

Received: 2003.12.12

Accepted: 2004.01.16

Published: 2004.02.27

Rola białek wiążących FK506 w regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych w komórkach T

FK506 – binding proteins in the regulation of transcription factors activity in T cells

Izabela Kochel i Leon Strządała

Zakład Immunologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

W limfocytach T białka FKBP, zwane również immunofilinami, pełnią różnorodne funkcje, z których najważniejszą jest udział w regulacji transkrypcji genów cytokin, głównie na poziomie transportu jądrowo-cytoplazmatycznego czynników transkrypcyjnych. Immunofilina FKBP12 jest mediatorem immunosupresyjnego działania FK506. Kompleks FKBP-FK506 blokuje import jądrowy NFAT oraz tworzenie heterodimeru AP-1, przez hamowanie zależnej od wapnia fosfatazy kalcineuryny oraz szlaku sygnałowego JNK/p38. Zahamowanie obu tych szlaków uniemożliwia ekspresję IL-2 i aktywację limfocyta T. Z kolei FKBP51 i FKBP52 są naturalnymi komponentami kompleksu receptora glukokortykoidów i bezpośrednimi regulatorami jego aktywności. Po związaniu ligandu przez receptor, FKBP51, utrzymujący receptor w cytoplazmie, zastępowany jest przez FKBP52, który z kolei umożliwia translokację całego kompleksu do jądra. W ten sposób białka FKBP biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej przez glukokortykoidy.

Słowa kluczowe:

immunofiliny • białka wiążące FK506 • kalcineuryna • czynniki transkrypcyjne • import jądrowy • eksport jądrowy

Summary

Members of the FKBP family play various functions within the cell. For T cell biology essential is their involvement in the regulation of cytokine genes transcription, mainly at the level of nucleocytoplasmic transport of transcription factors. FKBP12 is the mediator of immunosuppressive action of FK506. When complexed with the drug, FKBP blocks nuclear import of NFAT and formation of AP-1 heterodimer, due to inhibition of calcium-dependent phosphatase calcineurin and JNK/p38 pathways. Suppression of these two, and possibly some other signaling pathways leads to prevention of IL-2 expression and T cell activation. FKBP51 and FKBP52 are natural components of glucocorticoid receptor complex and direct regulators of its activity. Upon ligand binding FKBP51, maintaining receptor in the cytoplasm, is exchanged by FKBP52, which allows translocation of the complex to the nucleus. Thereby FKBP51 and FKBP52 take a part in the regulation of immune response by glucocorticoids.

Key words:

immunophilins • FK506-binding proteins • calcineurin • transcription factors • nuclear import • nuclear export

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/5206.pdf
Word count:	3416
Tables:	1
Figures:	5
References:	66

Adres autora: Prof. dr hab. Leon Strządala, Instytut Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: strzadal@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **FKBP** – białko wiążące FK506 (FK506 binding protein); **CypA** – cyklofilina A (cyclophilin A); **CsA** – cyklosporyna A (cyclosporin A); **PPIaza** – izomeraza peptydyloprolylowa (peptidyl-prolyl isomerase); **NLS** – sygnał lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal); **NES** – sygnał eksportu jądrowego (nuclear export signal); **SRR** – region bogaty w seryny (serine-rich region); **Cn** – kalcyneuryna; **NFAT** – czynnik jądrowy aktywowanych limfocytów T (nuclear factor of activated T cells); **NFκB** – czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB); **IκB** – inhibitor NFκB (inhibitor of NFκB); **IKK** – kinaza inhibitora NFκB (IκB kinase); **GR** – receptor glukokortykoidów (glucocorticoid receptor); **Hsp 90** – białko szoku termicznego 90 kDa (heat shock protein)

WSTĘP

Znane obecnie szlaki sygnałowe, kontrolujące zarówno proliferację, jak i apoptozę komórek T, prowadzą do aktywacji czynników transkrypcyjnych, wśród których istotną rolę odgrywają NFκB, NFAT i Nur77 – wszystkie w mniejszym lub większym stopniu kontrolowane przez zależną od wapnia fosfatazę, kalcyneurynę. Dotychczas aktywność immunosupresyjną makrolidu FK506 wiązano głównie z jego zdolnością do hamowania kalcyneuryny. Niedawno pojawiły się jednak dane wskazujące na istnienie niezależnego od kalcyneuryny miejsca działania FK506, a także opisywane są inne poza immunosupresją, sposoby działania tego związku. Celem niniejszego artykułu jest omówienie aktualnych poglądów na temat białek wiążących FK506, ze szczególnym zwróceniem uwagi na ich rolę w modulowaniu szlaków sygnałowych kontrolujących aktywność czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w procesach proliferacji i apoptozy komórek T.

IMMUNOFILINA FKBP

Terminem immunofiliny określane są białka wiążące związki immunosupresyjne, z których najbardziej znanymi są: cyklosporyna A, FK506 i rapamycyna. Immunofiliny wykazują aktywność izomerażową oraz chaperonową.

W wielu łańcuchach białkowych wykorzystywane są wyjątkowe możliwości zmian konformacyjnych reszty prolinowej. Dana konfiguracja (cis lub trans) może być energetycznie najkorzystniejsza w określonym miejscu łańcucha polipeptydowego. Izomeryzacja cis-trans wiązań X-Pro (X – dowolny aminokwas) może determinować tempo osiągnięcia konformacji natywnej białka [47]. Spontaniczna izomeryzacja jest jednak powolna. Enzymatyczne przyspieszenie tego procesu (ponad 300 razy) może być konieczne do osiągnięcia konformacji natywnej zanim wkroczy proces współzawodniczący, taki jak agregacja lub proteoliza [17]. Rola tę pełnią izomerazy peptydyloprolylowe, nazywane również rotamazami, do których należą białka wiążące FK506 oraz cyklofiliny. Enzymy te ułatwiają ponadto działanie izomeraż mostków disiarczkowych. Prawdopo-

dobnie łańcuchy z odpowiednimi izomerami prolylowymi są lepszymi substratami dla tych izomeraż [47]. FKBP i cyklofiliny różnią się swoistością substratową, dzięki czemu *in vivo* mogą pełnić różne role fizjologiczne [21].

Izomeryzacja cis-trans w pewnych przypadkach może również regulować aktywność biologiczną sfaladowanych już białek, jak to się dzieje w przypadku kinazy Itk (interleukin-2 tyrosine kinase), biorącej udział w szlakach sygnałowych, prowadzących do aktywacji limfocytów T. Należy podkreślić, że konformacyjna zmiana w domenie SH2 (Src homology-2) Itk, katalizowana przez cyklofilinę A (CypA), reguluje zdolność kinazy do rozpoznawania substratu, co w konsekwencji może prowadzić do zablokowania sygnału od TCR. Itk jest substratem swoistym dla CypA, nie jest natomiast rozpoznawana przez FKBP [9].

