

FUNKCJA BIAŁKA I POLIMORFIZM GENU WISFATYNY U ZWIERZĄT GOSPODARSKICH*

Urszula Kaczor¹, Magdalena Jurkowska¹, Mirosław Kucharski²,
Andrzej Kaczor³

¹Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Katedra Biotechnologii Zwierząt, ul. Rędzina 1b, 30-248 Kraków

²Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt,
al. Mickiewicza 24/28, 31-120 Kraków

³Instytut Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego, Zakład Systemów i Środowiska Produkcji,
32-083 Balice k. Krakowa

Tkanka tłuszczowa jest nie tylko magazynem energetycznym organizmu zwierzęcego, ale także miejscem wydzielania endokrynnego oraz źródłem adipocytokin, białek o wielokierunkowym działaniu. Adipokiny działają pośrednio lub bezpośrednio, kontrolując m.in. homeostazę energetyczną, homatopoezę, angiogenezę, metabolizm lipidowy i węglowodanowy czy reprodukcję. Do białek tych należą m.in. adiposyna, leptyna, adiponektyna, rezystyna, apelina, chemeryna oraz wisfatyna zyskujące coraz bardziej na znaczeniu w leczeniu chorób cywilizacyjnych. Niniejsza praca przedstawia informacje na temat funkcji białka i zmienności genu stosunkowo niedawno poznanej wisfatyny, o której wiadomo, że jest czynnikiem stymulującym różnicowanie limfocytów pre-B (ang. pre-B-colony enhancing-factor 1, PBEF1), a także posiada aktywność fosforybozylotransferazy nikotynamidu (NAMPT). Wisfatyna katalizuje ważną reakcję szlaku syntezy NAD: kondensację nikotynamidu oraz 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu (PRPP) do mononukleotydu nikotynamidowego. Jej nazwa jest związana z tkanką tłuszczową wisceralną (trzewną), gdzie jest wydzielana, ale obecnie wiadomo także, że występuje w szpiku kostnym, makrofagach, mięśniach szkieletowych oraz hepatocytach.

Słowa kluczowe: wisfatyna, funkcja, polimorfizm genetyczny

Wisfatyna to czynnik stymulujący kolonię limfocytów pre-B1 (PBEF1) oraz posiadający aktywność fosforybozylotransferazy nikotynamidu (NAMPT), dlatego też obie nazwy są stosowane w jej nazewnictwie. Wisfatyna jest to enzym opisany w literaturze przedmiotu jako cytokina i adipokina występujący w dwóch izoformach: iNampt (wewnątrzkomórkowej) i eNAMPT (zewnątrzkomórkowej). Zewnątrzkomórkowa forma peptydu została pierwotnie opisana jako cytokina (Samal

*Praca finansowana z działalności statutowej UR Kraków, DS 3242/KBZ/2017 i działalności statutowej IZ PIB, nr zadania 06-013.1.

i in., 1994). Struktura tego białka okazała się podobna do odkrytego w latach 60. XX w. enzymu fosforybozylotransferazy nikotynamidu (Namp1), uczestniczącego w przekształcaniu nikotynamidu w mononukleotyd nikotynamidowy (NMN). Jest on prekursorem NAD⁺, koenzymu biorącego udział w wielu reakcjach oksydoredukcyjnych, ścieżkach sygnałowych, syntezie cAMP i innych procesach. Wisfatyna jest także adipokiną o działaniu insulinomimetycznym, wydzielaną głównie z trzewnej tkanki tłuszczowej, choć dowiedziono jej obecności w innych tkankach, czyli szpiku kostnym, wątrobie, mięśniach, leukocytach oraz nerkach (Kitani i in., 2003; Samal i in., 1994). Jasińska i Pietruczuk (2010) analizując, czy PBEF1 wiąże się z receptorem insulinowym lub innym receptorem błonowym, sformułowały hipotezę, że wisfatyna nie tworzy z nim wiązania w tym samym aktywnym miejscu co insulina. Doświadczenie przeprowadzone na transgenicznym mysz Namp1^{-/-} udowodniło, że Namp1 wpływa na wydzielanie insuliny w komórkach β trzustki, biorąc udział w syntezie NAD (Revollo i in., 2007). Funkcję insulinomimetyczną wisfatyny potwierdzono także w badaniach na komórkach mezangialnych linii MC. Komórki te po stymulacji wisfatyną zwiększały wiązanie do błony komórkowej transportera glukozy GLUT-1, natomiast zastosowanie inhibitora Namp1 znosiło ten efekt. Zablockowanie ekspresji genu receptora wisfatyny hamowało pobór glukozy, co sugeruje poprawność obu mechanizmów działania wisfatyny (Song i in., 2008).

