

HIPOKRETYNY (OREKSYNY) I RECEPTORY HIPOKRETYNOWE: STRUKTURA, ROZMIESZCZENIE I MOLEKULARNE PODŁOŻE DZIAŁANIA*

HIPOCRETINS (OREXINS) AND THEIR RECEPTORS: STRUCTURE,
LOCALIZATION AND MOLECULAR MECHANISMS OF ACTIONS

Kaja BIEGAŃSKA^{1,2**}, Anna URBAŃSKA^{1**}, Agata WOLDAN-TAMBOR²,
Jolanta B. ZAWILSKA^{1,2}

¹Instytut Biologii Medycznej PAN, ²Zakład Farmakodynamiki Uniwersytetu
Medycznego w Łodzi

Streszczenie: Hipokretyny (oreksyny) to zidentyfikowane w 1998 r. peptydy produkowane w neuronach podwzgórza. Uczestniczą one w regulacji różnorodnych zachowań, m.in. poszukiwania i przyjmowania pokarmu, czuwania i snu, reakcji na stres. Zaburzenia w ośrodkowej transmisji hipokretynowej leżą u podłoża narkolepsji. Postuluje się istotną rolę hipokretyn w regulacji bilansu energetycznego organizmu, osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, procesach uczenia się i zapamiętywania bodźców wpływających na układ nagrody. Hipokretyny wywierają różnorodne działania biologiczne przez pobudzenie specyficznych receptorów błonowych: Hcrtr-1 i Hcrtr-2 (OX₁ i OX₂), które należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G. Artykuł omawia budowę oraz występowanie hipokretyn i receptorów hipokretynowych, szlaki transdukcji sygnału, które są uruchamiane w wyniku ich pobudzenia, proapoptotyczne działanie peptydów w komórkach nowotworowych i nowo odkryty mechanizm leżący u jego podłoża.

Słowa kluczowe: hipokretyny, oreksyny, receptory hipokretynowe, Ca²⁺, cAMP, IP₃, kinazy MAP, apoptoza.

Abstract: Hypocretins, also known as orexins, are hypothalamic peptides that have been implicated in a variety of behaviors, e.g. food-seeking and feeding, arousal and sleep, reaction to stress. Disturbances in the central hypocretin neurotransmission are believed to underlie narcolepsy. It has also been postulated that hypocretins play an important role in the regulation of hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis, energy homeostasis, acquisition and learning of reward system-stimulating signals. Hypocretins exert their numerous actions by interacting with two membrane-bound, G protein-coupled receptors: Hcrtr-1 and Hcrtr-2 (OX₁ and OX₂). This review summarizes experimental data on structure and localization of hypocretins and hypocretin receptors, and signal transduction pathways triggered by their stimulation. Special emphasis is given to the proapoptotic activity of hypocretins in cancer cells, and the novel mechanisms whereby they trigger apoptosis.

Key words: hypocretins, orexins, hypocretin receptors, Ca²⁺, IP₃, cAMP, MAP kinases, apoptosis.

*Praca wykonana w ramach grantu PO1/2010/38 MNiSW (JBZ). **Autorzy w równym stopniu uczestniczyli w napisaniu pracy.

WSTĘP

W 1998 roku dwie grupy badawcze poszukując nowych cząsteczek sygnałowych odkryły hipokretyny (oreksyny). De Lecea i wsp. analizując ekspresję genów w podwzgórzu szczura wykazali, że jeden spośród 38 badanych mRNA koduje syntezę białka zbudowanego ze 130 reszt aminokwasowych (aa), które jest prekursorem dwóch nieznanymi wcześniej peptydów składających się z 33 aa i 28 aa. Ze względu na występowanie tych peptydów w bocznej części podwzgórza (*hypothalamus*) i ich podobieństwo strukturalne do hormonów z grupy inkretyn (*incretins*) – rodzina peptydów sekretyna/naczyniowoaktywny peptyd jelitowy/glukagon/polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową), a w szczególności do sekretyny, nadano im nazwę hipokretyny (*hypocretins*): hipokretyna-1 (Hcrt-1) i hipokretyna-2 (Hcrt-2), a białko prekursorowe nazwano preprohipokretyną [15]. Warto nadmienić, że ostatnio postuluje się, iż hipokretyny i sekretyna pomimo istotnych podobieństw w strukturze pierwszorzędowej mają jednak odmienne pochodzenie ewolucyjne [63]. Sakurai i wsp. poszukując endogennych ligandów receptorów sierocych wyizolowali z podwzgórza szczura dwa peptydy (33 aa i 28 aa), które pobudzały receptor HFGAN72, a po podaniu do komórek bocznych mózgu stymulowały pobieranie pokarmu. Peptydy te nazwano oreksynami (oreksyna A i oreksyna B) od *orexis* – greckiej nazwy apetytu [47]. Po ustaleniu struktury pierwszorzędowej hipokretyn i oreksyn okazało się, że hipokretyna-1 jest identyczna z oreksyną A, a hipokretyna-2 z oreksyną B. W piśmiennictwie używa się synonimicznie obu nazw peptydów.

Hipokretyny charakteryzują się działaniem plejotropowym. Uczestniczą w regulacji czuwania i snu pełniąc rolę czynnika podtrzymującego oraz konsolidującego stan czuwania i umożliwiającego prawidłowe, kontrolowane przejścia pomiędzy stanem czuwania a snem; hamują fazę REM snu [8, 39–41, 45]. Zaburzenia w ośrodkowej transmisji hipokretynowej leżą u podłoża narkolepsji [8, 40, 45]. U większości pacjentów cierpiących na narkolepsję stwierdzono bardzo niskie lub niewykrywalne stężenia hipokretyn w płynie mózgowo-rdzeniowym, a w badaniach *post mortem* obserwowano zanik neuronów hipokretynowych w mózgu, który jak się uważa jest wynikiem procesów autoimmunologicznych [6, 8, 40, 45]. U zwierząt objawy narkolepsji występowały na skutek uszkodzenia neuronów hipokretynowych w mózgu, wyciszenia genu kodującego syntezę preprohipokretyny, mutacji bądź wyłączenia genu kodującego syntezę receptora typu 2 dla hipokretyn [8, 40, 45]. Hipokretyny uczestniczą ponadto w regulacji zachowań poszukiwania i przyjmowania pokarmu, kontroli bilansu energetycznego organizmu, regulacji aktywności części współczulnej układu wegetatywnego oraz modulacji ośrodkowej transmisji monoaminergicznej i glutaminianergicznej [1, 8, 11, 16, 18, 38, 48, 56, 57, 61]. Ostatnie doniesienia mówią także o udziale neuronów hipokretynowych w procesach uczenia się i zapamiętywania bodźców wpływających na układ nagrody [5, 49]. Sugeruje się, że hipokretyny są zaangażowane w złożony proces powstawania uzależnień od środków psychoaktywnych (plastyczność neuronalna związana z uzależnieniami, zachowania poszukiwania związku uzależniającego –

reward-seeking behavior, utrwalanie „nagradzającego” działania substancji uzależniającej, powrót do nałogu po okresie abstynencji) [5, 49, 67]. Najnowsze prace wskazują na protekcyjne działanie hipokretyn w udarze niedokrwiennym mózgu [20, 29].