Oprócz przyspieszania procesu fałdowania białek wykazano również inne funkcje FKBP, spośród których najważniejsze to:

- Regulacja subkomórkowej lokalizacji i aktywności transaktywacyjnej czynników transkrypcyjnych istotnych dla czynności limfocytów T. Odgrywają tu rolę zwłaszcza immunofiliny FKBP 12 oraz 51 i 52, co zostanie szerzej omówione w dalszej części.
- Negatywna regulacja szlaku sygnałowego TGF-β. TGF-β (tumor growth factor β) jest cytokiną o działaniu hamującym proliferację limfocytów T. FKBP wiąże się z cytoplazmatyczną częścią wolnego od ligandu receptora TGF-β typu I, nie dopuszczając do jej fosforylacji przez receptor typu II (o konstytutywnej aktywności kinazowej). Natomiast przyłączenie TGF-β do receptora prowadzi do oddysocjowania FKBP12, co umożliwia aktywację szlaku sygnałowego. Interakcje FKBP12-TGFβR blokowane są przez FK506, co wzmocnia aktywność TGF-β w obecności makrolidu. Może to stanowić dodatkowy aspekt immunosupresyjnych właściwości FK506 [8,61].
- Antyapoptotyczna funkcja FKBP38. Niedawno wykazano, że izoforma ta hamuje apoptozę przez oddziaływanie z antyapoptotycznymi białkami zapobiegającymi zmianom przepuszczalności błony mito-

chondrialnej, które prowadziłyby do uwolnienia cytochromu c i zapoczątkowania szlaku prowadzącego do śmierci komórki. FKBP38 zakotwicza Bcl-2 i Bcl-x_L w błonie mitochondrium, umożliwiając im działanie. Lokalizacja mitochondrialna tych białek jest bowiem niezbędna do ich aktywności ochronnej [50].

W kontekście antyapoptotycznej roli białek FKBP interesujące są dane na temat proapoptotycznej aktywności FK506 w astrocytach [42,65], obwodowych limfocytach T [36], czy przywracanie przez FK506 wrażliwości komórek chłoniaków grasiczych na apoptozę indukowaną jonami wapnia [24].

BUDOWA BIAŁEK FKBP

Najlepiej poznanym, a zarazem najpowszechniej występującym białkiem wiążącym FK506 jest FKBP12 (FKBP o masie 12 kDa) [20,51], choć opisano również inne białka z tej rodziny, np. FKBP12.6 [49], FKBP13 [23], FKBP52 [39], FKBP38 [50], FKBP51 [64], FKBP25 [19]. FKBP12 jest rozpuszczalnym, cytosolowym receptorem dwóch stosowanych w klinice immunosupresorów, FK506 i rapamycyny. Głównymi elementami budowy tego białka są: pięciopasmowa, antyrównoległa struktura pofałdowanej kartki (harmonijki β) i pojedyncza krótka helisa α , tworząca rdzeń hydrofobowy. Helisa jest przyłączona do piątego i drugiego pasma harmonijki odpowiednio przez 9- i 5-aminokwasowe pętle. Wzajemne ułożenie obu struktur jest stabilizowane przez siły van der Waalsa. W płytkim wydrążeniu między helisą i harmonijką znajduje się centrum aktywne oraz miejsce wiązania ligandu [56]. Kieszeń wiążąca ligand jest podobna w innych białkach z tej rodziny, szczególnie konserwatywne są aminokwasy aromatyczne Trp59, Tyr82 i Phe99. Związanie immunosupresora powoduje nieznaczną reorganizację tego regionu oraz zahamowanie aktywności enzymatycznej rotamazy [35].

LIGANDY FKBP

FK506 i rapamycyna, ligandy białek FKBP, są naturalnymi produktami promieniowców *Streptomyces*, żyjących w glebie. Są to antybiotyki makrolidowe o zbliżonej budowie i silnej aktywności przeciwgrzybiczej (wobec drożdży i grzybów patogennych). Ich naturalną rolą jest hamowanie wzrostu konkurencyjnych organizmów. Oba związki wiążą się z tym samym miejscem na FKBP12, a powstałe kompleksy pełnią rolę inhibitorów konserwatywnych enzymów o istotnym znaczeniu dla biologii komórki: kalcyneuryny (FKBP-FK506) lub kinazy TOR (FKBP-rapamycyna) [2]. Swoistość tych interakcji jest zdeterminowana przez ścisłą geometrię przestrzenną powstałych kompleksów [6].

FK-506 (takrolimus) otrzymano z fermentującej hodowli kolonii *Streptomyces tsukubaensis*, organizmu znalezione go w próbkach gleby pobranych z rejonu Tsukuba w północnej Japonii. Kompleks FKBP-FK506 wiąże się z kalcyneuryną w pobliżu jej centrum aktywnego, w następstwie czego interferuje z jej dostępem do substratów. W ten sposób FK506 wpływa na liczne procesy biochemiczne w różnych komórkach [16]. Jednak związek ten znany jest głównie z hamującego działania na aktywację i różnicowanie limfocytów T. W ludzkich, aktywowanych limfocytach

T krwi obwodowej, selektywnie i gwałtownie hamuje akumulację mRNA *IL-2*, a także innych genów wczesnej fazy aktywacji limfocytów T, tzn. *IL-3*, *IL-4*, *GM-CSF*, *TNF- α* , *IFN- γ* i *c-myc* [54].

FK506 wiąże się w płytkim wydrążeniu między helisą α i harmonijką β FKBP12 za pośrednictwem pięciu wiązań wodorowych. Z punktu widzenia aktywności enzymu istotne jest wiązanie amidowe w FK506. W wolnym FK506 wiązanie to jest w pozycji cis, a w związanym w pozycji trans. Można więc stwierdzić, że immunosupresor „naśladuje” naturalne substraty rotamazy. Jednak w przeciwieństwie do nich pozostaje trwale związany z enzymem, blokując jego centrum aktywne [56].

Rapamycynę (sirolimus) uzyskano z hodowli *Streptomyces hygroscopicus* znalezionej w próbkach gleby pobranych na Wyspie Wielkanocnej [48]. Kompleks rapamycyna-FKBP12 wiąże się z cytosolową kinazą serynowo-treoninową TOR (target of rapamycin), która reguluje wzrost komórki, syntezę białek i apoptozę w odpowiedzi na mitogeny i czynniki wzrostowe. Zahamowanie aktywności TOR prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 [59]. Kinaza ta reguluje odpowiedź limfocytów T na *IL-2* [26]. Rapamycyna nie wpływając na wydzielanie *IL-2* jak i innych limfokina, ani na ekspresję jej receptora zapobiega aktywacji i proliferacji limfocytów T w obecności egzogennej *IL-2* [48].

