

Apelina i jej receptor w strukturach ośrodkowego układu nerwowego

AGATA WAWRZYNIAK-GACEK

Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Wawrzyniak-Gacek A.

Apelin, and its receptor within the central nervous system

Summary

Apelin (APLN) is a new peptide which was initially gained from extracts of the bovine stomach mucous membrane. It has a few isoforms differing in length of polypeptide chain and biological activity. Apelin exerts a biological effect using a specific apelin receptor (APJ). At present, there is an increase of interest in this peptide and its receptor because they are specifically localized in the central nervous system (OUN). By means of immunohistochemical techniques it has been demonstrated that the majority of neurons contain APLN and some neurons along with oligodendrocytes and astrocytes accompanying them reveal a clear localization of the APJ receptor both in the white and grey matter of the spinal cord and brain. APLN can participate in the OUN's development. It performs a function of neurotransmitter and neuromodulator as well as a regulator of synaptic conductivity. This peptide controls neuroendocrine mechanisms in the hypothalamus-pituitary axis. APLN regulates circadian rhythms as well as drinking and eating mechanisms in the pineal gland. In astrocytes APLN can exert neuroprotective activity and regulate astrocyte-neuron interactions. APLN's influence on the functioning of glia and neurons through the APJ receptor has not been fully explained. Further examination can provide information about APLN's role and its APJ receptor in normal and pathologically changed OUN.

Keywords: apelin, receptor APJ, neurons, glia

Peptydy odgrywają kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych jako: cytokiny, neuroprzekazniki, neuromodulatory i hormony. Liczne badania wykazały ich znaczenie w biologii komórki, neurologii, immunologii oraz farmakologii. Rozwój badań nad peptydem – apeliną (APLN) i jej receptorem (APJ) w przeciągu ostatnich lat dostarcza ciągle nowych informacji na temat ich struktury chemicznej, występowania oraz pełnionych funkcji. Formą wyjściową dla apeliny jest preproapelina składająca się z 77 aminokwasów u człowieka, szczura, myszy i krowy. Ze względu na ich różny charakter aminokwasowy wyróżniono kilka izoform apeliny, a ich prekursorem jest apelina-36, której łańcuch peptydowy zawiera 36 aminokwasów (6, 9, 10). Ta forma APLN wykazuje niską aktywność biologiczną. W wyniku proteolizy apeliny-36 powstają krótsze jej izoformy: apelina-13, apelina-16, apelina-17, apelina-19, o większej aktywności biologicznej (7, 8, 22). Apelina, podobnie jak hormony czy neuropeptydy, wykazuje biologiczną aktywność, łącząc się ze swoistym receptorem transbłonowym protein-coupled receptor związanym z białkiem G (GPCR). Apelina-13 i apelina-17 zawierają C-koniec peptydu, który aktywnie

wiąże się ze swoistym transbłonowym receptorem apeliny (APJ) przez jego 7-częściowy fragment transbłonowy. Największe powinowactwo do receptora APJ, a tym samym największą aktywność biologiczną, wykazuje apelina-13 (15, 16, 22). Połączenie APLN z APJ jest odwracalne, nasycone i specyficzne oraz zależne od czasu trwania internalizacji receptora APJ. Pod względem struktury i miejsca występowania w organizmie APLN jest podobna do angiotensynogenu, a receptor APJ wykazuje podobieństwo w ok. 30-40% sekwencji aminokwasów do receptora angiotensyny AT1 (15). Komórki wyrażające ekspresję receptora APJ, mające zdolność wiązania endogennego ligandu APLN wykryto w jajniku chomika chińskiego. Apelina i jej receptor wykazują w znacznym stopniu międzygatunkową konserwatywność, tzn. sekwencja aminokwasów jest podobna u wielu gatunków ssaków (22). Apelinę uznano za nową cytokinę i zlokalizowano w większości tkanek oraz narządów ssaków (21). W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie APLN i APJ w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), a ich interakcje i pełnione funkcje są słabo poznane oraz w dalszym ciągu badane.

