diferencijacija stanice redovit ishod aktivacije stanice čimbenicima rasta. Budući da se poruka prenosi između dva prostorno odijeljena dijela stanice, sa površine stanične membrane u jezgri, očito je da postoji dobro organizirani i kontrolirani sustav prijenosa poruke. Stoga, razjašnjenje biokemijske osnove prijenosa poruke kroz citoplazmu, zatim kroz jezgrinu ovojniciu i, konačno, njen završetak u jezgri predstavlja osnovu za potpuno razumijevanje signalnog sustava.

DOKAZI ZA JEZGRIN INOZITIDNI CIKLUS

Jezgrin inozitidni ciklus još uvijek predstavlja najzagonetniji dio inozitidne funkcije. Iako danas postoji čitav niz dokaza o povezanosti između fosfoinozitida i jezgrinih funkcija, stvari koje ih povezuju još uvijek su nepoznate. Prve naznake o mogućem utjecaju fosfolipida na procese u jezgri pojavile su se sredinom 70-tih g. kada je otkriveno da se u jezgri nalaze fosfolipidi vezani uz kromatin, kromatinske frakcije (nehistonske bjelančevine) i matriks jezgre (2), te da se njihova masa povećava sa aktivacijom kromatina (40). Međutim, interes za razjašnjenjem ove pojave ostao je malim sve do 1983. godine kada su Smith i Wells izvijestili da su u jezgri nazočne PtdIns- i PtdIns(4)P-kinaza, čijim djelovanjem nastaju fosfoinozitiidi, PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P₂ (45). Do tada se za te enzime smatralo da djeluju jedino unutar stanične membrane. Ovo je bio velik poticaj za brojne istraživače, pa su tako ubrzo Cocco i sur. (10) u istraživanjima, *in vitro*, na Friend stanicama pokazali postojanje sinteze fosfoinozitida u jezgri, te blisku povezanost ove sinteze sa stupnjem diferencijacije stanice (11). Promjene su bile ograničene isključivo na unutrašnjost jezgre budući da primjena deterđentata, Triton X-100, kojim se učinkovito uklanja vanjska jezgrina membrana, nije imala utjecaja na ugradnju (γ^{32} P)ATP-a u PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P₂ (10). Slični zaključci su izvedeni iz radova na Swiss 3T3 fibroblastima, u kojima stimulacija "mirujućih" stanica sa IGF-I rezultira smanjenjem ugradnje (γ^{32} P)ATP-a u PtdIns(4,5)P₂ (11). Vjerojatno najbolji dokazi dobiveni su od Divechi i sur. (15) koji su našli da poticanje Swiss 3T3 stanica pomoću IGF-I (tirozin-kinaza stimulirajući čimbenik rasta) uzrokuje u jezgrama brzo i prolazno smanjenje mase PtdIns(4)P i PtdIns(4,5)P₂, uz istodobno povećanje DAG-a. Uz pomoć bombesina i IGF-I dokazali su da se opažene promjene doista i zbivaju u jezgri. Naime, primjena bombesina, čimbenika koji izaziva inozitidni odgovor u staničnoj membrani Swiss 3T3 fibroblasta, nije potakla isti odgovor u jezgri, dok IGF-I izazvane promjene u jezgri nisu praćene promjenama u staničnoj membrani (12,15). Iz ovog proizlazi da nakon aktivacije IGF-I receptora signal, na neki za sada nepoznat način, dolazi do jezgre u kojoj potiče jezgrinu PLC i izaziva posljedičnu razgradnju PtdIns(4,5)P₂, stvarajući DAG i Ins(1,4,5)P₃. Gotovo istovjetni rezultati dobiveni su i u pokusi-

ma *in vivo* na modelu kompenzacijskog rasta jetre (1). Naime, tijekom kompenzacijskog rasta u jezgrama jetrenih stanica dolazi do pada koncentracije PtdIns(4,5)P₂ i istodobnog porasta DAG-a. Kako povećanje DAG-a nije redovito praćeno i podjednakim smanjenjem PtdIns(4,5)P₂, mogući izvor DAG-a u jezgri mogli bi biti i drugi fosfolipidi, u prvom redu fosfatidil-kolin. Zanimljivo je da i u *in vitro* i u *in vivo* ispitivanjima, istodobno, sa porastom koncentracije DAG-a u jezgri, dolazi do pojave PKC, vjerojatno kao posljedica njenog prijenosa iz citoplazme. U mirujućim stanicama ona nije nazočna u jezgri.