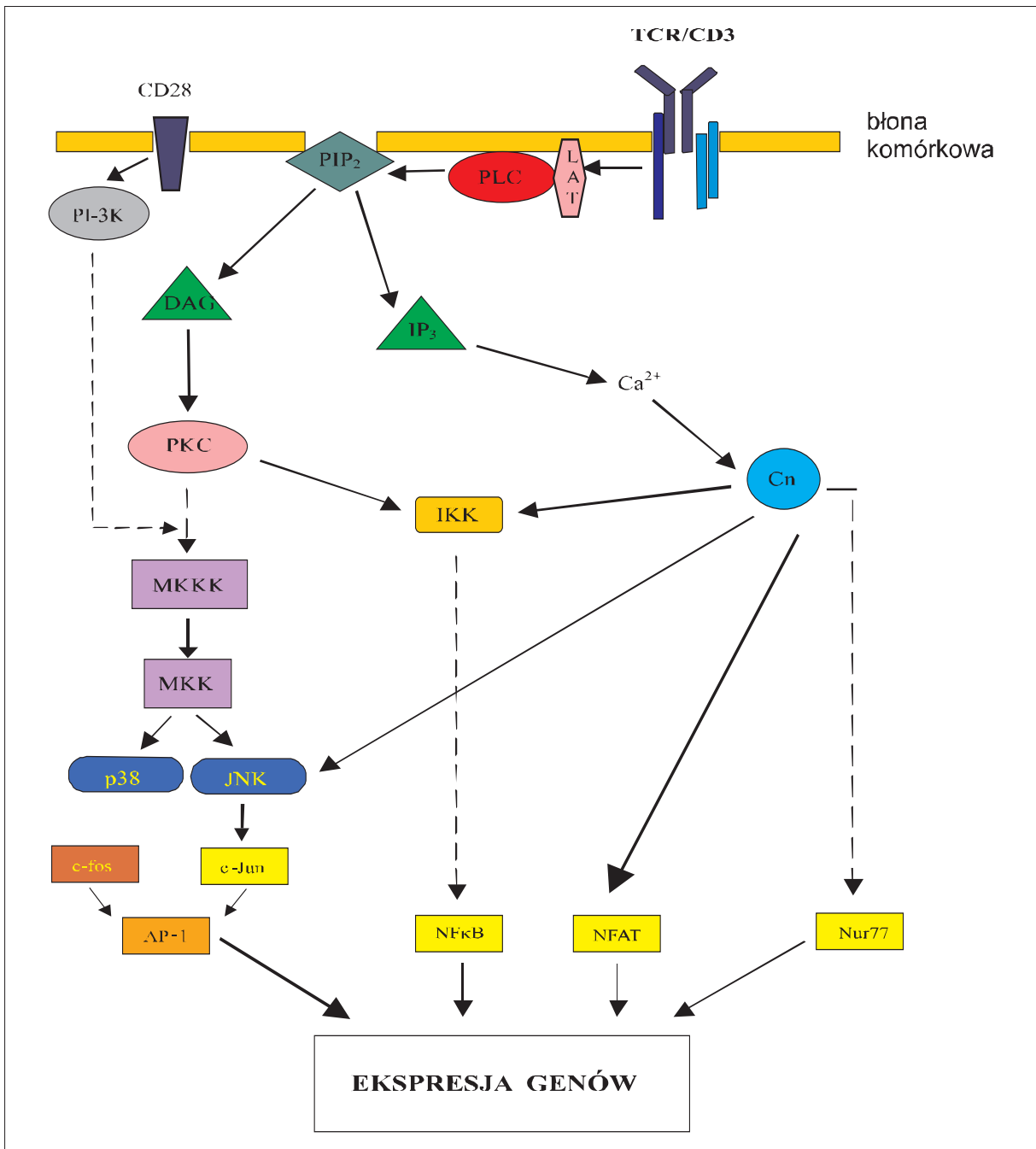
Należy zwrócić uwagę, że cel komórkowy obu immunosupresorów jest ten sam (FKBP12). Występuje więc pomiędzy nimi zjawisko współzawodnictwa, obserwowane *in vitro*. W efekcie rapamycyna może działać antagoniście do FK506 [32]. Oba antybiotyki blokują przekazywanie sygnału w komórce już w stężeniu 1 nM [6].

ENDOGENNE LIGANDY FKBP

FAP48 (FKBP-associated protein) – białko o masie 48 kDa – jest niedawno poznany kandydatem do roli endogennego ligandu FKBP12 i FKBP52 [28]. Autorzy sugerują, że FAP48 w asocjacji z FKBP bierze udział w aktywacji limfocytów T, zwiększając syntezę interleukiny 2, przy czym wolny FAP48 nie wykazuje takiego działania. Kompleksy FKBP-FAP48 są rozbijane przez FK506 i rapamycynę, co prowadzi do zwiększenia komórkowej puli niezwiązanego FAP48 oraz zahamowania wzmacniającego działania na syntezę *IL-2*. Może to stanowić kolejny aspekt właściwości immunosupresyjnych tych makrolidów. Efekt nadmiernej ekspresji FAP48 w komórkach Jurkat jest podobny do efektu działania FK506 lub rapamycyny – proliferacja zostaje zahamowana.

Kalcyneuryna

Jak już wspomniano wyżej, znanym celem kompleksu FKBP/FK506 jest kalcyneuryna [32]. Kalcyneuryna jest fosfatą serynowo-treoninową, aktywowaną przez wapń i kalmadulinę, zaangażowaną w regulację odpowiedzi immunologicznej. Enzym ten występuje jako heterodimer złożony z podjednostki katalitycznej, zwanej kalcyneuryną A (CnA), oraz regulatorowej, czyli kalcyneuryny B (CnB). Podjednostka A (około 60 kDa) zawiera N-



Ryc. 1. Uproszczony schemat przedstawiający wapieniowe szlaki sygnałowe zapoczątkowane rozpoznaniem antygeny przez kompleks TCR/CD3. Liniami przerywanymi zaznaczono obecność etapów pośrednich

końcową domenę katalityczną, centralne domeny wiążące kalcyneurynę B i kalmodulinę oraz C-końcową domenę autoinhibitorową. W pobliżu centrum katalitycznego znajdują się miejsca wiązania kompleksów immunofilina/immunosupresor (CyP/CsA, FKBP/FK506). Kalcyneuryna B (około 20 kDa) ma budowę zbliżoną do kalmoduliny i zawiera cztery miejsca wiązania wapnia [3].

Kalcyneuryna jest niezbędnym elementem szlaku sygnałowego prowadzącego do aktywacji limfocytów T. W wyniku rozpoznania antygeny przez kompleks receptora limfocy-

tów T (TCR/CD3), dochodzi między innymi do aktywacji fosfolipazy C, która hydrolizuje difosforan fosfatydyloinozytolu (PIP₂) z utworzeniem wtórnych przekaźników sygnału: diacyloglicerolu (DAG), będącego aktywatorem kinazy białkowej C (PKC), oraz trifosforanu inozytolu (IP₃), uwalniającego z siateczki śródplazmatycznej jony wapnia. Te z kolei są wiązane przez kalmodulinę i CnB, co prowadzi do utworzenia kompleksu kalcyneuryna/kalmodulina/Ca²⁺ i usunięcia domeny autoinhibitorowej z centrum katalitycznego enzymu. W ten sposób dochodzi do osiągnięcia pełnej aktywności fosfatazy [27] (ryc. 1).

Tabela 1. Główne substraty kalcyneuryny w limfocytach T

Substrat	Funkcja	Wpływ kalcyneuryny	Efekt końcowy
Receptory IP ₃ w błonie RE [11]	Regulacja uwalniania Ca ²⁺	Hamujący	Optymalizacja uwalniania Ca ²⁺ do cytoplazmy
Kinaza zależna od cykliny 4 [4]	Punkt kontrolny G0/G1	Hamujący	Hamowanie proliferacji
BAD [60]	Proapoptotyczna	Aktywujący	Blokowanie ochronnego działania Bcl-xL
JNK* [62]	Aktywacja c-jun	Aktywujący	Transkrypcja zależna od c-jun
IKK* [55]	Przeznaczenie IκB do proteolizy	Aktywujący	Transkrypcja zależna od NFκB
Elk-1 [53]	Czynnik transkrypcyjny	Hamujący	Zahamowanie transkrypcji genów <i>c-fos</i> i <i>erg-1</i>
MEF2 [7]	Czynnik transkrypcyjny	Aktywujący	Ekspresja Nur77, głównego mediatora apoptozy komórek T
NFAT [22,41,63,66]	Czynnik transkrypcyjny	Aktywujący	Transkrypcja genów cytokin i proapoptotycznego FasL

* synergistycznie z PKC

Wiele białek istotnych z punktu widzenia biologii komórki jest wiązanych i defosforylowanych przez kalcyneurynę. Tabela 1 przedstawia najważniejsze z białek występujących w limfocytach T, których funkcja modulowana jest przez tę fosfatazę.

TRANSPORT JĄDROWY CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

Zanim przejdziemy do omówienia głównego substratu dla kalcyneuryny w szlaku sygnałowym TCR, jakim jest czynnik transkrypcyjny NFAT, przedstawimy w skrócie dane na temat transportu jądrowego.