Charakterystyka APLN w strukturach OUN

Przeprowadzono liczne badania dotyczące obecności apelinu w strukturach OUN człowieka i różnych gatunków zwierząt. Gen kodujący endogenną apelinę (APLN) pierwotnie wyizolowano z ekstraktów błony śluzowej żołądka wołu oraz wykryto na chromosomie 10 u szczura (6, 9, 22). W 2000 r. za pomocą analizy Northern blot wykazano obecność preproapelinu mRNA w ekstraktach wielu obszarów mózgowia u człowieka: w jądrze ogoniastym (*nucleus caudatus*), we wzgórzu (*thalamus*), w podwzgórzu (*hypothalamus*), w hipokampie (*hippocampus*), w przegrodzie (*septum*), w guzku węchowym (*tuberculum olfactorium*), w śródmózgowiu (*mesencephalon*), w kresomózgowiu (*telencephalon*), w moście (*pons*), w mózdzku (*cerebellum*), w płacie czołowym kory mózgowej (*lobus frontalis cortex cerebri*) oraz w przysadce mózgowej (*hypophysis*). Wysoki jego poziom odnotowano także w kilku obszarach mózgowia u szczura w okolicach ogonowych prążkowie (*caudal striatum regions*), w obszarach somatosensorycznych (*somatosensory areas*) oraz w korze mózgowej (*cerebral cortex*) (9, 10).

Przy użyciu poliklonalnego przeciwciała w 2001 r. wykazano lokalizację apelinu-13 i apelinu-17 w ciałach komórkowych neuronów i wypustkach nerwowych w dwóch jądrach podwzgórza (*nuclei hypothalami*), tj. w jądrze nadwzrokowym (*nucleus supraopticus*) i w jądrze przykomorowym (*nucleus paraventricularis*) oraz we wzgórzu (*thalamus*). Neurony te nazwano apelinergicznymi (17). Następnie ustalono rozmieszczenie neuronów apelinergicznymi zawierających apelinę-13, apelinę-17 i apelinę-12 prawie we wszystkich obszarach mózgowia dorosłych szczurów. Wykazano zróżnicowaną intensywność immunoreaktywności APLN (APLN-IR) między obszarami, jak również między neuronami nawet w tym samym obszarze OUN (18). Neurony różniły się także wewnątrzkomórkową lokalizacją APLN. Pewne neurony zawierały ją w perikarionach i we włóknach nerwowych, inne jedynie we włóknach nerwowych i zakończeniach nerwowych. Intensywną immunoreaktywnością APLN w ciałach neuronów cechowały się m.in.: jądro przedwzrokowe przysiódkowe (*nucleus praeoptica medialis*), pole przedwzrokowe boczne (*area praeoptica lateralis*), jądro okołokomorowe (*nucleus periventricularis*), jądro nadwzrokowe (*nucleus supraopticus*), jądro łukowate (*nucleus arcuatus*), nakrywka (*tegmentum*), jądra mostu (*nuclei pontis*), jądro siatkowate boczne (*nucleus reticularis lateralis*), pasmo rdzeniowe nerwu trójdzielnego (*nucleus spinalis nervi trigemini*). Obszarami, w których zaobserwowano dużą liczbę włókien immunopozytywnych dla APLN były: jądro przykomorowe wzgórza (*nucleus paraventricularis thalami*), jądro nadskrzyżowaniowe (*nucleus supra-chiasmaticus*), pole zaskrzyżowaniowe (*area retro-chiasmatica*), wyniosłość pośrodkowa (*eminentia medialis*), jądro przykomorowe podwzgórza (*nucleus paraventricularis hypothalami*) i pole najdalsze (*area*

postrema). Jedynie w jądrach przykomorowych podwzgórza (*nuclei paraventricularis hypothalami*) wykazano APLN zarówno w perikarionie, jak i we włóknach nerwowych. W niektórych neuronach, a w szczególności w jądrze nadwzrokowym podwzgórza (*nucleus supraopticus hypothalami*) preproapelinu mRNA lokalizował się biegunowo w ciele komórek nerwowych (18). W analizach ilościowych wskazano na pewne różnice międzygatunkowe. U człowieka najwyższy poziom preproapelinu mRNA wykryto w neuronach obszarów: ciała modzelowatego (*corpus callosum*), rdzenia kręgowego (*medulla spinalis*), ciała migdałowego (*corpus amygdaloideum*), istoty czarnej (*substantia nigra*) i przysadki mózgowej (*hypophysis*). U szczura w przysadce mózgowej (*hypophysis*) wykazano niższy poziom preproapelinu w porównaniu z człowiekiem i myszą (12). Dotychczasowe wyniki badań wskazują na specyficzną, komórkową ekspresję APLN w strukturach OUN, a poznanie dystrybucji receptorów APJ pozwoli na określenie jej funkcji.