Nedavno je sugerirano da su pojedine komponente fosfoinozitivnog metabolizma, poput Ins(1,3,4,5)P₄, primijenjenog *in vitro* (20), te PtdIns(4)P i Ins(1,2)P₂ (47), povezane sa povećanjem sinteze DNA.

Ovi su nalazi bili značajni za daljnje istraživanje jer su sugerirali mogućnost postojanja sustava prijenosa poruke na razini jezgre, sa značajkama signalnog sustava, koji se odvija u staničnoj membrani. Analogno tome, ključno bi mjesto u jezgri signalnom sustavu trebalo pripasti fosfolipazi C i njenom učinku na fosfoinozotide, a produkti njenog djelovanja bi trebali obavljati funkciju drugih glasnika. Na osnovi dosadašnjih spoznaja teško je reći da li su opažene promjene u jezgri samo nastavak signalnog sustava stanične membrane, ili se ovdje radi o zasebnom jezgri signalnom sustavu.

PLC U JEZGRI

Enzimi koji sudjeluju u metabolizmu polifosfoinozitida, poput PtdIns kinaze, PtdIns(4)P-kinaze, te DAG-kinaza i fosfolipaza C - smješteni su unutar jezgre i svi se, osim PtdIns-kinaze, nalaze u unutrašnjem matriksu jezgre. PtdIns-kinaza je smještena u perifernom matriksu sačinjenom od lamine i složenih kanalnih sustava (38). Pravi značaj ovakve razdiobe je još nejasan, iako je u skladu sa opažanjem da su promjene mase fosfoinozitida vidljive i nakon što se jezgre "obrade" deterđentom (2,38). Zanimljivo je da su svi enzimi nađeni u unutrašnjosti jezgre, iako se njihovi supstrati i reakcije, koje oni posjeduju, nalaze u jezgri ovojnici (16).

Tijekom aktivacije stanica dolazi u jezgrama do porasta aktivnosti PLC, te do susljednog porasta produkta njenog djelovanja. Ostaje nejasno da li su opažene promjene posljedica djelovanja enzima koji bi bio specifičan za jezgru, ili bi, kao i u signalnom sustavu, stanične membrane u jezgru bio prenijet iz citoplazme. U okvirima dosadašnjih spoznaja teško je objasniti na koji način IGF-I

čimbenik rasta aktivira PLC-jezgre, budići da je njegovo djelovanje posredovano tirozin-kinazom, a u jezgri je pronađen jedino PLC-β1 izooblik (16,30). Jedini izooblik PLC, koji se aktivira preko, tirozin-kinaza receptora, je PLC-γ izooblik (39). Značajka je PLC-β1 izooblika regulacija posredovana Gq-proteinom (13), te smještaj u unutrašnjosti jezgre, budući da se njegova aktivnost u jezgrama ne mijenja ukoliko su jezgre prethodno "obrađene" deterđentom (16). Nalaz bjelančevine u jezgri koja pokazuje velike sličnosti sa Gi-proteinom stanične membrane, sugerirala je mogućnost da bi fosfodiesterazna aktivnost unutar jezgre zaista bila posljedica aktivacije PLC-β1 izooblika (42,49). Međutim, stvari ipak nisu tako jednostavne budući da u jezgri nisu nađeni i, za PLC-β1 specifični, Gq-proteini. Naime, Divecha i sur. su primjenom specifičnih protu-G_{q/11} protutijela isključili mogućnost postojanja Gq- i G₁₁-proteinom posredovanu aktivaciju PLC-β1 (16).