Istotnym aspektem regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych jest ich subkomórkowa lokalizacja. W stanie spoczynku wiele z nich znajduje się w cytoplazmie, co uniemożliwia im wiązanie DNA bez aktywacji odpowiedniego szlaku sygnałowego. Aby czynnik transkrypcyjny mógł pełnić swoją funkcję, musi zawierać dwa rodzaje sekwencji sygnałowych: NLS (nuclear localization signal) i NES (nuclear export signal), warunkujących odpowiednio translokację do jądra i powrót do cytoplazmy [46].

Klasyczny NLS jest krótką sekwencją bogatą w aminokwasy zasadowe (lizynę i argininę), np. KRX(10-12)KRRK [18], PKKKRKV [37]. W procesie translokacji do jądra białka zawierającego klasyczny NLS można wyróżnić następujące etapy:

- 1) rozpoznanie NLS przez swoisty receptor – kompleks importyn jądrowych α/β , zwanych również karioferynami. Rozpoznająca NLS importyna α jest wiązana przez β , która następnie kieruje tak powstały kompleks do poru błony jądrowej;
- 2) przetransportowanie białka do cytoplazmatycznej powierzchni jądrowego kompleksu porowego (nuclear pore complex – NPC), który jest selektywnie przepuszczalny dla białek związanych przez karioferyny;
- 3) translokacja przez kanał centralny NPC, z udziałem GTP-azy Ran;
- 4) uwolnienie transportowanego białka (cargo) od importyn po jądrowej stronie poru [14,37].

Czynniki transkrypcyjne w odpowiednim momencie powinny znaleźć się z powrotem w cytoplazmie. Umożliwia to sekwencja sygnałowa bogata w lizyny (NES), rozpoznawana przez eksportynę jądrową Crm1 [37]. W ten sposób terminacji ulega transaktywacyjne działanie czyn-

nika transkrypcyjnego, a ten osiąga stan gotowości do reakcji na następny sygnał.

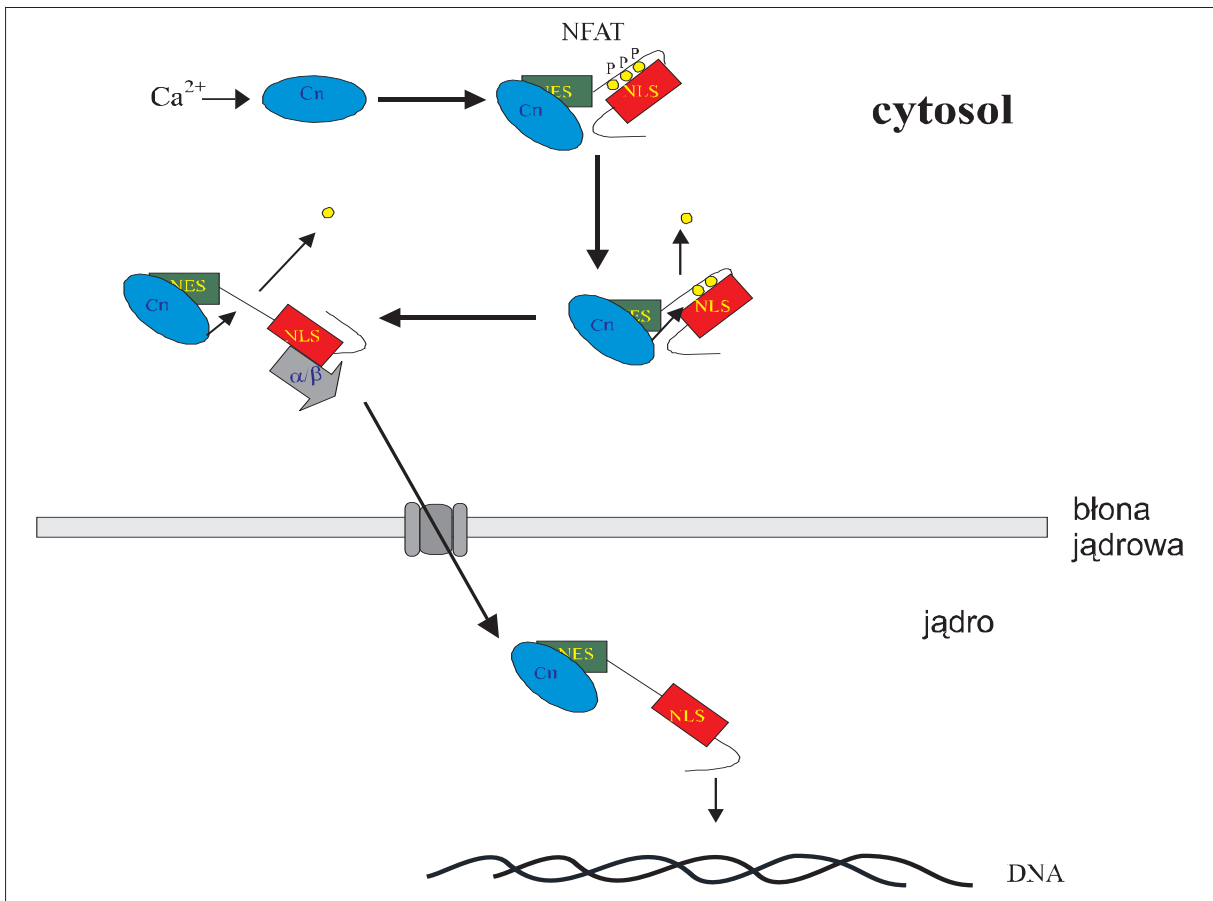
NFAT

Najważniejszym dla procesu aktywacji limfocytów T substratem kalcyneuryny jest NFAT (nuclear factor of activated T cells). Do rodziny NFAT należy pięć czynników transkrypcyjnych: NFAT1 (NFATp, NFATc2), NFAT2 (NFATc, NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx, NFATc3), oraz NFAT5 [30]. W układzie odpornościowym ekspresji ulegają NFAT1 i 2 (głównie w obwodowych narządach limfatycznych) oraz NFAT4 (głównie w grasicy) [1,33]. Aktywują one transkrypcję wielu genów istotnych dla rozwoju odpowiedzi immunologicznej, kodujących cytokiny (interleukiny 2, 3, 4, 5, 10, 13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF) [30,33], receptory powierzchniowe (CD69, CD40L) [3], czy regulatory apoptozy – Bcl-2 [38] i FasL [30]. Wszystkie pięć białek z rodziny NFAT jest zbudowanych podobnie: domena regulatorowa, odpowiedzialna za regulację subkomórkowej lokalizacji białka, wraz z domeną wiążącą DNA, oskrzydłone są przez dwie domeny transaktywacyjne (N¹- i C¹-końcową). Domena regulatorowa zawiera sekwencje sygnałowe warunkujące lokalizację jądrową (NLS) oraz eksport jądrowy (NES); ta ostatnia częściowo pokrywa się z miejscem wiązania kalcyneuryny. Pomiędzy nimi leży region bogaty w seryny (serine – rich region, SRR), który w komórkach spoczynkowych jest silnie ufosforylowany [1, 22].

REGULACJA LOKALIZACJI SUBKOMÓRKOWEJ NFAT – IMPORT /EXPORT JĄDROWY

Import jądrowy NFAT

Reszty fosfoserynowe SRR oddziałują z resztami zasadowych aminokwasów tworzących NLS, uniemożliwiając rozpoznanie sekwencji przez kompleks importyn α/β . Unieruchomiony w ten sposób w cytoplazmie monomer nie może pełnić funkcji czynnika transkrypcyjnego. Wzrost cytoplazmatycznego poziomu jonów wapnia prowadzi do aktywacji kalcyneuryny oraz do zwiększenia jej powinowactwa do NFAT. Fosfataza wiąże się z domeną regulatorową NFAT zasłaniając sekwencje NES. Bliskość regionu bogatego w seryny umożliwia fosfatazie defosforylację reszt serynowych, co prowadzi do odsłonięcia NLS i rozpoznania przez karioferyny. W ten sposób kal-



Ryc. 2. Import jądrowy NFAT (objaśnienia w tekście); Cn – kalcyneuryna; NES-NLS – NFAT; P – reszta fosforanowa/importyna

cyneuryna umożliwia import jądrowy i inicjację transkrypcji genów docelowych dla NFAT [22,66] (rycina 2).