W licznych badaniach lepiej opisano i poznano proces wydzielania wewnątrzkomórkowej formy PBEF1, która wykazuje aktywność fosforybozylotransferazy nikotynamidu. U ludzi fosforybozylotransferaza nikotynamidu stymuluje dojrzewanie mięśni gładkich naczyń, reguluje ekspresję genów metabolizmu lipidów (van der Veer i in., 2005). Istnieje dodatnia korelacja między indeksem masy ciała oraz procentowym udziałem tłuszczu w organizmie człowieka a stężeniem tego białka (Berndt i in., 2005). Możliwe, że oddziałuje ona na organizm przez centralny układ nerwowy, ponieważ stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym zmienia się zależnie od koncentracji wisfatyny w osoczu (Hallschmid i in., 2009).

Wewnątrzkomórkowa PBEF1 katalizuje reakcję pomiędzy nikotynamidem i 5-fosforybozylo-1-pirofosforanem (PRPP), w wyniku czego powstaje w cytozolu mononukleotyd nikotynamidowy (NMN). NMN w obecności enzymu – Nmnat, łączy się z ATP, a produktem tej reakcji jest NAD⁺. Kofaktor NAD może być syntetyzowany *de novo* z tryptofanu lub odzyskiwany z nikotynamidu, produktu degradacji NAD wewnątrz komórek (Luk i in., 2008; Revollo i in., 2007). Namp1 ma zatem istotne znaczenie w procesie wytwarzania NAD, gdyż katalizuje reakcję limitującą szybkość jego syntezy z nikotynamidu. Zwiększenie stężenia białka powoduje wzrost stężenia NAD⁺. Namp1 wpływa na ekspresję genów, przez oddziaływanie na aktywność białek Sir2 – sirtuin tworzących rodzinę deacetylaz NAD⁺ zależnych ewolucyjnie konserwatywnych enzymów, których występowanie stwierdzono u wszystkich zbadanych organizmów eukariotycznych i wielu prokariotycznych. Sirtuiny, przez deacetylację czynników transkrypcyjnych, wpływają na metabolizm, różnicowanie komórek, odpowiedź na stres (Revollo i in., 2004).

Wisfatyna została również opisana jako cytokina, wydzielana przez aktywowane limfocyty szpikowe stymulujące powstawanie komórek pre-B, działających synergistycznie z interleukiną 7 (IL-7) i czynnikiem wzrostowym komórek pnia (SCF).

Zależność między wewnątrzkomórkową lokalizacją a stadium cyklu komórkowego sugeruje, że może ona wpływać na przebieg cyklu komórkowego i różnicowanie komórek. Przypuszcza się, że bierze ona udział w wielu procesach nowotworowych (Kitani i in., 2003). Zaobserwowano także, że wisfatyna w komórkach np. neutrofilii hamuje apoptozę, co może być związane z obniżaniem aktywności białek kaspazy 3 i 8 (Jia i in., 2004).