Postuluje się istotną rolę hipokretyn w regulacji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, a w szczególności sekrecji kortykotropiny – ACTH (ang. *adrenocorticotrophic hormon*) i hormonu uwalniającego kortykotropinę – CRF (ang. *corticotropin-releasing factor*) [25, 51]. Dane doświadczalne wskazują także na obwodowe działania hipokretyn, w tym wpływ na motorykę jelit, uwalnianie amin katecholowych z rdzenia nadnerczy, syntezę i sekrecję glikokortykosteroidów z kory nadnerczy, metabolizm lipidów w tkance tłuszczowej, sekrecję glukagonu i insuliny [21, 25, 26]. Na uwagę zasługują wyniki badań Kima i wsp., które wykazały, że hipokretyna-1 stymuluje proces angiogenezy [28].

BUDOWA HIPOKRETYN (OREKSYN)

Hipokretyny powstają w wyniku proteolizy preprohipokretyny, która u ssaków (człowiek, świnia, pies, mysz, szczur) składa się ze 130–131 aa, kury – 148 aa, żaby płatany (*Xenopus laevis*) – 124 aa [63]. U ryb długość łańcucha preprohipokretyny wykazuje duże różnice międzygatunkowe, np. u kolcobrzucha karłowatego (*Takifugu rubripes*) jest to 120 aa, u danio pręgowanego (*Danio rerio*) – 124 aa, u ryżówki japońskiej (*Oryzias latipes*) – 125 aa, u dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua*) – 143 aa, u płastugi zimowej (*Pleuronectes americanus*) – 159 aa [33, 63, 65]. Białko preprohipokretyny człowieka, przedstawione schematycznie na rycinie 1, zawiera 33-aminokwasową sekwencję sygnałową i trzy miejsca cięcia przez enzymy proteolityczne. Dwa z czterech możliwych produktów cięcia to hipokretyna-1 (aminokwasy 34–66) i hipokretyna-2 (aminokwasy 69–97) [63]. Gen preprohipokretyny występuje na chromosomie 17q21 człowieka, 11 myszy, 27 kury, 3 danio pręgowanego, 3 kolcobrzucha karłowatego. Budowa tego genu jest wysoce konserwatywna; w jego skład wchodzi dwa egzony, przy czym dłuższy egzon drugi zawiera sekwencje dla hipokretyny-1 i hipokretyny-2 [63]. Hipokretyny prawdopodobnie nie występują u bezkręgowców [48].

Regulacja ekspresji preprohipokretyny nadal pozostaje niejasna. Przypuszcza się, że w modulacji transkrypcji genu preprohipokretyny mogą uczestniczyć receptor jądrowy NR6A1 (ang. *nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1*) [54] i białko 3 wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu – IFGBP3 (ang. *insulin-like growth factor binding protein 3*) [23]. Wykazano, że ekspresja preprohipokretyny w podwzgórzu wzrastała pod wpływem neuroaktywnych hormonów steroidowych – dihydroepiandrosteronu i dihydrotestosteronu [36], w warunkach hipoglikemii, w okresie głodzenia i ujemnego bilansu energetycznego [1, 9, 10, 38]. Z drugiej zaś strony nasilenie syntezy hipokretyn obserwowano u szczurów karmionych dietą bogatą w tłuszcze i węglowodany [7, 64]. Wyniki ostatnich badań wskazują na to, że

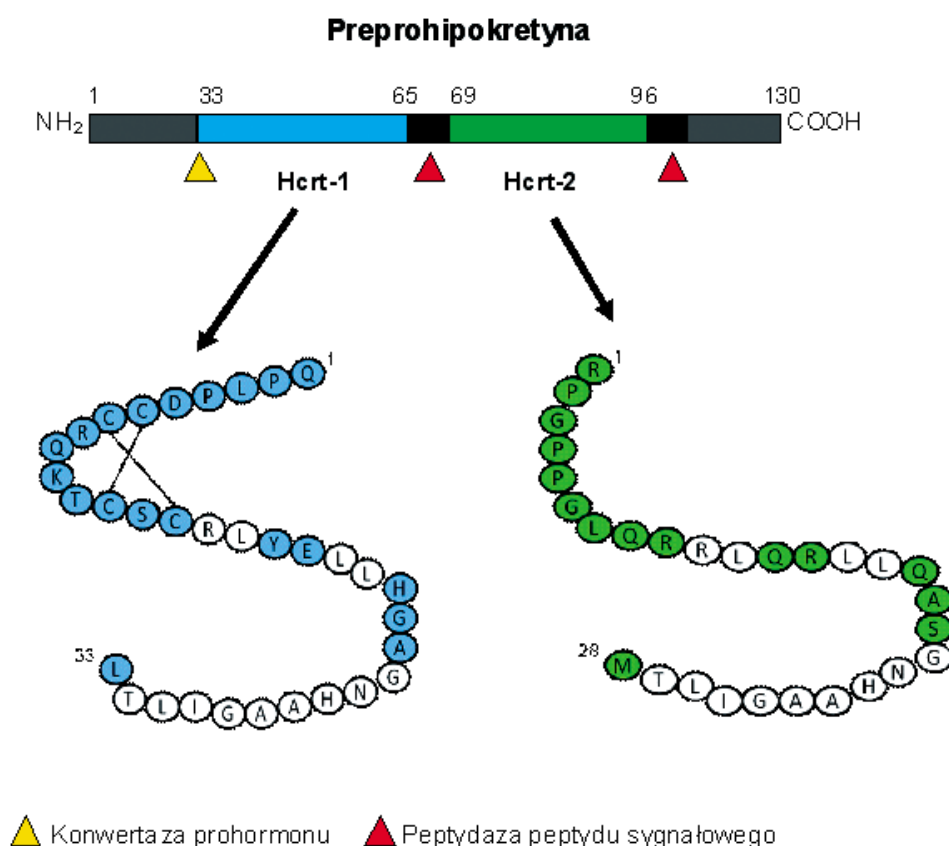
czynnik α martwicy nowotworów – TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*) może pełnić istotną rolę w regulacji układu hipokretynowego. Wykazano, że TNF- α nasilał degradację mRNA dla preprohipokretyny. Ponadto, TNF- α aktywując proces ubikwitynacji zależnej od komórkowych białkowych inhibitorów apoptozy wywoływał spadek poziomu białka receptora typu 2 dla hipokretyn [69].

Hipokretyny mają czternaście identycznych aa (46% homologii strukturalnej), przy czym największe podobieństwo (68%) występuje w obrębie C-końca peptydów (od Arg¹⁵ w hipokretynie-1 i Arg¹⁰ w hipokretynie-2), natomiast fragmenty N-końcowe (Pyr¹-Cys¹⁴ hipokretyny-1 i Arg¹-Gly⁹ hipokretyny-2) wykazują tylko 11% homologii strukturalnej [47, 63]. Hipokretyna-2 różnych gatunków kręgowców składa się z 28–29 aa, natomiast długość łańcucha hipokretyny-1 wykazuje znaczne różnice międzygatunkowe, w szczególności u przedstawicieli gromady ryb [33, 53, 63]. Tabela 1 przedstawia podobieństwo w budowie pierwszorzędowej pomiędzy hipokretynami a innymi peptydami należącymi do rodziny inkretyn, a tabela 2 – porównanie homologii strukturalnej hipokretyn u różnych gatunków kręgowców.