Kalcyneuryna pozostaje w kompleksie z NFAT tak długo, jak długo podwyższony jest wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia. Zasłaniając NES czynnika transkrypcyjnego, kalcyneuryna zapobiega jego przedwczesnemu eksportowi do cytoplazmy. Czas trwania zależnej od NFAT transkrypcji genów jest ściśle regulowany czasem trwania sygnału wapniowego [41,66].

Eksport jądrowy NFAT

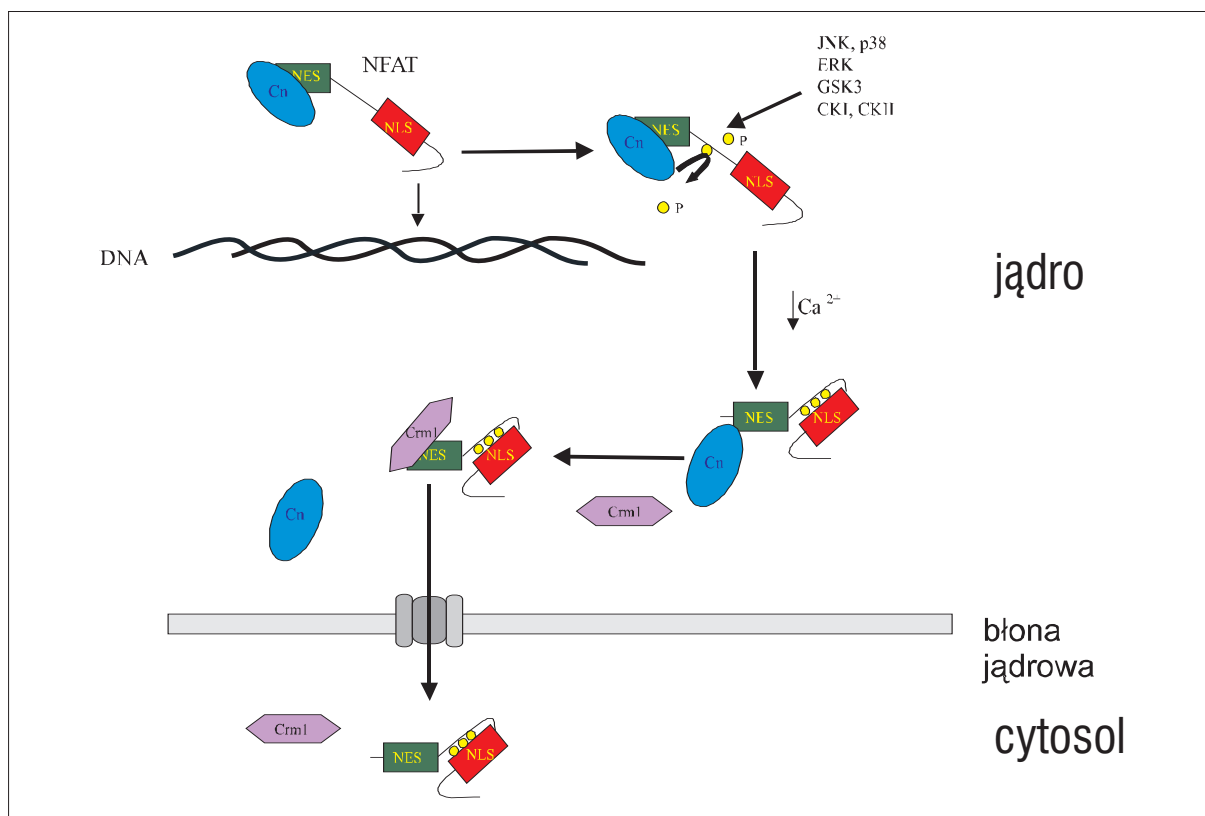
Obecny w jądrze czynnik NFAT jest potencjalnym substratem wielu kinaz, takich jak JNK, p38, ERK, CKI i II (kinazy kazeinowe), GSK3. Przez cały czas dochodzi do refosforylacji w obrębie SRR, czego następstwem byłoby ponowne zasłonięcie sekwencji lokalizacji jądrowej. Przeciwdziałą temu stała obecność kalcyneuryny w pobliżu fosforylowanego regionu oraz jej aktywność fosfatazowa. Aktywność NFAT jest więc wynikiem stanu dynamicznej równowagi między aktywnością kinaz jądrowych, a aktywnością fosfatazową kalcyneuryny [41,66].

Obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia prowadzi do osłabienia interakcji kalcyneuryna – NFAT, jak również do zahamowania aktywności fosfatazy, przez co enzym nie może dłużej utrzymywać SRR

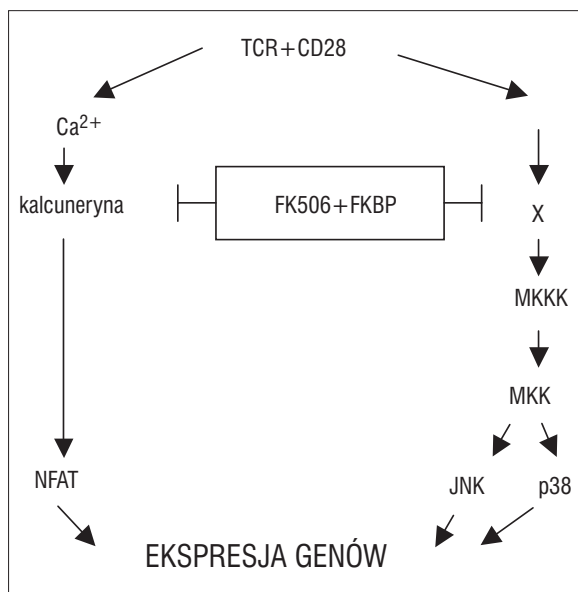
w stanie nieufosforylowanym [41]. W efekcie dochodzi do ponownego zasłonięcia sekwencji NLS przez SRR oraz oddysocjowania kalcyneuryny od NFAT. Odsłonięta sekwencja NES zostaje rozpoznana przez eksportynę jądrową Crm1, która transportuje czynnik transkrypcyjny do cytoplazmy [66] (rycina 3).

CsA i FK506 hamują transkrypcję zależną od NFAT. Z jednej strony uniemożliwiają defosforylację czynnika transkrypcyjnego przez fosfatazę, z drugiej – dzięki blokowaniu oddziaływania NFAT/kalcyneuryna - umożliwiają eksport jądrowy czynnika transkrypcyjnego do cytoplazmy [30].

W podsumowaniu należy powiedzieć, że kalcyneuryna wiąże się z domeną regulatorową NFAT zasłaniając sekwencję NES i – przez defosforylację reszt serynowych – odsłaniając NLS, co prowadzi do połączenia NFAT z kompleksem karioferyny. W ten sposób kalcyneuryna umożliwia import jądrowy i inicjację transkrypcji genów docelowych dla NFAT. Znanym celem kompleksu FKBP/FK506 jest kalcyneuryna. W pobliżu centrum katalicznego fosfatazy znajdują się miejsca wiązania kompleksów immunofilina/immunosupresora (CyP/CsA, FKBP/FK506). Przez blokowanie oddziaływania NFAT/kalcyneuryna wspomniane kompleksy nie dopuszczają do importu jądrowego oraz umożliwiają eksport jądrowy czynnika transkrypcyjnego do cytoplazmy i zakończenie aktywności transaktywacyjnej NFAT.