Charakterystyka receptora APJ w strukturach OUN

Strukturę chemiczną i lokalizację genu kodującego receptor APJ zidentyfikowano na chromosomach 11 i 12 u człowieka. Wykazuje on podobieństwo do genu dla receptora angiotensyny 1 (AT₁) oraz genu dla receptora dopaminy (D2), co opisano w guzku węchowym (*tuberculum olfactorium*) oraz w jądrze ogoniastym (*nucleus caudatus*) i skorupie (*nucleus putamen*) u człowieka. Wyższy poziom APJ mRNA odnotowano w życiu płodowym niż u dorosłych osobników (11, 15, 16). Stosując techniki hybrydyzacji *in situ* i Northern blot przeanalizowano ekspresję APJ mRNA w mózgowiu człowieka i świni (11). Szczególnie wysoki poziom APJ mRNA występował w ciele modzelowatym (*corpus callosum*) u człowieka i w rdzeniu kręgowym (*medulla spinalis*) u świni. U myszy natomiast występował niski poziom receptora APJ w całym mózgowiu (12). Zaobserwowano także wyższy poziom APJ mRNA w istocie białej (*substantia alba*), w której lokalizują się wypustki neuronów i komórki glejowe, aniżeli w istocie szarej (*substantia grisea*), gdzie ciała neuronów i dojrzałe aksony nie wykazują ekspresji APJ mRNA. Dotychczasowe wyniki badań przemawiają za dystrybucją receptora APJ nie tylko w neuronach, ale także w komórkach glejowych, takich jak oligodendrocyty i astrocyty (11). Badania immunohistochemiczne *in vitro* przy użyciu poliklonalnego przeciwciała przeciwko receptorowi APJ wykazały ekspresję tego receptora w 95% neuronów i oligodendrocytów, a tylko w 5% astrocytów. Inny typ komórek glejowych OUN mikroglej nie zawierał ekspresji receptora APJ (1). W oligodendrocytach receptor APJ występował wspólnie z galaktosylceramidem (23). Stosując hybrydyzację *in situ* opisano wysoką zawartość APJ mRNA w dwóch jądrach podwzgórza (*nuclei hypothalami*): w jądrze nadwzrokowym (*nucleus supraopticus*) i w jądrze przykomorowym (*nuc-*

leus paraventricularis), w jądrach węchowych (*nuclei olfactorii*) oraz w szyszynce (*corpus pineale*) u szczura. Ponadto wykazano znaczącą ekspresję APJ mRNA w komórkach części przedniej (*pars anterior*) i części pośredniej przysadki mózgowej (*pars intermedia hypophysis*), zaś w płacie tylnym przysadki mózgowej (*neurohypophysis*) przedstawiono jego znikomą zawartość (3, 19). Przy pomocy podobnych metod badawczych stwierdzono na powierzchni międzymózgowia (*diencephalon*) człowieka i szczura obecność APJ mRNA i zasugerowano, że może on lokalizować się w wypustkach astrocytów tworzących powierzchnię graniczną błonę gęstą (13). Stosując podwójne immunoznakowanie dla markera astrocytarnego gęstego włókienkowego kwaśnego białka (glial fibrillary acidic protein – GFAP) oraz receptora APJ wykazano ich wewnątrzkomórkową kolokalizację (23). Znaczną ekspresję receptora APJ zaobserwowano w astrocytach, szczególnie w obszarach bogatych we włókna nerwowe, np. w ciele modzelowatym (*corpus callosum*) oraz w istocie białej rdzenia kręgowego (*substantia alba medulla spinalis*) (12). Obecność APJ mRNA wykazano w astrocytach pochodzących z hodowli pierwotnych mózgowi embrionów ludzkich i dorosłych małp (2).