W czasie modyfikacji potranslacyjnych obie hipokretyny ulegają amidacji w obrębie C-końca. Ponadto, hipokretyna-1 ssaków ulega transaminacji w regionie N-końca, a w wyniku tego procesu powstaje cykliczny pyroglutamyl [63]. W obrębie cząsteczki hipokretyny-1 ssaków występują dwa mostki dwusiarczkowe utworzone pomiędzy Cys⁶-Cys¹² oraz Cys⁷-Cys¹⁴. Położenie reszt cysteinowych w obrębie łańcucha hipokretyny-1 żaby płatany jest zbliżone do tego opisanego dla peptydu ssaków. Z kolei u ryb odległość pomiędzy resztami cysteinowymi umożliwia powstanie tylko jednego mostka dwusiarczkowego [63]. Badania nad strukturą II-rzędową hipokretyn wskazują, że hipokretyna-2 tworzy dwie α -helisy (u człowieka helisa I: Leu⁷-Gly¹⁹ i helisa II: Ala²³-Met²⁸) połączone giętkim łącznikiem, natomiast hipokretyna-1 trzy α -helisy – jedną w obrębie N-końca (u człowieka Cys⁶-Gln⁹) i dwie we fragmencie C-końcowym połączone giętkim łącznikiem i ułożone względem siebie pod kątem 60–80° (u człowieka helisa I: Leu¹⁶-Ala²³ i helisa II: Asn²⁵-Thr³²) [53]. Podobne ułożenie przestrzenne łańcuchów hipokretyn opisano u dorsza atlantyckiego [65]. Przypuszcza się, że w wiązaniu do receptora hipokretynowego typu 1 kluczową rolę odgrywają fragmenty peptydów tworzące klastry hydrofobowe. W przypadku hipokretyny-1 człowieka są to: Leu¹⁶, Leu¹⁹, Leu²⁰, Gly²⁹, Ile³⁰, Leu³¹ i Thr³², a hipokretyny-2 człowieka: Leu¹¹, Leu¹⁴, Leu¹⁵, Gly²⁴, Ile²⁵, Leu²⁶ i Thr²⁷ [53].

WYSTĘPOWANIE HIPOKRETYN

Szacuje się, że w mózgu człowieka występuje 50 000–80 000 neuronów produkujących hipokretyny [48]. U ssaków (a także ptaków i gadów) lokalizacja perikarionów neuronów hipokretynowych jest w zasadzie ograniczona do bocznej części podwzgórza. Ich aksony tworzą jednakże szeroką sieć obejmującą rozległe obszary mózgu i rdzenia kręgowego. Najbardziej gęste unerwienie hipokretynowe zaobserwowano w tych rejonach mózgu, które uczestniczą w regulacji czuwania i



RYCINA 1. Schemat syntezy hipokretyn człowieka i ich budowy pierwszorzędowej. W wyniku cięcia białka prekursorowego, preprohipokretyny, przez peptydazę peptydu sygnałowego i pęcherzykową konwertazę prohormonu powstaje hipokretyna-1 (Hcrt-1) i hipokretyna-2 (Hcrt-2). Aminokwasy identyczne w obu peptydach są zaznaczone białymi kółkami. W cząsteczce Hcrt-1 występują dwa mostki dwusiarczkowe utworzone pomiędzy C⁶-C¹² oraz C⁷-C¹⁴, zmodyfikowano wg [18]

FIGURE 1. Synthesis and structure of human hypocretins. The precursor protein preprohypocretin is cleaved by a signal peptide peptidase and a vesicular prohormone convertase to give rise to hypocretin-1 (Hcrt-1) and hypocretin-2 (Hcrt-2). Common amino acids are indicated by lack of filling. Hypocretin-1 contains two intramolecular disulphide bonds (C⁶-C¹² oraz C⁷-C¹⁴), modified from [18]

snu oraz działania motywacyjnego, tj. neuronach: noradrenergicznych miejsca sinawego, histaminergicznych jądra guzowo-suteczkowatego, serotonergicznych jąder szwu i dopaminergicznych brzuszego pola nakrywki. Ponadto neurony hipokretynowe unerwiają cholinergiczne i niecholinergiczne neurony przodomózgowia i docierają do kory mózgowej [8, 30, 39, 48, 63]. Liczba neuronów hipokretynowych w mózgu zmniejsza się wraz z wiekiem [27]. Poza ośrodkowym układem nerwowym neurony hipokretynowe zidentyfikowano w narządach obwodowych (przewód pokarmowy) i gruczołach wydzielania wewnętrznego (trzustka, nadnercza, jądra, szyszynka) [30].

TABELA 2. Porównanie homologii strukturalnej hipokretyn u różnych kręgowców (wg [65])
 TABLE 2. Homology comparison between hypocretins in several vertebrate groups [65]

Stopień homologii struktury I-rzędowej hipokretyny								
	człowiek	mysz	kura	żaba płatana	danio pręgowany	ryżówka japońska	kolcobrzuch karłowaty	dorsz
Hipokretyna-1								
człowiek	100	100	92,5	83,0	34,0	43,4	52,8	34,0
mysz		100	92,5	83,0	34,0	43,4	52,8	34,0
kura			100	84,9	30,2	45,3	54,7	34,0
żaba płatana				100	30,2	50,9	50,9	32,1
danio pręgowany					100	30,2	37,7	35,8
ryżówka japońska						100	67,9	37,7
kolcobrzuch karłowaty							100	45,3
dorsz								100
Hipokretyna-2								
człowiek	100	92,9	89,3	75	53,6	51,9	50,0	42,9
mysz		100	96,4	67,9	50,0	48,1	46,4	42,9
kura			100	64,3	46,4	44,4	42,9	39,3
żaba płatana				100	50,0	51,9	60,7	53,6
danio pręgowany					100	66,7	67,9	60,7
ryżówka japońska						100	70,4	55,6
kolcobrzuch karłowaty							100	64,3
dorsz								100

Neurony hipokretynowe są pobudzane przez neurony glutaminianergiczne, cholinergiczne oraz neurony zawierające peptydy: wazopresynę, oksytocynę, neurotensynę, cholecystokininę, hormon uwalniający kortykotropinę i glukagonopodobny peptyd-1 – GPL-1 (ang. *glucagon-like peptide-1*). Z kolei neurony GABA-ergiczne, katecholaminergiczne, serotoninerdyczne, zawierające neuropeptyd Y lub leptynę hamują aktywność neuronów hipokretynowych [56].

RECEPTORY HIPOKRETYNOWE

Hipokretyny wywierają działania biologiczne poprzez specyficzne receptory błonowe. Sklonowano i opisano dwa receptory dla hipokretyn: receptor typu 1, Hcrtr-1 (OX_1) i receptor typu 2, Hcrtr-2 (OX_2). Hipokretyna-1 pobudza Hcrtr-1 w stężeniach nanomolowych, natomiast hipokretyna-2 ma do niego powinowactwo niższe o około 2 rzędy wielkości. Oba peptydy wykazują zbliżone powinowactwo

do Hcrtr-2 [47, 48]. Uważa się zatem, że Hcrtr-1 jest receptorem selektywnym dla hipokretyny-1, a Hcrtr-2 – receptorem nieselektywnym dla obu peptydów. U ryb występuje tylko jeden receptor dla hipokretyn, którego budowa jest zbliżona do Hcrtr-2 ssaków [10].

U człowieka geny kodujące receptory hipokretynowe występują na chromosomie 1 (Hcrtr-1) i chromosomie 6 (Hcrtr-2) i są zbudowane z siedmiu egzonów [63]. Z kolei u myszy *Hcrtr-1* składa się z 9 egzonów, a *Hcrtr-2* z 8 egzonów [63]. U obydwu gatunków stwierdzono obecność specyficznych tkankowo wariantów Hcrtr-2: 1A, 1B, 1C_{long} i 1C_{short} (człowiek), oraz α i β (mysz), które powstają w procesie alternatywnego składania [12, 13]. Transkrypty dla receptora 1B występują w różnych tkankach, ale ich obecności nie stwierdzono w nerkach i wątrobie. Ekspresja mRNA receptora typu 1A jest wysoka w mózgu, mięśniach szkieletowych, łożysku i jądrach. Wariant 1C_{short} ulega silnej ekspresji w mózgu, łożysku, trzustce i jądrach; nie występuje w mięśniach szkieletowych, płucach, wątrobie i sercu. Transkrypty dla receptora 1C_{long} ulegają ekspresji na wysokim poziomie w mózgu, łożysku, jądrach i trzustce; są nieobecne w mięśniach szkieletowych i nerkach [12].