Ryc. 3. Eksport jądrowy NFAT (objaśnienia w tekście); Cn – kalcyneuryna; NES-NLS – NFAT; P – reszta fosforanowa; Crm1 – eksportyna jądrowa



Ryc. 4. Schemat działania kompleksów immunofilina-immunosupresor na dwa szlaki sygnałowe zależne od TCR (wg [34], zmodyfikowano)

Kalcyneuryna jako endogenny ligand FKBP

Początkowo uważano, że białka wiążące FK506 oddziałują z kalcyneuryną tylko w wyniku przyłączenia makrolidu. Stwierdzono jednak niezależne od FK506 tworzenie kom-

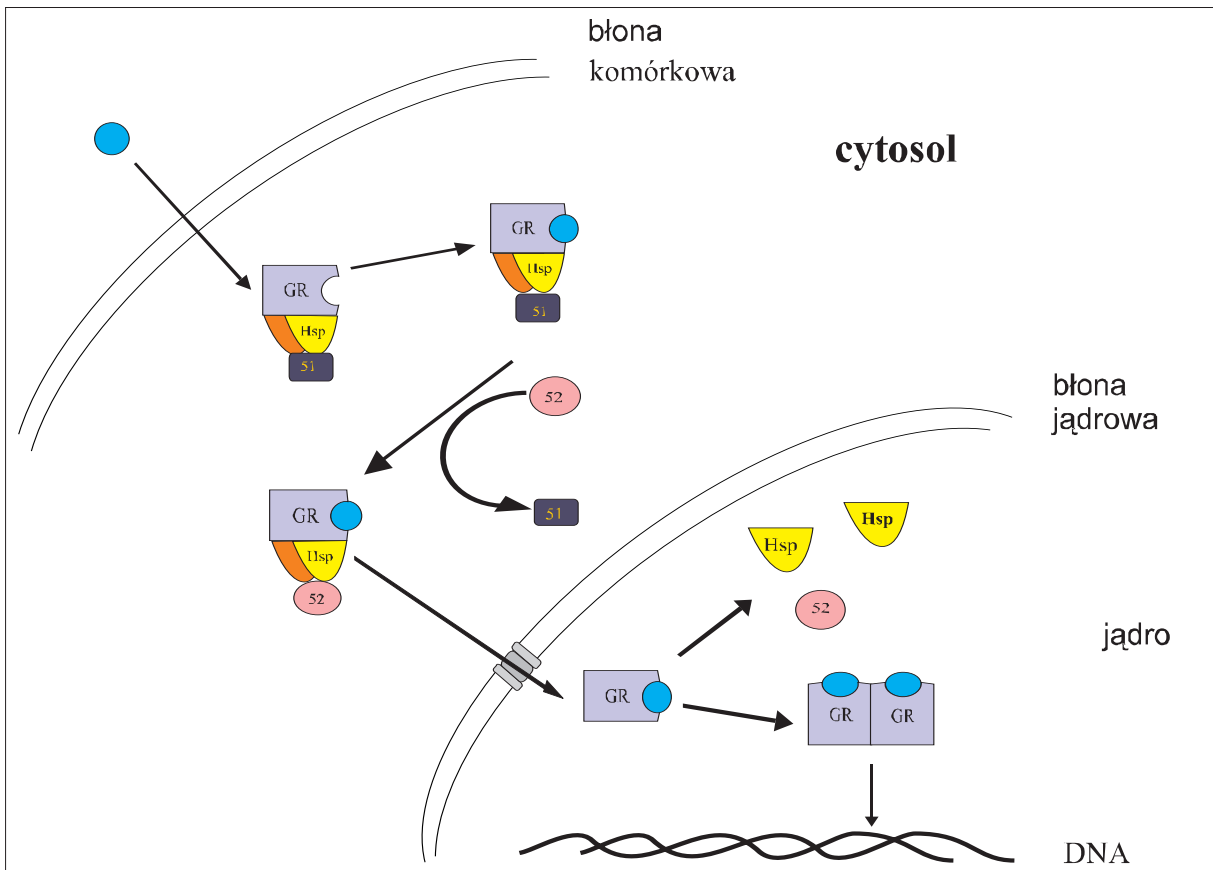
pleksów FKBP-Cn w dwuhybrydowym systemie drożdżowym (FKBP12-Cn) [12] oraz w mysich limfocytach T (FKBP51-Cn) [31]. Istotą działania makrolidów może więc być silne wzmacnianie tych istniejących, fizjologicznych oddziaływań. Analogiczna sytuacja występuje w przypadku CypA-Cn. Nie można wykluczyć, że jedną z fizjologicznych funkcji immunofilin jest modulacja aktywności kalcyneuryny *in vivo* [12]. Innymi słowy, obok FAP48, kalcyneuryna może być kolejnym endogennym ligandem FKBP.

Co interesujące, w przeciwieństwie do pozostałych (znanych dziś) białek z tej rodziny, FKBP38 nie wykazuje aktywności enzymatycznej, ani nie wiąże immunosupresorów (dzięki różnicy w sekwencji aminokwasowej domeny N-końcowej). Wiąże jednak kalcyneurynę, a jego nadekspresja blokuje import jądrowy NFAT indukowany jonoforem wapnia. Wskazuje to, iż omawiana izoforma pełnić może rolę endogennego inhibitora fosfatazy w warunkach fizjologicznych. Kompleksy FKBP-FK506 mogłyby zaś imitować jego strukturę i funkcję [50].

INTERAKCJE FK506/FKBP Z KINAZAMI MAP (JNK I P38)

Niedawno uzyskano dane wskazujące na istnienie innych, poza kalcyneuryną, szlaków wrażliwych na FK506 i CsA [34].

Aktywacja NFAT oraz NFκB jest warunkiem niezbędnym, ale niewystarczającym do zainicjowania ekspresji IL-2 w limfocytach T. Konieczny jest również udział AP-1, heterodimerycznego czynnika transkrypcyjnego utwo-



Ryc. 5. Model aktywacji receptora glukokortykoidów (wg [15], zmodyfikowano); GR – receptor glukokortykoidowy; Hsp – Hsp90; 51 – FKBP51; 52 – FKBP52

rzezonego przez białko Jun oraz białko z rodziny albo Fos, albo ATF [25]. Oprócz wiązania elementów odpowiedzi na AP-1 w promotorze genu IL-2, dimer ten stabilizuje wiązanie NFAT z DNA. W limfocytach T przez zintegrowane sygnały od TCR i CD28 aktywowane są kinaza p38 i JNK (c-Jun N-terminal kinase), należące do kinaz MAP i aktywujące szereg czynników transkrypcyjnych kluczowych dla aktywacji limfocytów T [52]. Do substratów JNK należą komponenty dimerów AP-1 [25].

O blokowaniu aktywności JNK przez CsA informowano już dziesięć lat temu [52]. FK506 wykazuje działanie analogiczne. Jednak dokładny mechanizm tego zjawiska znany jest od niedawna. Wykazano, że kompleks FKBP-FK506, oprócz szlaku kalcyneuryna/NFAT, blokuje również szlaki JNK i p38 powyżej kinazy MAPK (mitogen-activated protein kinase), czyli MAPKKK (MKKK). Efekt hamowania JNK i p38 przez FKBP-FK506 wydaje się specyficznym dla komórek limfoidalnych [34] (rycina 4).