Funkcje APLN i jej receptora

Apelina oddziałując przez specyficzny receptor transbłonowy APJ wpływa na prawidłowe funkcjonowanie wielu obszarów OUN u ssaków. Powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{+2} , co wykazano w badaniach *in vitro*. Dodanie APLN i jonów Ca^{+2} do neuronalnej hodowli prowadzi do wzrostu stężenia Ca^{+2} w komórkach. Na tej podstawie uważa się, że APLN odgrywa rolę w sygnalizacji podczas rozwoju OUN (1, 19). Sądzi się, że APLN może być uwalniana z zakończeń nerwowych wpływając na prawidłowe przewodnictwo synaptyczne (17). Ponadto apelina wykazuje działanie neuroprotektcyjne, zabezpieczając neurony przed nadmiernym wnikaniem jonów wapnia w celu ochrony tych komórek. Apelina-13 zabezpiecza mitochondria, zmniejszając ich potencjał błonowy, a zarazem uwalnianie cytochromu C i redukcję reactive oxygen species (ROS) oraz kaspaz. W ten sposób APLN przez swój receptor APJ wpływa zabezpieczająco na neurony, zmniejszając proces apoptozy (24). Ekspresja receptora APJ w astrocytach może wpływać na zabezpieczenia neuronów, ponieważ gęstą, wychytując nadmiar jonów Ca^{+2} z przestrzeni międzykomórkowej, stwarza odpowiednie środowisko dla komórek nerwowych. W oligodendrocytach APLN przez swój receptor może być włączona w proces mielinizacji włókien nerwowych (13). Dalsze badania pozwolą ustalić znaczenie tych białek w funkcjonowaniu komórek gęstych.

Badania *in vitro* przy użyciu pierwotnych hodowli neuronów NT2N hipokampa (*hippocampus*) ludzkiego i szczurzego wykazały, że APLN przy uszkodzeniu

receptora N-metylo-D-asparagianu (NMDA) ludzkim wirusem niedoboru odporności (human immunodeficiency virus – HIV-1) pobudza aktywność i przeżywalność neuronów. Działanie ligandu przez swoisty receptor może aktywować kinazy białkowe B, a tym samym endogenne szlaki, umożliwiając ochronę neuronów przy uszkodzeniu receptora NMDA. Na tej podstawie zasugerowano, że APLN jest potencjalnym autokrynowym neuroprotektorem (14). Jednakże niektórzy autorzy wskazują na możliwą rolę receptora APJ jako koreceptora dla wirusa HIV-1, co przemawia za włączeniem receptora w patogenezę zespołu nabytego braku odporności (5). Odmienne wyniki uzyskali inni badacze (1). Ponadto receptor APJ może być włączony rozwój demencji w AIDS (17).

Apelina może uczestniczyć w neuroendokrynowych mechanizmach regulacji drogi podwzgórzowo-przysadkowej (*tractus hypothalamohypophysialis*) (18). Kolokalizacja receptora APJ z wazopresyną i oksytocyną w neuronach jąder podwzgórza (*nuclei hypothalami*): w jądrze nadwzrokowym (*nucleus supraopticus*) i w jądrze przykomorowym (*nucleus paraventricularis*) wskazuje na włączenie APLN w regulację wydzielania obu tych neurohormonów, co zaobserwowano u laktujących szczurów i myszy (3, 9, 13). Wyższy poziom APLN w neuronach powodował spadek wydzielania wazopresyny przez komórki i odwrotnie, wskazując na sprzężenie zwrotne między tymi substancjami, co sugeruje, że APLN jest autoinhibitorem w tych neuronach (17). APLN tym samym reguluje diurezę i może pełnić funkcję w utrzymaniu homeostazy płynów ustrojowych (4, 20).

APLN kolokalizuje się także z hormonem adrenokortykotropowym (ACTH) w komórkach kortykotropowych oraz w nielicznych komórkach somatotropowych części przedniej przysadki mózgowej (*pars anterior hypophysis*). Wszystkie neuroanatomiczne i biologiczne dane pozwalają sugerować, że APLN moduluje wydzielanie ACTH, zależne od uwalniania hormonów kortykotropowych. Ponadto działa autokrynowo lub parakrynowo, jako potencjalny modulator wydzielania ACTH. Nie stwierdzono immunoreaktywności APLN w komórkach produkujących: lutropinę (LH), prolaktynę (PRL), folitropinę (FSH) oraz tyreotropinę (TSH). Badania Reuxa i wsp. dostarczają dowodów istnienia systemu apelinergicznego w przysadce mózgowej (*hypophysis*) dorosłego szczura. Taka lokalizacja zgodna jest z wysoką ekspresją preproapelininy mRNA w przysadce mózgowej (*hypophysis*) u tego gatunku zwierząt (19, 23). Obecność APJ mRNA w szyszynce (*corpus pineale*) pozwala przypuszczać, że APLN uczestniczy w regulacji rytmów okołodobowych i mechanizmie pobierania wody i jedzenia (4).

Lokalizacja APLN i jej receptora w OUN sugeruje neuroendokrynowe, neurotransmiterowe i neuromodulatorowe funkcje tego peptydu w zależności od miejsca występowania (18).