Receptory dla hipokretyn należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G – GPCR (*G protein-coupled receptors*), do grupy β receptorów rodopsynowych. Do grupy tej należą również m.in. receptory dla takich peptydów, jak: neuropeptyd FF, neuropeptyd Y, cholecystokinina, neurotensyna, tachykinina, hormon tyreotropowy – TSH (ang. *thyroid stimulating hormone*), wazopresyna i oksytocyna [17]. Stopień homologii budowy pierwszorzędowej między Hcrtr-1 a Hcrtr-2 wynosi 64%, natomiast między receptorami hipokretynowymi a innymi receptorami z grupy β tylko 25–31% [30, 63]. Receptory hipokretynowe są wysoce konserwatywne u ssaków; ludzkie i szczerze są identyczne w 94% (Hcrtr-1) i 95% (Hcrtr-2) [8, 30, 63]. Dotychczas nie udało się zidentyfikować genów, które by kodowały syntezę receptorów typu 1 u innych gromad kręgowców niż ssaki. Przypuszcza się zatem, że Hcrtr-2 jest ewolucyjnie starszym receptorem niż Hcrtr-1 [63].

Przez analogię do innych receptorów GPCR uważa się, że łańcuchy białek Hcrtr-1 i Hcrtr-2 siedmiokrotnie przechodzą przez błonę komórkową, tworząc w obrębie błony siedem hydrofobowych α -helis (regiony transbłonowe – TM), połączonych naprzemiennie trzema pętlami zewnątrzkomórkowymi – ec1-ec3 (ang. *extracellular*) i trzema wewnątrzkomórkowymi – ic1-ic3 (ang. *intracellular*). Budowa pierwszorzędowa receptorów dla hipokretyn wykazuje kilka interesujących cech: wszystkie obszary TM, pętla ec1-ec3, ic1 i ic3 są wysoce konserwatywne. Z kolei ic2, N-końcowe i C-końcowe fragmenty białek obu receptorów wykazują mały stopień homologii. W obu typach receptorów w ec2 występują miejsca N-glikozylacji, w ic3 – miejsca fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową A – PKA (ang. *protein kinase A*), a w ic2 – miejsca fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową C – PKC (ang. *protein kinase C*) [61].

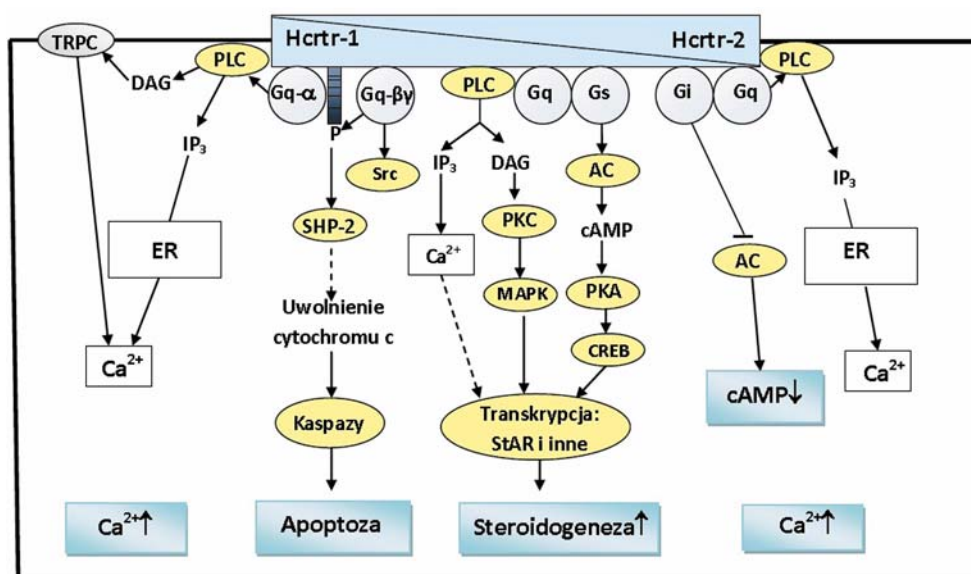
Oba typy receptorów hipokretynowych występują na wysokim poziomie w podwzgórzu. Ponadto, dużą gęstość Hcrtr-1 stwierdzono w grzbietowym jądrze szwu, przykomorowym jądrze wzgórza, obszarze CA1 i CA2 hipokampa, miejscu sinawym, przegrodzie i przysadce mózgowej, oraz w siatkówce. Hcrtr-2 zlokalizowano w guzku węchowym, warstwie VI komory mózgowej, jądrze

półożącym przegrody, obszarze CA3 hipokampa, grzbietowym jądrze szwu, mózdzku i przysadce mózgowej [8, 30]. Poza ośrodkowym układem nerwowym receptory hipokretynowe dotychczas wykryto w przewodzie pokarmowym, trzustce i nadnerczach [2, 14, 52].

Nasilenie ekspresji Hcrtr-2 obserwowano w łagodnym guzie gruczołu krokowego człowieka [34], a Hcrtr-1 w doświadczalnie indukowanych stanach patologicznych: niedokrwieniu mózgu wywołanym przez przejściowe zamknięcie tętnicy szyjnej [37], mechanicznym urazie mózgu [35] oraz w cukrzycy wywołanej przez streptozocynę [2]. W modelu urazowego uszkodzenia mózgu wzrost immunoreaktywności dla receptora typu 1 stwierdzano wokół miejsca uszkodzenia; początkowo w komórkach mikrogleju, a następnie również w neuronach [35]. W przypadku doświadczalnej cukrzycy stwierdzono korelację pomiędzy liczbą komórek w wyspkach Langerhansa, w których występowały Hcrtr-1 a liczbą komórek z aktywną formą kaspazy-3, markera apoptozy. Sugerowano zatem, że w przebiegu cukrzycy receptory hipokretynowe typu 1 są zaangażowane w apoptotyczną śmierć komórek produkujących insulinę [2].

MECHANIZMY TRANSDUKCJI SYGNAŁU URUCHAMIANE PRZEZ RECEPTORY HIPOKRETYNOWE

Wiedza nt. procesów wewnątrzkomórkowych uruchamianych przez receptory hipokretynowe jest stosunkowo wąska i pochodzi głównie z badań przeprowadzonych na heterologicznych liniach komórkowych, w których dokonano ekspresji cDNA dla ludzkiego Hcrtr-1 bądź Hcrtr-2. Najczęściej opisywanym efektem pobudzenia receptorów hipokretynowych jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych – $[Ca^{2+}]_i$. U podłoża tego zjawiska leżą dwa procesy: (1) pobudzenie szlaku białko Gq → fosfolipaza C typu β (PLC- β) → inozytolo(1,4,5)trisfosforan (IP_3) → uruchomienie Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej, (2) aktywacja błonowych kanałów kationowych TRPC3/6 (ang. *transient receptor potential channels*); wzrost $[Ca^{2+}]_i$ może być dodatkowo potęgowany przez dokomórkowy napływ Ca^{2+} [19, 32, 47, 55, 70]. Przypuszcza się, że kanały TRPC są pobudzane przez niskie stężenia hipokretyn, natomiast do aktywacji PLC- β dochodzi przy wyższych stężeniach peptydów [32]. Receptory hipokretynowe mogą, pobudzając różne białka G, hamować lub stymulować aktywność cykazy adenylowej [19, 22, 62, 68, 70]. W komórkach kory nadnerczy indukowany przez hipokretyny wzrost syntezy cAMP i aktywności PKA prowadzi do nasilenia produkcji i sekrecji glikokortykosteroidów [25, 51]. Hipokretyny oddziałując ze swoimi receptorami mogą także pobudzać szlak kinaz aktywowanych przez miotogeny – MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*), prowadząc do fosforylacji p38 i kinazy aktywowanej przez sygnały zewnątrzkomórkowe – ERK1/2 (ang. *extracellular regulated kinase*) [3, 19, 43, 44, 52, 70]. W aktywacji ERK1/2 wykazano udział szlaków Gq → PLC → kinaza białkowa C (PKC), Gs → cAMP → PKA oraz kaskady białka Gi/o, z dominującą rolą szlaku pierwszego. Do aktywacji p38 nie jest wymagane uruchomienie kaskady