INTERAKCJE FKBP Z RECEPTOREM DLA GLUKOKORTYKOIDÓW

Znanymi modulatorami funkcji limfocytów T są glukokortykoidy, oddziałujące na komórkę za pośrednictwem wewnątrzkomórkowego receptora, pełniącego rolę zależnego od ligandu czynnika transkrypcyjnego. Hormony te powodują wygaszenie odpowiedzi immunologicznej dojrzałych limfocytów T i makrofagów. Liczne doniesienia

wskazują, iż glukokortykoidy wpływają też na szlaki sygnałowe istotne w procesie selekcji tymocytów w grasicy [10,57], jednak ich wpływ na dojrzewanie tych komórek jest przedmiotem kontrowersji, ze względu na zastosowanie różnych modeli doświadczalnych.

Dwa białka z rodziny FKBP (o masie cząsteczkowej 51 i 59 kDa) biorą udział w odpowiedzi komórki na hormon glukokortykoidowy. Domena N-końcowa FKBP52 (poprzednio FKBP59) przypomina budowę FKBP12; zawiera centrum katalityczne izomerazy peptydyloprolylowej (PPI-azy) i miejsce wiązania FK506 oraz rapamycyny. Domena C-końcowa odpowiada za aktywność chaperonową białka oraz wiązanie C-końcowego regionu Hsp90 [40]. Podobnie jest zbudowane FKBP51, wykazujące relatywnie większe powinowactwo do Hsp90, za co odpowiadają odmienne u obu immunofilin C-końcowe reszty aminokwasowe [13].

Receptor glukokortykoidowy w stanie nieaktywnym tworzy cytoplazmatyczny kompleks z dwiema cząsteczkami Hsp90 i jedną cząsteczką białka pomocniczego, którego funkcję pełni m. in. FKBP51. W wyniku związania liganda przez receptor dochodzi do zastąpienia FKBP51 przez FKBP52, z następującym przyłączeniem do domeny katalitycznej rotamazy białka transportowego, dyneiny. Następuje translokacja tak powstałego kompleksu do jądra, gdzie ulega on dysocjacji z utworzeniem postaci GR zdolnej do dimeryzacji i

wiązania DNA. To swego rodzaju „przełączenie“ związanej immunofiliny jest pierwszym i jednocześnie niezbędnym etapem szlaku sygnałowego glukokortykoidów [15] (rycina 5).

Dzięki swej aktywności izomerazowej FKBP52 prowadzi do zmiany konformacyjnej w domenie GR wiążącej ligand, przez co zwiększa powinowactwo receptora względem hormonu, wzmacniając ekspresję genów zależnych od glukokortykoidów [43]. FKBP51 działa antagonistycznie, konkurując o dostęp do kompleksu GR-Hsp90 [45]. Izoforma ta jest produktem jednego z genów docelowych dla GR, regulując jego aktywność na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [58]. Obserwowana u naczelnych Nowego Świata oporność na kortyzol koreluje z konstytutywną u tych zwierząt nadekspresją FKBP51 [44].

Związanie FK506 lub rapamycyny przez FKBP51 oraz FKBP52 prowadzi do zahamowania aktywności enzymatycznej izomeraz, choć wymaga to wyższych stężeń antybiotyku, niż w przypadku FKBP12 [31]. Kompleks FKBP51-FK506 hamuje kalcyneurynę [5], natomiast FKBP52-FK506 nie wykazuje właściwości immunosupresyjnych [29].

PODSUMOWANIE

Podsumowując należy powiedzieć, że w rozwoju swoistej odpowiedzi odpornościowej właściwą reakcją na obecność obcego antygeny zapewnia w limfocytach T przekazywanie sygnału od receptora TCR do jądra komórki. Zadanie to spełnia w dużej mierze kalcyneuryna przez regulację aktywacji i subkomórkowej lokalizacji NFAT oraz innych czynników transkrypcyjnych, regulując tym samym ekspresję genów istotnych w aktywacji limfocytów T. Białka FKBP po związaniu ligandów blokują funkcję kalcyneuryny. Ostatnie dane wskazują na nowe, swoiste cele w komórkach limfoidalnych dla kompleksów FK506/FKBP oraz rolę białek FKBP w transporcie jądrowym. Zgodnie z nimi, makrolidy hamują oprócz zależnej od kalcyneuryny aktywacji NFAT, także aktywację kinaz JNK i p38 oraz wpływają na translokację i aktywację receptora dla glukokortykoidów. Oznacza to ich wpływ na ekspresję genów:

- kontrolowanych przez kalcyneurynę (tabela 1),
- aktywowanych przez kinazy aktywowane mitogenem JNK i p38,
- kontrolowanych przez receptor dla glukokortykoidów.

Prawdopodobnie obecność w limfocytach T co najmniej kilku różnych szlaków sygnałowych hamowanych przez FK506 i CsA czyni z tych leków tak efektywne inhibitory swoistej odpowiedzi odpornościowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Amasaki Y., Masuda E.S., Imamura R., Arai K., Arai N.: Distinct NFAT family proteins are involved in the nuclear NFAT-DNA binding complexes from human thymocyte subsets. *J. Immunol.*, 1998; 160: 2324-33
- [2] Arndt C., Cruz M.C., Cardenas M.E., Heitman J.: Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 1999; 145: 1989-2000
- [3] Baksh S., Burakoff S.J.: The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin. Immunol.*, 2000; 12: 405-415
- [4] Baksh S., De Caprio J.A., Burakoff S.J.: Calcineurin regulation of the mammalian G0/G1 checkpoint element, cyclin dependent kinase 4. *Oncogene*, 2000; 19: 2820-27
- [5] Baughman G., Wiederrecht G.J., Chang F., Martin M.M., Bourgeois S.: Tissue distribution and abundance of human FKBP51, an FK506-binding that can mediate calcineurin inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 232: 437-43
- [6] Bierer B.E., Somers P.K., Wandless T.J., Burakoff S.J., Schreiber S.L.: Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand. *Science*, 1990; 250: 556-59
- [7] Blaeser F., Ho N., Prywes R., Chatila T.A.: Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 197-209
- [8] Bommireddy R., Ormsby I., Yin M., Boivin G.P., Babcock G.F., Doetschman T.: TGFβ1 inhibits Ca2+-calcineurin-mediated activation in thymocytes. *J. Immunol.*, 2003; 170: 3645-52
- [9] Brazin K.N., Mallis R.J., Fulton D.B., Andreotti A.H.: Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 1899-904
- [10] Brewer J.A., Kanagawa O., Sleckman B.P., Muglia L.J.: Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids *in vivo*. *J. Immunol.*, 2002; 169: 1837-43
- [11] Cameron A.M., Steiner J.P., Roskams A.J., Ali S.M., Ronnett G.V., Snyder S.H.: Calcineurin associated with the inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca2+ flux. *Cell*, 1995; 83: 463-72
- [12] Cardenas M.F., Hemenway C., Muir R.S., Ye R., Fiorentino D., Heitman J.: Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J.*, 1994; 13: 5944-57
- [13] Cheung-Flynn J., Roberts P.J., Riggs D.L., Smith D.F.: C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 17388-94
- [14] Cingolani G., Bednenko J., Gillespie M.T., Gerace L.: Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Mol. Cell*, 2002; 10: 1345-53
- [15] Davies T.H., Ning Y.M., Sanchez E.R.: A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 4597-600
- [16] Dumont F.J.: FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr. Med. Chem.*, 2000; 7: 731-48
- [17] Fischer G., Schmid F.X.: The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for *de novo* protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, 1990; 29: 2205-12
- [18] Fontes M.R., Teh T., Jans D.A., Brinkworth R.I., Kobe B.: Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 27981-87
- [19] Galat A., Lane W.S., Standaert R.F., Schreiber S.L.: A rapamycin-selective 25-kDa immunophilin. *Biochemistry*, 1992; 31: 2427-34
- [20] Harding M.W., Galat A., Uehling D.E., Schreiber S.L.: A receptor for the immunosuppressant FK506 is a peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, 1989; 341: 758-60
- [21] Harrison R.K., Stein R.L.: Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*, 1990; 29: 3813-16
- [22] Holmberg C.I., Tran S.E.F., Eriksson J.E., Sistonen L.: Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem. Sci.*, 2002; 27: 619-27