PKC U JEZGRI

Sredinom 80-tih godina pojavili su se prvi radovi o nazočnosti PKC u jezgri (7). Stimulacija različitih tipova stanica forbol esterom (25), onkogenima (8) i čimbenicima rasta, bombesinom i IGF-I (29) praćena je pojava PKC u jezgri. U jezgrama neaktivnih Swiss 3T3 stanica PKC nije nazočna, međutim, nakon stimulacije sa IGF-I, dolazi do povećanja koncentracije DAG-a uz istodobnu pojavu PKC u jezgri (15). Istovjetne promjene nađene su i *in vivo*, tijekom kompenzacijskog rasta jetre (1). Slične promjene nisu nađene u staničnoj membrani. Ova istodobnost sugerira neposrednu uzročnu vezu između stvaranja DAG-a i pojave PKC u jezgri. Kako se razina DAG-a u jezgri vraća na vrijednosti u mirovanju, PKC "napušta" jezgru (15) potvrđujući tako njihovu uzajamnu povezanost. Porast DAG-a i pojava PKC u jezgri jetrenih stanica odvija se istodobno sa porastom aktivnosti PLC (Banfić, neobjavljeni rezultati). Postoje i mišljenja da se PKC nalazi primarno u jezgri (31), te da je čvrsto vezana za laminu (7). Značaj PKC u jezgri proizlazi iz njegove uloge u kontroli procesa koji se odvijaju u jezgri. Naime, pokazano je da sudjeluje u fosforilaciji različitih bjelančevina jezgre, kao što su histoni (29) i bjelančevine lamine (22,50), te u aktivaciji različitih enzima, RNA-polimeraze II (9) i topoizomeraze II (43), uključenih u razinu prijenosa genske upute. Neki čimbenici, poput bombesina (41) i prolaktina (6), za koje je poznato da potiču sintezu DNA, istodobno potiču aktivaciju PKC.

Još ostaje nejasno kojim se mehanizmom PKC prenosi u jezgru i kako se tamo aktivira, te koji su izooblici PKC uključeni u taj proces. Poznato je da se nakon primjene forbol estera u jezgri NIH 3T3 stanica mogu naći α -izooblici PKC (25), dok je u Friend stanicama i hepatocitima nađen samo PKC- β izooblik.

Ins(1,4,5)P₃ I Ins(1,3,4,5)P₄ U JEZGRI I ULOGA KALCIJA

Ins(1,4,5)P₃ i Ins(1,3,4,5)P₄, u stanici sudjeluju pri stvaranju kalcijevog signala. Za sada ne postoje dokazi da se receptori za Ins(1,4,5)P₃, nazočni u jezgri, razlikuju od receptora nađenih u citoplazmi (44). Jedna od mogućih funkcija Ins(1,4,5)P₃-receptora pokazana je nedavno (46) kad je ustanovljeno da je za ponovno sastavljanje jezgrine ovojnice iz jezgrinih membranskih vezikula neophodno povećanje koncentracije kalcija posredovano Ins(1,4,5)P₃-receptorom. Vezna mjesta za Ins(1,3,4,5)P₄ su smještena u vanjskoj jezgrinoj membrani (24), a povezana su sa regulacijom unosa kalcija u jezgru (28).

Precizna regulacija koncentracije kalcija neophodna je za aktivnost glavnih enzima uključenih u fosfolipidni metabolizam (27). Budući da kalcij sudjeluje u kontroli prijepisa gena (51), neophodno je, slično zbivanjima u citoplazmi, precizno regulirati razinu kalcija u jezgri. Nedavno je utvrđeno da je regulacija kalcija u jezgri neovisna o onoj u citoplazmi (52). Nalaz kalcijeve crpke, ovisne o ATP-u, smještene u jezgrinoj ovojnici (34) samo je potvrdio prethodne nalaze. Ubrzo zatim otkrivene su u jezgri dvije vrste skladišta kalcija, jedni osjetljivi a drugi neosjetljivi na Ins(1,4,5)P₃ dodan izvana (35). Da se tu stvarno radi o skladištima kalcija i o oslobađanju kalcija posredovano Ins(1,4,5)P₃-receptorom pokazano je pomoću heparina, blokatora Ins(1,4,5)P₃-receptora. Njegovom primjenom blokirano je oslobađanje kalcija unutar jezgre, sugerirajući time postojanje mehanizma sličnog onom odgovornom za oslobađanje kalcija iz skladišta u citoplazmi (35).