RYCINA 2. Szlaki transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych związanych z pobudzeniem receptorów hipokretynowych: AC – cyklaza adenylanowa, cAMP – cykliczny 3',5'-adenozynotrifosforan, CREB – czynnik transkrypcyjny zależny od cAMP, IP₃ – inozytolo(1,4,5)trisfosforan, DAG – 1,2-diacyloglicerol, MAPK – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny, G – białko G, PKA – kinaza białkowa A; PKC – kinaza białkowa C, PLC – fosfolipaza C, SHP-2 – fosfatazy zawierające domeny SH2, Src – kinaza Src, StAR – białko regulujące steroidogenezę, ↑ – stymulacja/wzrost poziomu, ↓ – spadek poziomu. Indukowany hipokretynami wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych obserwowano w komórkach z rekombinowanym Hcrtr-1 oraz Hcrtr-2. Wywołaną hipokretynami apoptozę stwierdzono w nowotworowych komórkach jelita grubego, komórkach neuroblastomy i komórkach CHO z heterologiczną ekspresją Hcrtr-1. Pod wpływem hipokretyn obserwowano nasilenie syntezy glikokortykoidów w komórkach kory nadnerczy oraz testosteronu przez komórki Leydiga, wg [18], zmodyfikowano

FIGURE 2. Intracellular signal transduction pathways triggered by activation of hypocretin receptors: AC – adenyl cyclase, cAMP – adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, CREB – cAMP response element binding protein, DAG – 1,2-diaclyoglycerol, G – G protein, IP₃ – inositol(1,4,5)trisphosphate, MAPK – mitogen activated protein kinase, PKA – protein kinase A, PKC – protein kinase C, PLC – phospholipase C, SHP-2 – SH2 domain containing phosphatase 2; Src – kinase Src, StAR – steroidogenic acute regulatory protein, ↑ – stimulation/increased level, ↓ – decreased level. Increased intracellular level of calcium ions, induced by hypocretin stimulations, was observed in cells with recombinant Hcrtr-1 and Hcrtr-2. Hypocretins caused apoptosis in colon cancer cell lines, neuroblastoma cell lines and in CHO cells with heterological Hcrtr-1 expression. Hypocretins evoked intensification of glucocorticoids synthesis in adrenal gland corex cells and testosterone in Leydig cells. Modified from [18]

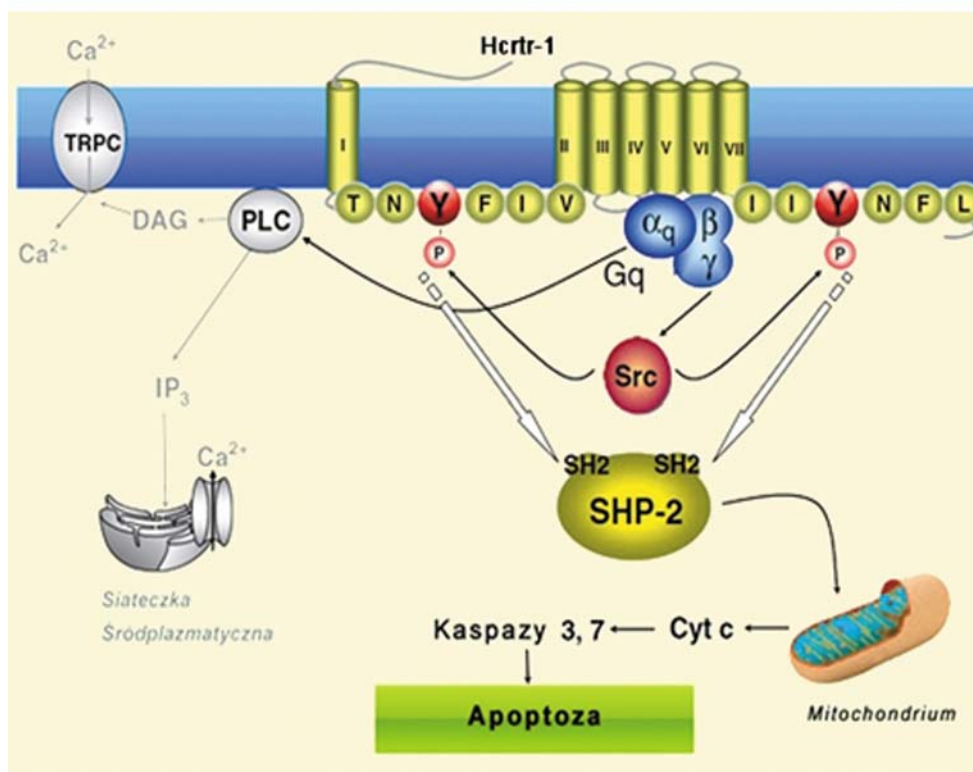
Gq → PLC → PKC, oraz wzrost aktywności PKA [55]. Wyniki najnowszych badań pokazały, że wywołana przez hipokretynę aktywacja ERK1/2 odgrywa istotną rolę w indukcji procesu angiogenezy komórek śródbłonna naczyniowego [28]. W wyniku pobudzenia receptorów hipokretynowych może ponadto dochodzić do aktywacji kinaz PKCδ, PKD1, PKD3; stymulacji fosfolipazy A₂ i uwalniania kwasu arachidonowego, oraz niezależnej od PLC-β produkcji monofosforanu inozytoli [22, 24, 42, 58]. Rycina 2 przedstawia najczęściej opisywane szlaki transdukcji sygnału aktywowane w wyniku pobudzenia Hcrtr-1 i Hcrtr-2.

Badania przeprowadzone na komórkach HEK 293 transfekowanych cDNA dla ludzkiego Hcrtr-1 wykazały, że pod wpływem hipokretyny-1 następowało zwiększenie ekspresji 260 genów oraz zmniejszenie ekspresji 64 genów [50]. W pierwszej grupie dominowały geny kodujące białka związane ze wzrostem komórki (30%), natomiast w drugiej – geny kodujące białka związane z międzykomórkowym przepływem informacji (16,6%). Hipokretyna zmieniała także stopień transkrypcji szeregu genów dla białek zaangażowanych w metabolizm komórkowy. Największe zmiany, kilkunastokrotny wzrost, obserwowano w przypadku genu HIF-1 α dla czynnika 1 α indukowanego hipoksją (ang. *hypoxia-inducible factor 1*). Ponadto, hipokretyna zmniejszała transkrypcję genu *VHL* (von Hippel-Lindau) – ligazy, która uczestniczy w procesie zależnej od ubikwityny proteosomalnej proteolizy białka HIF-1. Powyższe obserwacje są szczególnie interesujące w połączeniu z danymi pokazującymi, że w wyniku indukowanego przez hipokretynę wzrostu aktywności HIF-1 dochodzi do zwiększenia wychwytu glukozy do wnętrza komórek i ich większej aktywności glikolitycznej [50]. Sugeruje się, że nasilenie ekspresji HIF-1 może odgrywać istotną rolę w neuroprotekcijnym działaniu hipokretyny w udarze niedokrwiennym mózgu [66].