- [23] Jin Y.-J., Albers M.W., Lane W.S., Bierer B.E., Schreiber S.I., Burakoff S.J.: Molecular cloning of a membrane-associated human FK506-binding and rapamycin-binding protein, FKBP-13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 6677-81
- [24] Kalas W., Matuszyk J., Ziolo E., Strządala L.: FK506 restores sensitivity of thymic lymphomas to calcium-mediated apoptosis and the inducible expression of Fas Ligand. *Anticancer Res.*, 2003; 23: 1613-17
- [25] Karin M.: The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 16483-86
- [26] Kirken R.A., Wang Y.L.: Molecular actions of sirolimus: sirolimus and mTOR. *Transplant. Proc.*, 2003; 35: S227-30
- [27] Klee C.B., Ren H., Wang X.: Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 13367-70
- [28] Krummrei U., Baulieu E.E., Chambrud B.: The FKBP-associated protein FAP48 is an antiproliferative molecule and a player in T cell activation that increases IL2 synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 2444-49
- [29] Lebeau M.C., Myagkikh I., Rouviere-Fourmy N., Baulieu E.E., Klee C.B.: Rabbit FKBP-59/HBI does not inhibit calcineurin activity *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 203: 750-55
- [30] Lee M.-O., Kang H.-J., Kim Y.M., Oum J.-H., Park J.: Repression of FasL expression by retinoic acid involves a novel mechanism of inhibition of transactivation function of the nuclear factors of activated T-cells. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269: 1162-70
- [31] Li T.K., Baksh S., Cristillo A.D., Bierer B.E.: Calcium- and FK506-independent interaction between the immunophilin FKBP51 and calcineurin. *J. Cell. Biochem.*, 2002; 84: 460-71
- [32] Liu L., Farmer J.D.Jr, Lane W.S., Friedman J., Weissman I., Schreiber S.L.: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 1991; 66: 807-15
- [33] Masuda E.S., Naito Y., Tokumitsu H., Campbell D., Saito F., Hannum C., Arai K.-I., Arai N.: NFATx, a novel member of the Nuclear Factor of Activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol. Cell. Biol.*, 1995; 15: 2697-706
- [34] Matsuda S., Shibasaki F., Takehana K., Mori H., Nishida E., Koyasu S.: Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep.*, 2000; 1: 428-34
- [35] Michnick S.W., Rosen M.K., Wandless T.J., Karplus M., Schreiber S.L.: Solution Structure of FKBP, a Rotamase Enzyme and Receptor for FK506 and Rapamycin. *Science*, 1991; 252: 836-39
- [36] Migita K., Eguchi K., Kawabe Y., Tsukada T., Mizokami A., Nagataki S.: FK506 augments activation-induced programmed cell death of T lymphocytes *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 1995; 96: 727-32
- [37] Nigg E.A.: Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 1997; 386: 779-87
- [38] Oukka M., Ho I.-C., de la Brousse F.C., Hoey T., Grusby M.J., Glimcher L.H.: The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*, 1998; 9: 295-304
- [39] Peattie D.A., Harding M.W., Fleming M.A., de Cenzo M.T., Lipkko J.A., Livingston D.J., Benasutti M.: Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 10974-78
- [40] Pirkel F., Fischer E., Modrow S., Buchner J.: Localization of the chaperone domain of FKBP52. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 37034-41
- [41] Porter C.M., Havens M.A., Clipstone N.A.: Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 3543-51
- [42] Pyrzyńska B., Lis A., Mosieniak G., Kamińska B.: Cyclosporin A-sensitive signaling pathway involving calcineurin regulates survival of reactive astrocytes. *Neurochem. Int.*, 2001; 38: 409-15
- [43] Ratajczak T., Ward B.K., Minchin R.F.: Immunophilin chaperones in steroid receptor signalling. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2005; 3: 1348-57
- [44] Reynolds P.D., Ruan Y., Smith D.F., Scammell J.G.: Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999; 84: 663-69
- [45] Riggs D.L., Roberts P.J., Chirillo S.C., Cheung-Flynn J., Prapapanich V., Ratajczak T., Gaber R., Picard D., Smith D.F.: The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling *in vivo*. *EMBO J.*, 2003; 22: 1158-67
- [46] Rout M.P., Aitchison J.D.: The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 16593-96
- [47] Schonbrunner E.R., Schmid F.X.: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase improves the efficiency of protein disulfide isomerase as a catalyst of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 4510-13
- [48] Sehgal S.N.: Sirolimus: ist discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc.*, 2003; 35: S7-14
- [49] Sewell T.J., Lam E., Martin M.M., Leszyk J., Weidner J., Calaycay J., Griffin P., Williams H., Hung S., Cryan J.: Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 21094-102
- [50] Shirane M., Nakayama K.I.: Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nature Cell. Biol.*, 2003; 5: 1-10
- [51] Siekierka J.J., Hung S.H.Y., Poe M., Lin C.S., Sigal N.H.: A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, 1989; 341: 755-57
- [52] Su B., Jacinto E., Hibi M., Kallunki T., Karin M., Ben-Neriah Y.: JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell*, 1994; 77: 727-36
- [53] Sugimoto T., Stewart S., Guan K.-L.: The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 29415-18
- [54] Tocci M.J., Matkovich D.A., Collier K.A., Kwok P., Dumont F., Lin S., Degudicibus S., Siekierka J.J., Chin J., Hutchison N.I.: The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J. Immunol.*, 1989; 143: 718-26
- [55] Trushin S.A., Pennington K.N., Algeciras-Schimmich A., Paya C.V.: Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF κ B in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 22923-31
- [56] Van Duyn G.D., Standaert R.F., Karpulus P.A., Schreiber S.L., Clardy J.: Atomic Structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science*, 1991; 252: 839-42
- [57] Van Laethem F., Baus E., Smyth L.A., Andris F., Bex F., Urbain J., Kioussis D., Leo O.: Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 803-814
- [58] Vermeer H., Hendriks-Stegeman B.I., van der Burg B., van Buul-Offers S.C., Jansen M.: Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003; 88: 277-84
- [59] Vilella-Bach M., Nuzzi P., Fang Y., Chen J.: The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 4266-72
- [60] Wang H.G., Pathan N., Ethell I.M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke T.F., Reed J. C.: Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 1999; 284: 339-45
- [61] Wang T., Li B.Y., Danielson P.D., Shah P.C., Rockwell S., Lechleider R.J., Martin J., Manganaro T., Donahoe P.K.: The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell*, 1996; 86: 435-44
- [62] Werlen G., Jacinto E., Xia Y., Karin M.: Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J.*, 1998; 17: 3101-11
- [63] Wesselborg S., Fruman D.A., Sagoo J.K., Bierer B.E., Burakoff S.J.: Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp). *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 1274-77
- [64] Wiederrecht G., Hung S., Chan H.K., Marcy A., Martin M., Calaycay J., Boulton D., Sigal N., Kincaid R.L., Siekierka J.J.: Characterization of high molecular weight FK-506 binding activities reveals a novel FK-506-binding protein as well as a protein complex. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 21753-60
- [65] Zawadzka M., Kamińska B.: Immunosuppressant FK506 affects multiple signaling pathways and modulates gene expression in astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2003; 22: 202-9
- [66] Zhu J., McKeon F.: NF-AT activation requires suppression of Crm-1 dependent export by calcineurin. *Nature*, 1999; 398: 256-60