Budowa białka wisfatyny

Wisfatyna posiada dwa miejsca glikozylacji: w odcinku N-końcowym oraz C-końcowym łańcucha polipeptydowego. Większość białek ulegających sekrecji posiada N-końcową sekwencję sygnałową, o właściwościach hydrofobowych, której jednak nie zaobserwowano w wisfatynie (Li i in., 2012). Struktura białka PBEF1 jest wysoce konserwatywna, wykazano to, analizując jej strukturę u różnych gatunków należących do organizmów wyższych, a także u bakterii (Li i in., 2012). Sekwencja aminokwasowa wisfatyny u kur wykazuje 94,4% homologii z ludzką wisfatyną (NP_005737.1), 94,3% z bydlęcą (NP_001231070.1) i 88,5% wisfatyną zidentyfikowaną u ryby *Danio rerio* (XP_002661386.1) (www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/4201). Białko wisfatyna tworzy homodimery złożone z dwóch podobnych podjednostek. Kim i in. (2006), porównując miejsca aktywne wiążące substrat w genie wisfatyny, pomiędzy różnymi gatunkami zaczynając od kur, a kończąc na gąbkach, zaobserwowali wysoką homologię sekwencji aminokwasowej tego obszaru.

Lokalizacja komórkowa PBEF1

Brak N-końcowej sekwencji sygnałowej w białku PBEF1 sugeruje, że nie jest ona wydzielana z komórki na drodze klasycznej sekrecji przy udziale reticulum endoplazma tycznego i aparatu Golgiego. W medium pochodzonym z mysich adipocytów 3T3-L1 zaobserwowano obecność białka wisfatyny. W linii komórkowej 3T3-L1 w jądrze komórkowym, membranach, strukturach pęcherzykowych i mitochondriach nie wykazano obecności wisfatyny, wykluczając istnienie mechanizmu wydzielania PBEF1 z udziałem mikropęcherzyków. Tanaka i in. (2007) sugerują, że za transport tego białka odpowiedzialne są mechanizmy oparte na zmianach strukturalnych błony komórkowej lub istnieniu specyficznych transporterów. W badaniach prowadzonych na innych mysich liniach komórkowych PC-12 i Swiss 3T3 wykazano obecność PBEF1 zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym. Zaobserwowano także, że koncentracja białka w poszczególnych strukturach jest zależna od fazy wzrostu. W komórkach intensywnie proliferujących jest wyższa w jądrze komórkowym, natomiast przy braku stymulacji jądrowym czynnikiem wzrostu, wyższe stężenie osiąga w cytoplazmie (Kitani i in., 2003).

Gen *PBEF1*

Geny kodujące *PBEF1* u różnych gatunków mają zbliżoną budowę. Stopień homologii ludzkiego genu (NC_006088.3), z bydlęcym wynosi 84,6% (AC_000161.1), mysim 83% (NC_000078.6), a kurzym 84,4% (NC_000007.13 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). Gen wisfatyny u ludzi znajduje się na 7. chromosomie i zajmuje 34,7 kpz. Jest złożony z 11 eksonów i 10 intronów. Pierwszy ekson zawiera odcinek

5'UTR i klasyczną sekwencję sygnałową, a ostatni – 3'UTR posiada wielokrotny motyw TATT. Udowodniono obecność dwóch promotorów, a ich analiza wykazała, że jest możliwa zróżnicowana ekspresja tkankowo-specyficzna. Oba zawierają elementy regulatorowe zależnie od czynników chemicznych oraz hormonalnych, takich jak NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell), GR (ang. glucocorticoid receptor) oraz AP-1 (ang. activator protein 1) (Ognjanovic i in., 2001). Gen wisfatyny u kur zlokalizowany jest na chromosomie 1. Rozciąga się na przestrzeni około 29 kpz i podobnie jak u człowieka składa się z 11 eksonów. Wykazano, że sklonowanie odcinka promotora o długości 1 372 pz i usunięcie odcinka o długości 1 075 pz z końca 5' lub 297pz z końca 3' tylko częściowo ograniczyło aktywność białka, co świadczy o obecności licznych promotorów w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca startu transkrypcji (Li i in., 2012). W regionie 3'UTR nieulegającym translacji znajduje się wielokrotnie powtórzony motyw TATT charakterystyczny dla cytokin i onkogenów (Samal i in., 1994). Struktura mRNA nie zawiera jednak sekwencji sygnałowych, odpowiedzialnych za sekrecję białka: sekwencji liderowej i miejsca cięcia kaspazy 1 (Luk i in., 2008). W genie kodującym *PBEF1* brakuje też charakterystycznego motywu GPuGPuTTPyCAPy, który występuje u hematopoetycznych cytokin na końcu 5' (Ognjanovic i in., 2001).