PROAPOPTOTYCZNE DZIAŁANIE HIPOKRETYN

Właściwości proapoptotyczne hipokretyn odkryto podczas badania potencjalnej zdolności peptydów występujących w przewodzie pokarmowym do hamowania wzrostu komórek linii HT29-D4 wywodzącej się z nowotworu jelita grubego człowieka. Dwa spośród przebadanych 26 peptydów, tj. hipokretyna-1 i hipokretyna-2, wywoływały apoptozę komórek. Po 1-2 dniach inkubacji obserwowano zmiany w obrazie komórek: stawały się one bardziej okrągłe i obkurczone, wykazywały typową dla apoptozy kondensację chromatyny i fragmentację jądra komórkowego na małe sferyczne cząstki, oraz przesunięcie cząsteczek fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej części błony komórkowej (eksternalizacja fosfatydyloseryny). Hipokretyny nie wpływały na cykl komórkowy i proliferację badanej linii komórkowej [46]. Analogiczne wyniki uzyskano w doświadczeniach przeprowadzonych na innych liniach komórkowych wywodzących się z nowotworu jelita grubego, w których potwierdzono obecność Hcrtr-1 (Caco-2, SW480, LoVo), komórkach linii SK-N-MC wywodzącej się z nerwiaka płodowego (neuroblastoma) człowieka, oraz linii AR42J komórek groniastych z trzustki szczura AR42J, w której występuje natywny Hcrtr-2 [46, 59, 60]. Hipokretyny nie indukowały apoptozy w prawidłowych komórkach śluzówki jelita grubego człowieka [46].

Badania przeprowadzone w laboratorium prof. Laburthe'a sugerują, że kluczową rolę w proapoptotycznym działaniu hipokretyn odgrywają dwa fragmenty w łańcuchu białka receptorowego zbudowane z 6 aa i zawierające tyrozynę: ITIM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based motif*; Ile-Ile-Tyr-Asn-Phe-Leu) i ITSM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*; Thr-Asn-Tyr-Phe-Ile-Val). ITIM i ITSM są zakonserwowanymi motywami receptorów komórek układu immunologicznego.



RYCINA 3. Schemat proapoptycznego działania hipokretyn: DAG – 1,2-diacyloglicerol, Cyt c – cytochrom c, IP₃ – inozytolo(1,4,5)trisfosforan, PLC – fosfolipaza C, Src – kinaza Src, SHP-2 – fosfatazy zawierające domeny SH2. Pozostałe wyjaśnienia w tekście, wg [31], zmodyfikowano

FIGURE 3. Proapoptotic action of hypocretins: DAG – 1,2-diaclyglycerol, Cyt c – cytochrome c, IP₃ – inositol(1,4,5)triphosphate, PLC – phospholipase C, Src – kinase Src, SHP-2 – phosphatase containing SH2 domains, for other explanations: see the text, modified from [31]

W Hcrtr-1 fragment ITIM znajduje się w trzeciej pętli cytoplazmatycznej (ic3) łączącej TMVII z C-końcem białka receptorowego. Z kolei fragment ITSM występuje w ic1, która łączy TMI z TMII. Pobudzenie Hcrtr-1 powoduje aktywację białka Gq i jego dysocjację na podjednostkę α i dimer $\beta\gamma$. Dimery $\beta\gamma$ aktywują kinazy Src (ang. *sarcoma*), które fosforylują reszty tyrozynowe w domenach ITIM i ITSM. Do ufosforylowanych reszt tyrozynowych przyłączają się fosfatazy zawierające domenę SH2 – SHP-2 (ang. *SH2 domain-containing phosphatase*), które ulegają aktywacji i uruchamiają kaskadę apoptotyczną z uwolnieniem z mitochondriów cytochromu c, a następnie aktywacją kaspazy 3 i kaspazy 7 (ryc. 3) [31, 59, 60]. Przyłączenie fosfatazy SHP-2 prowadzi ponadto do inaktywacji STAT-5 (ang. *signal transducer and activator of transcription 5*), a co za tym idzie do zmniejszenia ekspresji białek znajdujących się pod kontrolą STAT-5 (białek antyapoptotycznych, np. Bcl-X₁, kinazy serynowo-treoninowej Pim-1). Opisany powyżej proces aktywacji apoptozy przebiega niezależnie od indukowanego przez

hipokretyny wzrostu aktywności PLC i zwiększenia $[Ca^{2+}]_i$ [31, 59, 60]. Przypuszcza się, że w procesie apoptozy uruchamianej w wyniku pobudzenia receptorów hipokretynowych typu 1 mogą ponadto uczestniczyć kinazy p38, ERK1/2 i Akt/PKB (ang. *protein kinase B*) [4, 60].

PODSUMOWANIE

Hipokretyny należą do grupy neuropeptydów charakteryzujących się działaniem plejotropowym. Dane doświadczalne o proapoptotycznej aktywności hipokretyn w stosunku do komórek nowotworowych oraz informacje nt. zmian poziomów hipokretyn i ekspresji receptorów hipokretynowych w stanach patologicznych mózgu (niedotlenienie/niedokrwienie, urazy mózgu) stwarzają płaszczyznę do poszukiwań nowych możliwości terapeutycznego wykorzystania ligandów receptorów hipokretynowych.

LITERATURA

- [1] ADAMANTIDIS A, DE LECEA L. The hypocretins as sensors for metabolism and arousal. *J Physiol* 2009; **587** (Pt 1): 33–40.
- [2] ADEGHATE E, FERNANDEZ-VABEZUBO M, HAMEED E, EL-HASASNA H, EL WASILA M, AB-BAS T, AL-RAMADI B. Orexin-1 receptor co-localizes with pancreatic hormones in islet cells and modulates the outcome of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *PLoS One* 2010; **5**: e8587.
- [3] AMMOUN S, JOHANSSON L, EKHOLOM ME, HOLMQVIST T, DANISAS, KORHONEN L, SERGE-EVA OA, HASS HL, ÅKERMAN KE, KUKKONEN JP. OX_1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca^{2+} influx in OX_1 receptor signaling. *Mol Endocrinol* 2006; **20**: 80–99.
- [4] AMMOUN S, LINDHOLM D, WOOT ZH, ÅKERMAN KE, KUKKONEN JP. G-protein-coupled OX_1 orexin/hcrtr-1 hypocretin receptors induce caspase-dependent and -independent cell death through p38 mitogen-/stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2006; **281**: 834–842.
- [5] ASTON-JONES G, SMITH RJ, MOORMAN DE, RICHARDSON KA. Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction. *Neuropharmacology* 2009; **56** Suppl 1: 112–121.
- [6] BAUMANN CR, KHATAMI R, WERTH E, BASSETTI CL. Hypocretin (orexin) deficiency predicts severe objective daytime sleepiness in narcolepsy with cataplexy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; **77**: 402–404.
- [7] BECK B, KOZAK R, MOAR KM, MERCER JG. Hypothalamic orexinergic peptides are overexpressed in Young Long-Evans rats after early life exposure to fat-rich diets. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **342**: 452–458.
- [8] BEREZIŃSKA M, ZAWILSKA JB. Hipokretyny – rola w regulacji rytmu sen-czuwanie i patogenezie narkolepsji. *Post Hig Med Dośw* 2007; **61**: 1–12.
- [9] BERTILE F, OUDART H, CRISCUOLO F, MAHO YL, RACLOT T. Hypothalamic gene expression in long-term fasted rats: relationship with body fat. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **303**: 1106–1113.
- [10] BUCKLEY C, MACDONALD EE, TUZIAK SM, VOLKOFF H. Molecular cloning and characterization of two putative appetite regulators in winter flounder (*Pleuronectes americanus*): Preprothyrotropin-releasing hormone (TRH) and preproorexin (OX). *Peptides* 2010; **31**: 1737–1747.
- [11] CARTER ME, BORG JS, DE LECEA L. The brain hypocretins and their receptors: mediators of allostatic arousal. *Curr Opin Pharmacol* 2009; **9**: 39–45.