Piśmiennictwo

1. Choe W., Albright A., Sulcove J., Jaffer S., Hesselgesser J., Lavi E.: Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J. Neurovirol.* 2000, 6, 61-69.
2. Croitoru-Lamoury J., Guillemain G. J., Boussin F. D., Moggetti B., Gigout L. I., Chéret A.: Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: Evidence for a central role of TNF α and IFN γ in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia* 2003, 41, 354-370.
3. De Mota N., Lenkei Z., Llorens-Cortés C.: Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinol.* 2000, 72, 400-407.
4. De Mota N., Reaux-Le Goazigo A., El Messari S., Chartrel N., Roesch D., Dujardin C.: Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004, 101, 10464-10469.
5. Edinger A. L., Hoffman T. L., Sharron M., Lee B., Yi Y., Choe W.: An orphan coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 1998, 72, 7934-7940.
6. Habata Y., Fujii R., Hosoya M., Fukusumi S., Kawamata Y., Hinuma S.: Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1452, 25-35.
7. Hosoya M., Kawamata Y., Fukusumi S., Fujii R., Habata Y., Hinuma S.: Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 21061-21067.
8. Kawamata Y., Habata Y., Fukusumi S., Hosoya M., Fujii R., Hinuma S.: Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1538, 162-171.
9. Lee D. K., Cheng R., Nguyen T., Fan T., Kariyawasam A. P., Liu Y.: Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J. Neurochem.* 2000, 74, 34-41.
10. Lee H. J., Tomioka M., Takaki Y., Masumoto H., Saito T. C.: Molecular cloning and expression of aminopeptidase A isoforms from rat hippocampus. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1493, 273-278.
11. Matsumoto M., Hidaka K., Akiho H., Tada S., Okada M., Yamaguchi T.: Low stringency hybridization study of the dopamine D4 receptor revealed D4-like mRNA distribution of the orphan seven-transmembrane receptor, APJ, in human brain. *Neurosci. Lett.* 1996, 219, 119-122.
12. Medhurst A. D., Jennings C. A., Robbins M. J., Davis R. P., Ellis C., Winborn K. Y.: Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J. Neurochem.* 2003, 84, 1162-1172.
13. O'Carroll A. M., Selby T. L., Palkovits M., Lolait S. J.: Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1492, 72-80.
14. O'Donnell L. A., Agrawal A., Sabnekar P., Dichter M. A., Lynch D. R., Kolson D. L.: Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *J. Neurochem.* 2007, 102, 1905-1917.
15. O'Dowd B. F., Heiber M., Chan A., Heng H. H., Tsui L. C., Kennedy J. L.: A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993, 136, 355-360.
16. O'Dowd B. F., Nguyen T., Lynch K. R., Kolakowski L. F. Jr., Thompson M., Cheng R.: A novel gene codes for a putative G protein-coupled receptor with an abundant expression in brain. *FEBS Lett.* 1996, 394, 325-329.
17. Reaux A., De Mota N., Skultetyova I., Lenkei Z., El Messari S., Gallatz K.: Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* 2001, 77, 1085-1096.
18. Reaux A., Gallatz K., Palkovits M., Llorens-Cortés C.: Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 2002, 113, 653-662.
19. Reaux-Le Goazigo A., Alvear-Perez R., Zizzari P., Epelbaum J., Bluet-Pajot M. T., Llorens-Cortés C.: Cellular localization of apelin and its receptor in the anterior pituitary: evidence for a direct stimulatory action of apelin on ACTH release. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007, 292, E7-15.
20. Reaux-Le Goazigo A., Morinville A., Burlet A., Llorens-Cortés C., Beaudet A.: Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2004, 145, 4392-4400.
21. Strażyńska A., Bryl W., Hoffmann K., Pupek-Musialik D.: Apelina w patologii chorób sercowo-naczyniowych – aktualny stan wiedzy. *Arteria Hypertension* 2009, 13, 417-421.
22. Tatemoto K., Hosoya M., Habata Y., Fujii R., Kakegawa T., Zou M. X.: Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 251, 471-476.
23. Tobin V. A., Bull P. M., Arunachalam S., O'Carroll A., Ueta Y., Ludwig M.: The effects of apelin on the electrical activity of hypothalamic magnocellular vasopressin and oxytocin neurons and somato/dendritic peptide release. *Endocrinology* 2008, 149, 6136-6145.
24. Zeng X. J., Yu S. P., Zhang L., Wei L.: Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons. *Exp. Cell Res.* 2010, 316, 1773-1783.

Adres autora: dr Agata Wawrzyniak-Gacek, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: agata.wawrzyniak@up.lublin.pl