Polimorfizm genu

W dostępnym piśmiennictwie spotykamy jedynie kilka prac dotyczących polimorfizmu w *locus* genu wisfatyny u zwierząt gospodarskich. Badania przeprowadzone na trzodzie chlewnej dotyczące polimorfizmu g. 669 T>C w intronie 9 wykazały, iż wpływa on na zawartość chudego mięsa i tłuszczu w tuszy. U wielkiej białej i landrace zaobserwowano także zależność pomiędzy wariantem genu a dziennymi przyrostami masy ciała (Zrůstová i in., 2009). U mieszańców dzik \times meishan zidentyfikowano dwie niesprzężone ze sobą zmiany polimorficzne AM999341: g.669T>C w 9 intronie i oraz FN392209: g.358A>G) w sekwencji promotorowej. Oba polimorfizmy wykazywały związek m.in. ze wzrostem, umięśnieniem, otluszczeniem oraz jakością mięsa świń (Cepica i in., 2010). U chińskich lokalnych ras świń zaobserwowano, że zmienność w genie wisfatyny, tj. insercja o długości 35 pz opisana jako g. 381–415 w eksonie 4 wpływała na cechy tuczne zwierząt (masa ciała, przyrostyienne masy ciała). Osobniki obarczone insercją w obu allelach charakteryzowały się wyższą masą i przyrostami w pierwszych 6 miesiącach życia. Po szóstym miesiącu obserwowano odwrotną tendencję (Wang i in., 2009). Natomiast 6 nukleotydomowa delecja g. 19767-19774 (TAAAAA) w intronie 5 wpływała istotnie na obniżenie wartości przyrostów i niższą masę ciała. Nie zaobserwowano zwierząt homozygotycznych pod względem tej zmiany polimorficznej, co może świadczyć o naturalnej eliminacji homozygot posiadających oba zmutowane allele, u których prawdopodobnie występowałby niedorozwój i problem ze wzrostem (Wang i in., 2012).

Dotychczasowy stan wiedzy na temat wpływu wisfatyny na organizm kury domowej jest ubogi. Wiadomo jedynie, że ulega ona ekspresji w tkance mięśniowej, przysadce, nerkach, śledzionie, międzymózgowiu, wątrobie i tkance tłuszczowej. Szczególnie wysoki poziom tego białka zaobserwowano w wątrobie

i mięśniach szkieletowych. Co więcej, jej wzmożoną nadekspresję obserwowano w tkankach starszych osobników. Ponadto, zasugerowano, że PBEF1 pełni funkcję miokiny, wpływającej na rozrost tkanki mięśniowej u kurcząt. Możliwe jest również, że odgrywa ona kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy energetycznej, poprzez udział w metabolizmie lipidów (Krzysik-Walker i in., 2008). Hipoteza znalazła potwierdzenie w nielicznych badaniach. U kur mieszańców ras gushi i anka wykazano obecność polimorfizmu c. 1433G>A (mutacja zmiany sensu) w eksonie 6 i stwierdzono jego związek z masą ciała, przy czym allel G korzystnie wpływał na wzrost kurcząt, a niekorzystnie na odkładanie tłuszczu (Han i in., 2011). U tych samych mieszańców homozygoty TT, identyfikowanych enzymem restrykcyjnym *XbaI* (cicha mutacja g.17873) w eksonie 7, wykazywały lepsze parametry użytkowości mięsnej na wczesnych etapach rozwoju (Han i in., 2010). Natomiast w badaniach własnych (dane niepublikowane) prowadzonych u brojlerów linii Ross 308, zmierzających do określenia wpływu polimorfizmu g.17873C>T na cechy użytkowości mięsnej ptaków, wykazano negatywny wpływ allelu T na masę ciała, masę nóg ptaków i przyrosty masy ciała, a także niektóre cechy jakości i tekstury mięsa. Kurczaki o genotypie TT przedstawiały wyraźnie niższą wartość użytkową w porównaniu z nosicielami allelu C. Ich mięso miało bardziej sponiętą teksturę i było mniej sprężyste.