- [12] CHEN J, RANDEVA HS. Genomic organization and regulation of the human orexin (hypocretin) receptor 2 gene: identification of alternative promoters. *Biochem J* 2010; **427**: 377–390.
- [13] CHEN J, KARTERIS E, COLLINS D, RANDEVA HS. Differential expression of mouse orexin receptor type-2 (OX2R) variants in the mouse brain. *Brain Res* 2006; **1103**: 20–24.
- [14] DALL'AGLIO C, PASCUCCI L, MARCATI F, GIONTELLA A, PEDINI V, CECCARELLI P. Immunohistochemical identification and localization of orexin A and orexin type 2 receptor in the horse gastrointestinal tract. *Res Vet Sci* 2009; **86**: 189–193.
- [15] DE LECEA L, KILDUFF TS, PEYRON C, GAO X, FOYE PE, DANIELSON PE, FUKUHARA C, BATTENBERG EL, GAUTVIK VT, BARTLETT FS 2nd, FRANKEL WN, VAN DEN POL AM, BLOOM FE, GAUTVIK KM, SUTCLIFFE JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 322–327.
- [16] ERIKSSON KS, SERGEEVA OA, HAAS HL, SELBACH O. Orexins/hypocretins and aminergic systems. *Acta Physiol (Oxford)* 2010; **198**: 163–175.
- [17] FREDRIKSSON R, LAGERSTRÖM MC, LUNDIN LG, SCHIÖTH HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; **63**: 1256–1272.
- [18] GATFIELD J, BRISBARA-ROCH C, JENCK F, BOSS C. Orexin receptor antagonists: a new concept in CNS disorders? *ChemMedChem* 2010; **5**: 1197–1214.
- [19] GOROJANKINA T, GREBERT D, SALESSE R, TANFIN Z, CAILLOL M. Study of orexins signal transduction pathways in rat olfactory mucosa and in olfactory sensory neurons-derived cell line Odora: multiple orexin signaling pathways. *Regul Pept* 2007; **141**: 73–85.
- [20] HARADA S, FUJITA-HAMABE W, TOKUYAMA S. Effect of orexin-A on post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage. *J Pharmacol Sci* 2010; **15**: 155–163.
- [21] HEINONEN MV, PURHONEN AK, MÄKELÄ KA, HERZIG KH. Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxford)* 2008; **192**: 471–485.
- [22] HOLMQVIST T, JOHANSSON L, ÖSTMAN M, AMMOUN S, KUKKONEN JP. OX₁ orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *J Biol Chem* 2005; **280**: 6570–6579.
- [23] HONDA M, ERIKSSON KS, ZHANG S, TANAKA S, LIN L, SALEHI A, HESLA PE, MAEHLER J, GAUS SE, YANAGISAWA M, SAKURAI T, TAHERI S, TSUCHIYA K, HONDA Y, MIGNOT E. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS ONE* 2009; **4**: e4254.
- [24] JOHANSSON L, EKHOLOM ME, KUKKONEN JP. Multiple phospholipase activation by OX₁ orexin/hypocretin receptors. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 1948–1956.
- [25] KAGERER SM, JÖHREN O. Interactions of orexins/hypocretins with adrenocortical functions. *Acta Physiol (Oxford)* 2010; **198**: 361–371.
- [26] KAGERER SM, EICHHOLZ C, JÖHREN O. Orexins/hypocretins increase the promoter activity of selective steroidogenic enzymes. *Peptides* 2011; **32**: 839–843.
- [27] KESSLER BA, STANLEY EM, FREDTICK-DUUS, FADEL J. Age-related loss of orexin-hypocretin neurons. *Neuroscience* 2011; **178**: 82–88.
- [28] KIM M-K, PARK H-J, KIM S-R, CHOI YK, SHIN HK, JEON J-H, JANG H-O, YUN I, BAE S-K, BAE M-K. Angiogenic role of orexin-A via the activation of extracellular signal-regulated kinase in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **403**: 59–65.
- [29] KITAMURA E, HAMADA J, KANAZAWA N, YONEKURA J, MASUDA R, SAKAI F, MOCHIZUKI H. The effect of orexin-A on the pathological mechanism in the rat focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 2010; **68**: 154–157.
- [30] KUKKONEN JP, HOLMQVIST T, AMMOUN S, ÅKERMAN KE. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol* 2002; **283**: C1567–1591.
- [31] LABURTHE M, VOISIN T, EL FIRAR A. Orexins/hypocretins and orexin receptors in apoptosis: a mini-review. *Acta Physiol (Oxford)* 2010; **198**: 393–402.
- [32] LOUHIVUORI LM, JANSSON L, NORDSTRÖM T, BART G, NÄSMAN J, ÅKERMAN KE. Selective interference with TRPC3/6 channels disrupts OX₁ receptor signaling via NCX and reveals a distinct calcium influx pathway. *Cell Calcium* 2010; **48**: 114–123.
- [33] MACDONALD EE, VOLKOFF H. Molecular cloning and characterization of preproorexin in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Gen Comp Endocrinol* 2010; **169**: 192–196.
- [34] MALENDOWICZ W, SZYSZKA M, ZIÓŁKOWSKA A, RUCIŃSKI M, KWIAS Z. Elevated expression of orexin receptor 2 (Hcrtr2) in benign prostatic hyperplasia is accompanied by lowered serum orexin A concentrations. *Int J Mol Med* 2011; **27**: 377–383.