Za sada još nisu poznata mjesta prijenosa kalcija u i iz jezgre. Postojanje Ins(1,4,5)P₃ receptora na jezgrinoj ovojnici sugerira mogućnost da skladišta kalcija, osjetljiva na inozitol-lipide, mogu biti ograničena i na prostor između dviju membrana. Plima kalcija u blizini jezgrine ovojnice potvrđuje postojanost ovakvog modela (35).

G-PROTEIN U JEZGRI ?

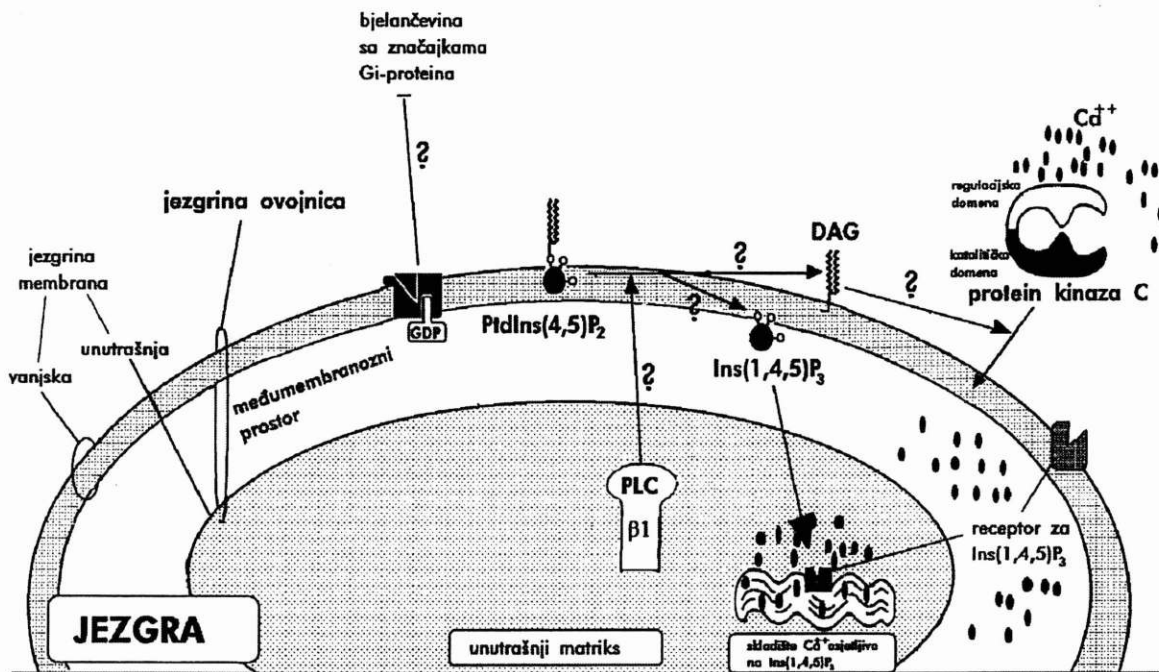
Nedavno su Takeda i sur. (48) pokazali da se u jezgrama Swiss 3T3 stanica nalaze bjelančevine

koje specifično vežu GTP i čija je aktivnost usko povezana sa staničnim rastom. Daljnjim ispitivanjem pokazano je da su te bjelančevine nazočne u jezgrinoj ovojnici, te da ima više tipova koji se međusobno razlikuju prema molekularnoj težini (42). Prema najnovijim spoznajama (49) bjelančevina, koja specifično veže GTP i nalazi se u jezgri, ima morfološke sličnosti sa G-proteinom stanične membrane. To je heterotrimerična bjelančevina (sastavljena od α -, β - i γ -podjedinice) koja služi kao supstrat za pertusis toksin i koja po nekim svojim imunokemijskim svojstvima ima sličnosti sa Gi-proteinom u staničnoj membrani. Ovo bi sugeriralo postojanje G-proteina specifičnih za PLC- β , jedini oblik nađen u jezgri, međutim, nazočnost je G-proteina specifičnih za dotičnu PLC isključen pomoću specifičnih protutijela (16).

Konačno, dosadašnje spoznaje o jezgri sugeriraju postojanje zasebnog, od stanične membrane odvojenog, ali po mnogim svojstvima sličnog, fosfoinozitolnog signalnog sustava čije bi komponente, DAG-om regulirana PKC i Ins(1,4,5)P₃-om i Ins(1,3,4,5)P₄-om reguliran kalcij, imale važnu ulogu u aktivaciji stanice (slika 1.).