Wisfatyna/PBEF/Nampt ma właściwości cytokiny, czynnika wzrostu i enzymu; zależnie od pochodzenia, stężenia oraz modelu doświadczalnego wykazuje różne funkcje biologiczne o odmiennym mechanizmie działania. Mimo rosnącej liczby opublikowanych wyników eksperymentów badawczych nadal istnieje szereg wątpliwości dotyczących jej funkcji i pozostaje nadal białkiem o kontrowersyjnym znaczeniu w rozwoju chorób towarzyszących otyłości.

Piśmiennictwo

- Berndt J., Klötting N., Kralisch S., Kovacs P., Fasshauer M., Schön MR., Stumvoll M., Blüher M. (2005). Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*, 54 (10): 2911–2916.
- Cepica S., Bartenschlager H., O'vilo C., Zrustova J., Masopust M., Fernandez A., Lopez A., Knoll A., Rohrer G.A., Snelling W.M., Geldermann H. (2010). Porcine NAMPT gene: search for polymorphism, mapping and association studies. *Anim. Genet.*, 41: 646–651.
- Hallschmid M., Randevara H., Tan BK., Kern W., Lehnert H. (2009). Relationship between cerebrospinal fluid visfatin (PBEF/Nampt) levels and adiposity in humans. *Diabetes*, 58 (3): 637–640.
- Han R.L., Lan X.Y., Zhang L.Z., Ren G., Jing Y.J., Li M.J., Zhang B., Zhao M., Guo Y.K., Kang X.T., Chen H. (2010). A novel single-nucleotide polymorphism of the *visfatin* gene and its associations with performance traits in the chicken. *J. App. Gen.*, 51 (1): 59–65.
- Han R.L., Li Z.J., Li M.J., Li J.Q., Lan X.Y., Sun G.R., Kang X.T., Chen H. (2011). Novel 9-bp indel in visfatin gene and its associations with chicken growth. *Br. Poultry Sci.*, 52 (1): 52–57.
- Jasińska A., Pietruczuk M. (2010). Adipocytokiny – białka o wielokierunkowym działaniu. *J. Lab. Diag.*, 46, 3: 331–338.