- [35] MIHARA T, DOHI K, YOFU S, NAKAMACHI T, OHTAKI H, SHIODA S, ARUGA T. Expression and localization of the orexin-1 receptor (OX1R) after traumatic brain injury in mice. *J Mol Neurosci* 2011; **43**: 162–168.
- [36] MO Q, LU S, GARIPPA C, BROWSTEIN MJ, SIMON NG. Genome-wide analysis of DHEA- and DHT-induced gene expression in mouse hypothalamus and hippocampus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; **114**: 135–143.
- [37] NAKAMACHI T, ENDO S, OHTAKI H, YIN L, KENJI D, KUDO Y, FUNAHASHI H, MATSUDA K, SHIODA S. Orexin-1 receptor expression after global ischemia in mice. *Regul Pept* 2005; **126**: 49–54.
- [38] NAKAMACHI T, MATSUDA K, MARUYAMA K, MIURA T, UCHIYAMA M, FUNAHASHI H, SAKURAI T, SHIODA S. Regulation by orexin of feeding behaviour and locomotor activity in the goldfish. *J Neuroendocrinol* 2006; **18**: 290–297.
- [39] NISHINO S. The hypothalamic peptidergic system, hypocretin/orexin and vigilance control. *Neuropeptides* 2007; **41**: 117–133.
- [40] NISHINO S, OKURO M, KOTORII N, ANEGAWA E, ISHIMARU Y, MATSAMURA M, KANBAYASHI T. Hypocretin/orexin and narcolepsy: new basic and clinical insights. *Acta Physiol (Oxford)* 2010; **198**: 209–222.
- [41] OHNO K, SAKURAI T. Orexin neuronal circuitry: role in regulation of sleep and wakefulness. *Front Neuroendocrinol* 2008; **29**: 70–87.
- [42] PELTONEN HM, ÅKERMAN KE, BART G. A role for PKD1 and PKD3 activation in modulation of calcium oscillations induced by orexin receptor 1 stimulation. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1803**: 1206–1212.
- [43] RAMANJANEYA M, CONNER AC, CHEN J, STANFIELD PR, RANDEVA HS. Orexins stimulate steroidogenic acute regulatory protein expression through multiple signaling pathways in human adrenal H295R cells. *Endocrinology* 2008; **149**: 4106–4115.
- [44] RAMANJANEYA M, CONNER AC, CHEN J, KUMAR P, BROWN JE, JÖHREN O, LEHNERT H, STANFIELD PR, RANDEVA HS. Orexin-stimulated MAP kinase cascades are activated through multiple G-protein signalling pathways in human H295R adrenocortical cells: diverse roles for orexins A and B. *J Endocrinol* 2009; **202**: 249–261.
- [45] RITCHIE C, OKURO M, KANBAYASHI T, NISHINO S. Hypocretin ligand deficiency in narcolepsy: recent basic and clinical insights. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2010; **10**: 180–189.
- [46] ROUET-BENZINBED P, ROUYER-FESSARD C, JARRY A, AVONDO V, POUZET C, YANAGISAWA M, LABOISSE C, LABURTHE M, VOISIN T. Orexins acting at native OX₁ receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX₁ receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 45875–45886.
- [47] SAKURAI T, AMEMIYA A, ISHII M, MATSUZAKI I, CHEMELLI RM, TANAKA H, WILLIAMS SC, RICHARDSON JA, KOZLOWSKI GP, WILSON S, ARCH JR, BUCKINGHAM RE, HAYNES AC, CARR SA, ANNAN RS, McNULTY DE, LIU WS, TERRETT JA, ELSHOURBAGY NA, BERGSMADJ, YANAGISAWA M: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; **92**: 573–585.
- [48] SCAMMELL T, WINROW CJ. Orexin receptors: Pharmacology and therapeutic opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; **51**: 243–266.
- [49] SHARF R, SARHAN M, DILEONE RJ. Role of orexin/hypocretin in dependence and addiction. *Brain Res* 2010; **1314**: 130–138.
- [50] SIKDER D, KODADEK T. The neurohormone orexin stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity. *Gen Dev* 2007; **21**: 2995–3005.
- [51] SPINAZZI R, ANDREIS PG, ROSSI GP, NUSSDORFER GG. Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 46–57.
- [52] SPINAZZI R, ZIOLKOWSKA A, NERI G, NOWAK M, REBUFFAT P, NUSSDORFER GC, ANDREIS PG, MALENDOWICZ LK. Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med* 2005; **15**: 847–852.
- [53] TAKAI T, TAKAYA T, NAKANO M, AKUTSU H, NAKAGAWA A, AIMOTO S, NAGAI K, IKEGAMI T. Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *J Pept Sci* 2006; **12**: 443–454.

- [54] TANAKA S, KODAMA T, NONAKA T, TOYODA H, ARAI H, FUKAZAWA M, HONDA Y, HONDA Y, MIGNOT E. Transcriptional regulation of the hypocretin/orexin gene by NR6A1. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **403**: 178–183.
- [55] TANG J, CHEN J, RAMANJANEYA M, PUNN A, CONNER AC, RANDEVA HS. The signaling profile of recombinant human orexin-2 receptor. *Cell Sign* 2008; **20**: 1651–1661.
- [56] TSUJINO N, SAKURAI T. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev* 2009; **61**: 162–176.
- [57] TSUNEKI H, WADA T, SASAOKA T. Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis. *Acta Physiol (Oxford)* 2010; **198**: 335–348.
- [58] TURUNEN PM, EKHOLM ME, SOMERHARJU P, KUKKONEN JP. Arachidonic acid release mediated by OX₁ orexin receptors. *Br J Pharmacol* 2010; **159**: 212–221.
- [59] VOISIN T, EL FIRAR A, AVONDO V, LABURTHE M. Orexin-induced apoptosis: the key role of seven-transmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology* 2006; **147**: 4977–4984.
- [60] VOISIN T, EL FIRAR A, ROUYER-FESSARD C, GRATIO V, LABURTHE M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. *FASEB J* 2008; **22**: 1993–2002.
- [61] VOISIN T, ROUET-BENZINEB P, REUTER N, LABURTHE M. Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60**: 72–87.
- [62] WOLDAN-TAMBOR A, BIEGAŃSKA K, WIKTOROWSKA-OWCZAREK A, ZAWILSKA JB. Activation of orexin/hypocretin type 1-like receptors stimulates cAMP synthesis in primary cultures of rat astrocytes. *Pharmacol Rep* 2011 (w druku).
- [63] WONG KKY, NG SYL, LWW LTO, NG HKH, CHOW BKC. Orexins and their receptors from fish to mammals: a comparative approach. *Gen Comp Endocrinol* 2011; **171**: 124–130.
- [64] WORTLEY KE, CHANG G-Q, DAVYDOVA Z, LEIBOWITZ SF. Orexin gene expression is increased during states of hypertriglyceridemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **284**: R1454–1465.
- [65] XU M, VOLKOFF H. Molecular characterization of prepro-orexin in Atlantic cod (*Gadus morhua*): Cloning, localization, developmental profile and role in food intake regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2007; **271**: 28–37.
- [66] YUAN LB, DONG HL, ZHANG HP, ZHAO RN, GONG G, CHEN XM, ZHANG LN, XIONG L. Neuroprotective effect of orexin-A is mediated by an increase of hypoxia-inducible factor-1 activity in rat. *Anesthesiology* 2011; **114**: 340–354.
- [67] ZAWILSKA JB, BIEGAŃSKA K, MILANOWSKA M, WOLDAN-TAMBOR A. Hipokretyny (oreksyny) – rola w uzależnieniach od substancji psychoaktywnych. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia* 2010; **5**: 1–9.
- [68] ZAWILSKA JB, URBAŃSKA A, ANDRZEJCZAK D, WOLDAN-TAMBOR A. In search of signal transduction systems activated by hypocretins. Part I: cortical neurons. *Acta Biochim Pol* 2009; **56** (suppl. 3): 148.
- [69] ZHAN S, CAI G-Q, ZHENG A, WANG Y, JIA J, FANG H, YANG Y, HU M, DING Q. Tumor necrosis factor-alpha regulates the hypocretin system via mRNA degradation and ubiquitination. *Bioch Biophys Acta* 2010; doi: 10.1016/j.bbadis.2010.11.003
- [70] ZHU Y, MIWA Y, YAMANAKA A, YADA T, SHIBAHARA M, ABE Y, SAKURAI T, GOTO K. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-protein. *J Pharmacol Sci* 2003; **92**: 259–266.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 28.02.2011 r.,

Przyjęto: 21.03.2011 r.

Prof. dr hab. Jolanta B. Zawilska;

Zakład Farmakodynamiki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1

e-mail: jolanta.zawilska@umed.lodz.pl