LITERATURA

1. Banfić H, Žižak M, Divecha N, Irvine RF. Nuclear diacylglycerol is increased during cell proliferation in vivo. *Biochem J* 1993; 290: 633-6.
2. Berezney R, Coffey DS. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 60: 1410-7.
3. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341: 197-204.
4. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate a novel second messenger in cellular function. *Nature* 1984; 312: 315-21.
5. Birnbaumer L. Receptor to effector signaling through G proteins: Roles for β/γ dimers as well as a subunits. *Cell* 1992; 71: 1069-72.
6. Buckley AR, Crowe PD, Russell DH. Rapid activation of protein kinase C in isolated rat liver nuclei by prolactin, a known hepatic mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8649-53.
7. Capitani S, Girard PR, Mazzei GJ, Luo JF, Berezney R, Manzoli FA. Immunochemical characterization of protein kinase C in rat liver nuclei and subnuclear fractions. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142: 367-75.
8. Chiarugi V, Magnelli L, Pasquali F i sur. Transformation by ras oncogene induces nuclear shift of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 528-33.
9. Chuang LF, Cooper RH, Yau P, Bradbury EM, Chuang RY. Protein kinase C phosphorylates leukemia RNA polymerase II. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145: 1376-83.



JEZGRA - NUCLEUS / unutrašnji matrix - internal matrix / skladišta Ca^{++} osjetljiva na $Ins(1,4,5)P_3$ - Ca^{++} stores sensitive to $Ins(1,4,5)P_3$ / receptor za $Ins(1,4,5)P_3$ - $Ins(1,4,5)P_3$ receptor / protein kinaza C - protein kinase C / katalitička domena - catalytic domain / regulacijska domena - regulatory domain / bjelančevina sa značajkama Gi-proteina - protein resembling Gi-protein / međumembranozni prostor - intermembranous space / jezgrina ovojnica - nuclear envelope / jezgrina membrana - nuclear membrane / unutrašnja - internal / vanjska - external

SLIKA 1.
 JEZGRIN SIGNALNI SUSTAV

U jezgri postoji sinteza polifosfoinozitida, nazočna je bjelančevina sa značajkama Gi-proteina stanične membrane, u unutrašnjosti jezgre nalaze se fosfolipaza C (kao i enzimi DAG-kinaza, PtdIns- i PtdIns(4)P-5 kinaza - nisu prikazani) i skladišta kalcija osjetljiva i neosjetljiva na $Ins(1,4,5)P_3$. Razgradnjom polifosfoinozitida PtdIns(4,5) P_2 nastaju DAG i $Ins(1,4,5)P_3$. Povećanje koncentracije DAG-a potiče prijenos protein kinaze C iz citoplazme u jezgru, a $Ins(1,4,5)P_3$ najvjerojatnije potiče mobilizaciju kalcija iz jezgrinih skladišta kalcija. Kalcij je osim u unutrašnjem matriksu smješten i u međumembranoznom prostoru, odakle se posredstvom $Ins(1,4,5)P_3$ receptora oslobađa u citoplazmu. Kalcij i protein kinaza sudjeluju u aktivaciji jezgre (sinteza DNA, kontrola ekspresije specifičnih gena). Još je nejasno na koji način poruka, stvorena na površini stanice, dopijeva do jezgre, te točan mehanizam kojim se ona prenosi u jezgru

FIGURE 1.
 THE SIGNAL SYSTEM OF THE NUCLEUS

In the nucleus there is a synthesis of polyphosphoinositides; a protein resembling the Gi-protein of the cell membrane is present; inside the nucleus there are phospholipase C (as well as the DAG-kinase, PtdIns- and PtdIns(4)P-5 kinase enzymes, which are not shown) and calcium stores sensitive and insensitive to $Ins(1,4,5)P_3$. The breakdown of polyphosphoinositides PtdIns(4,5) P_2 produces DAG and $Ins(1,4,5)P_3$. Increased DAG concentration stimulates the transduction of protein kinase C from the cytoplasm into the nucleus, whereas $Ins(1,4,5)P_3$ probably stimulates calcium mobilization from internal stores. In addition to the internal matrix, calcium is also stored in the intermembranous space, from where it is released into the cytoplasm through $Ins(1,4,5)P_3$ receptors. Calcium and protein kinase participate in the nucleus activation (DNA synthesis, control of specific genes' expression). It is not clear yet in what way a message created at the cell surface comes to the nucleus or the exact mechanism of its transmittance into the nucleus.