- Jia S.H., Li Y., Parodo J., Kapus A., Fan L., Rotstein O.D., Marshall J.C. (2004). Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J. Clin. Invest.*, 113 (9): 1318–1327.
- Kim M.K., Lee J.H., Kim H., Park S.J., Kim S.H., Kang G.B., Lee Y.S., Kim J.B., Kim K.K., Suh S.W., Eom S.H. (2006). Crystal structure of Visfatin/Pre-B Cell Colony-enhancing factor 1/Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer Agent FK-866. *J. Mol. Biol.*, 362 (1): 66–77.
- Kitani T., Okuno S., Fujisawa H. (2003). Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor I. *FEBS Letters*, 544 (1–3): 74–78.
- Krzysik-Walker S.M., Ocon-Grove O.M., Maddineni S.R., Hendricks G.L. 3rd, Ramachandran R. (2008). Is visfatin an adipokine or myokine? Evidence for greater visfatin expression in skeletal muscle than visceral fat in chickens. *Endocrinology*, 149 (4): 1543–1550.
- Li J., Meng F., Song C., Wang Y., Leung F.C. (2012). Characterization of chicken visfatin gene: cDNA cloning, tissue distribution, and promoter analysis. *Poultry Sci.*, 91 (11): 2885–2894.
- Luk T., Malam Z., Marshall J.C. (2008). Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *J. Leuk. Biol.*, 83 (4): 804–816.
- Ognjanovic S., Bao S., Yamamoto S.Y., Garibay-Tupas J., Samal B., Bryant-Greenwood G.D. (2001). Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J. Mol. Endocrinol.*, 26 (2): 107–117.
- Revollo J.R., Grimm A.A., Imai S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 279 (49): 50754–50763.
- Revollo J.R., Körner A., Mills K.F., Satoh A., Tao Wang T., Garten A., Dasgupta B., Sasaki Y., Wolberger C., Townsend R.R., Milbrandt J., Kiess W., Imai S. (2007). Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in β cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab.*, 6 (5): 363–375.
- Samal B., Sun Y., Stearns G., Xie C., Suggs S., McNiece I. (1994) Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.*, 14 (2): 1431–1437.
- Song H.K., Lee M.H., Kim B.K., Park Y.G., Ko G.J., Kang Y.S., Han J.Y., Han S.Y., Kim H.K., Cha D.R. (2008). Visfatin: a new player in mesangial cell physiology and diabetic nephropathy. *American J. Physiol. - Renal Physiology*, 295 (5): F1485–1494.
- Tanaka M., Nozaki M., Fukuhara A., Segawa K., Aoki N., Matsuda M., Komuro R., Shimomura I. (2007). Visfatin is released from 3T3-L1 adipocytes via a non-classical pathway. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 359 (2): 194–201.
- van der Veer E., Nong Z., O'Neil C., Urquhart B., Freeman D., Pickering J.G. (2005). Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation. *Circulation Research*, 97 (1): 25–34.
- Wang M., Yu H., Chen H., Lan X.Y., Zhang L.Z., Zhao M., Lai X.S., Wang X.L., Wang Y.K., Lei C.Z., Wang J.Q. (2009). Novel 35-bp insertion in Visfatin gene in Chinese cattle. *Mol. Biol.*, 43 (4): 557–561.
- Wang M., Zhang Y., Yu H., Lai X.S., Zhu J.L., Jiao J.Z., Lan X.Y., Lei C., Zhang L.Z., Chen H. (2012). Novel 6-bp deletion mutation in *visfatin* gene and its associations with birth weight and bodyweight in Chinese cattle. *J. Integr. Agric.*, 11 (8): 1327–1332.
- Zrůstová J., Knoll A., Urban T., Čepička S. (2009). The visfatin (NAMPT; PBEF1) gene polymorphisms and associations with meat performance traits in three pig breeds kept in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.*, 54 (10): 443–447.

URSZULA KACZOR, MAGDALENA JURKOWSKA, MIROSLAW KUCHARSKI,
ANDRZEJ KACZOR

Protein function and polymorphism of the visfatin gene in farm animals

SUMMARY

Adipose tissue is not only a depot of energy for animal bodies, but also the site of endocrine secretion as well as a source of the multifunctional proteins adipocytokines. Adipokines are acting directly or indirectly by regulating energy homeostasis, hematopoiesis, angiogenesis, lipid and carbohydrate metabolism, and reproduction. These proteins include adiponectin, leptin, resistin, apelin, chemerin as well as visfatin, which are becoming increasingly important in the treatment of lifestyle diseases. The present study provides information on protein function and variation of the recently identified visfatin gene, which is a pre-B-colony enhancing-factor (PBEF1) and possesses nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) activity. Visfatin catalyzes an important NAD synthesis pathway: the condensation of nicotinamide with 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate (PRPP) to yield nicotinamide mononucleotide. Its name is associated with visceral adipose tissue where it is expressed, but it is now known to occur also in bone marrow, macrophages, skeletal muscles, and hepatocytes.

Key words: visfatin, function, genetic polymorphism