10. Cocco L, Gilmour RS, Ognibes A, Letcher AJ, Manzoli FA, Irvine RF. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem J* 1987; 248: 765-70.
11. Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Ognibene A, Manzoli FA, Irvine RF. Rapid changes in phospholipid metabolism within nuclei of Swiss 3T3 cell induced by treatment of the cells with insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 1266-72.
12. Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Ognibene A, Manzoli FA, Irvine RF. Changes in nuclear inositol phospholipids induced in intact cells by insulin-like growth factor 1. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 159: 720-5.
13. Cockcroft S, Thomas GMH. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem J* 1992; 288: 1-14.
14. Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J* 1991; 5: 2068-77.
15. Divecha N, Banfić H, Irvine RF. The polyphosphoinositide cycle exist in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J* 1991; 10: 3207-14.
16. Divecha N, Rhee SG, Letcher AJ, Irvine RF. Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform β 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Bichem J* 1993; 289: 617-20.
17. Farago A, Nishizuka Y. Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS* 1990; 268: 350-3.
18. Farrar WL, Anderson WB. Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membrane. *Nature* 1985; 35: 233-5.
19. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *TIBS* 1992; 17: 383-7.
20. Hill TD, Zwiller J, Boynton AL. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate stimulates the initiation of DNA synthesis in Ca^{2+} deprived rat liver cells. *J Cell Physiol* 1989; 140: 403-7.
21. Hokin MR, Hokin LE. Effect of acetylcholine on phospholipid metabolism in the pancreas. *J Biol Chem* 1954; 209: 549-58.
22. Hornbeck P, Huang KP, Paul WE. Lamin B is rapidly phosphorylated in lymphocytes after activation of protein kinase C. *Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2279-83.
23. Irvine RF, Letcher AJ, Dawson RMC. *Biochem J* 1984; 218: 177-85.
24. Koppler P, Matter N, Malviya AN. Evidence for stereospecific inositol 1,3,4,5-(3H)-tetrakisphosphate binding sites on rat liver nuclei. Delineating inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate interaction in nuclear calcium signaling process. *J Biol Chem* 1993; 268: 26248-52.
25. Leach KL, Powers EA, Ruff VA, Jaken S, Kaufmann S. Type 3 protein kinase C localization to the nuclear envelope of phorbol ester-treated NIH 3T3 cells. *J Cell Biol* 1989; 109: 685-95.
26. Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MI. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C β isozymes. *J Biol Chem* 1992; 267: 16044-7.
27. Majerus PW, Connolly DM, Deckmyn H i sur. The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science* 1986; 234: 1519-26.
28. Malviya AN. The nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors. *Cell Calcium* 1994; 16: 301-13.
29. Martelli AM, Carini C, Marmiroli S, Mazzoni M, Barker PJ, Gilmour RS, Capitani S. Nuclear protein kinase in rat liver: Evidence for increased histone H1 phosphorylating activity during liver regeneration. *Exp Cell Res* 1991; 195: 255-62.
30. Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli FA, Cocco L. Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C- β in Swiss 3T3 cells. *Nature* 1992; 358: 242-5.
31. Masmoudi A, Labourdette G, Mersel M, Huang FL, Huang KP, Malviya AN. Protein kinase C located in rat liver nuclei. *J Biol Chem* 1988; 264: 1172-9.
32. Michell RH. Inositol phospholipid metabolism and cell surface receptor function. *Biochem Biophys Acta* 1975; 415: 81-147.
33. Michell RH, Kirk CJ, Jones LM, Downes CP, Creba JA. The stimulation of inositol lipid metabolism that accompanies calcium mobilization in stimulated cells: Defined characteristics and unanswered questions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1981; 296: 123-37.
34. Nicotera P, McConkey DJ, Jones DP, Orrenius S. ATP Stimulates Ca^{2+} uptake and increases the free Ca^{2+} concentration in isolated rat liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 453-7.
35. Nicotera P, Orrenius S, Nilsson T, Berggren PO. An inositol 1,4,5 triphosphatesensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6858-62.
36. Nishizuka Y, Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Kaibuchi K. Phospholipid turnover in hormone action. *Recent Progress in Hormone Research* 1984; 40: 301-39.
37. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; 334: 661-5.
38. Payraastre B, Nievers M, Bonstra J, Breton M, Verkleij AJ, Van Bergen en Henegouwen PMP. A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J Biol Chem* 1992; 267: 5078-84.
39. Rhee SG. Inositol phospholipid-specific phospholipase C: interaction of the γ 1 isoform with tyrosine kinase. *TIBS* 1991; 16: 297-301.
40. Rose HG, Frenster JH. Composition and metabolism of lipids within repressed and active chromatin of interfase lymphocytes. *Bichem Biophys Acta* 1965; 106: 577-91.

41. Rozengurt E, Sinnott-Smith J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2936-40.
42. Rubins JB, Benditt JO, Dickey F, Riedel N. GTP-binding proteins in rat liver nuclear envelopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7080-4.
43. Sahyoun N, Wolf M, Berterman J, Hsieh T, Sander M i sur. Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II: topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1603-4.
44. Satoh T, Ross CA, Villa A, Supattapone S, Pozzan T, Snyder SH, Meldolesi J. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in cerebral Purkinje cells: quantitative immunogold labeling reveals concentration in an ER subcompartment. *J Cell Biol* 1990; 111: 615-24.
45. Smith CD, Wells WW. Phosphorylation of rat liver envelopes, characterization of in vitro phosphorylation. *J Biol Chem* 1983; 258: 9368-73.
46. Sullivan KMC, Busa WB, Wilson KL. Calcium mobilization is required for nuclear vesicle fusion in vitro: Implications for membrane traffic and IP₃ receptor function. *Cell* 1993; 73: 1411-22.
47. Sylvia V, Curtin G, Norman J, Stec J, Busbee D. Activation of a low specific activity form of DNA polymerase α by inositol-1,4-bisphosphate. *Cell* 1988; 54: 651-8.
48. Takeda S, Sugiyama H, Natori S, Sekimizu K. Nuclear GTP-binding proteins of Swiss 3T3 cells. *FEBS Letters* 1989; 244: 469-72.
49. Takei Y, Korosu H, Takahashi K, Katada T. A GTP-binding protein in rat liver nuclei serving as the specific substrate of pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1992; 267: 5085-9.
50. Tsuda T, Alexander RW. Angiotensin II stimulates phosphorylation of nuclear lamins via a protein kinase C-dependent mechanism in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 1165-70.
51. Twigg J, Patel R, Whitaker M. Translational control of InsP₃-induced chromatin condensation during early cell cycles of sea urchin embryos. *Nature* 1988; 332: 336-9.
52. Waybill MM, Yelamarty RV, Zhang Y i sur. Nuclear calcium gradients in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991; 261: E49-57.

Abstract

SECOND MESSENGERS IN THE NUCLEUS

Hrvoje Banfić and Mirza Žižak

Institute of Physiology, Medical Faculty, Zagreb

The ability of cells to respond to external stimuli involves the transduction of messages across the plasma membrane and their translation into internal signal, second messengers, which control many cell processes such as cell growth, differentiation and proliferation. A prominent role in message transduction is played by phosphoinositides, minor membrane lipids, whose breakdown through phospholipase C produces the second messengers: inositol-(1,4,5)-trisphosphate, inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate

and sn-1,2-diacylglycerol. Inositol-(1,4,5)-trisphosphate and Ins(1,3,4,5)P-tetrakisphosphate, released into the cytoplasm, mobilize calcium from internal stores, whereas sn-1,2-diacylglycerol activates protein kinase C. Recent studies suggested the existence of a discrete signal system in the nuclei. It includes all components of well-known plasma membrane-located system, which is under regulatory control by cell surface-located receptors. It remains to be clarified whether the nuclei signal system is a part of the general signal system originating at plasma membrane, or whether it is independent of it.

Key words: nucleus, second messengers