

Received: 2011.06.09  
Accepted: 2011.07.07  
Published: 2011.08.03

## Mechanizm aktywacji fosfolipazy C $\gamma$ 1\*

### The mechanism of phospholipase C $\gamma$ 1 activation

Paweł Krawczyk, Janusz Matuszyk

Laboratorium Białek Sygnalowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Fosfolipaza C jest enzymem, który katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PI(4,5)P<sub>2</sub>) z wytworzeniem dwóch wtórnych przekaźników sygnału: 1,4,5-trifosforanu inozytolo (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) oraz diacyloglicerolu (DAG). Przekazniki te aktywują kinazę białkową C (PKC) oraz uczestniczą w uwolnieniu jonów Ca<sup>2+</sup> z przestrzeni wewnątrzkomórkowych, wpływając tym samym na liczne procesy komórkowe w tym: proliferację, różnicowanie, przekaznictwo sygnałów, proces endocytozy, modelowanie cytoszkieletu oraz aktywację błonowych kanałów jonowych. Dotąd zidentyfikowano i opisano czternaście izoenzymów fosfolipazy C. Wśród izoenzymów PLC wyróżnić można fosfolipazę C $\gamma$ 1 i C $\gamma$ 2. Każda z nich zbudowana jest z domeny katalitycznej XY oraz kilku domen regulatorowych: PH, EF i C2. Cechą charakterystyczną enzymów z rodziny fosfolipaz C $\gamma$  jest występowanie w obrębie domeny katalitycznej XY tandemowych sekwencji Src: SH2, SH3 oraz rozdzielonej domeny PH. Fosfolipazy C $\gamma$ 1 i C $\gamma$ 2 mają identyczną strukturę domenową. Różnica dotyczy ich występowania oraz funkcji. PLC $\gamma$ 1 jest powszechnie występująca, a w szczególności wykazano jej występowanie w mózgu, grasicy i płucach.

Aktywacja PLC $\gamma$ 1 może przebiegać z udziałem: receptorowych kinaz tyrozynowych (np. PDGFR, EGFR, FGFR, Trk), niereceptorowych kinaz tyrozynowych (Src, Syk, Tec), bądź w obecności kwasu fosfatydowego, czy białka tau i jego analogu.

Molekularny mechanizm aktywacji fosfolipazy C $\gamma$ 1 w odpowiedzi na stymulację czynnikami wzrostu można podzielić na trzy zasadnicze etapy: rekrutacja enzymu do powierzchni błony komórkowej, fosforylacja PLC $\gamma$ 1 oraz zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu prowadzące do odblokowania centrum aktywnego.

Fosfolipaza C $\gamma$ 1 podlega pozytywnej i negatywnej regulacji. Pozytywnym modulatorem procesu jest trifosforan (3,4,5) fosfatydyloinozytolo (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Wśród negatywnych regulatorów wyróżniamy: kinazy białkowe (PKA, PKC), fosfatazy tyrozynowe (SHP-1, PTP-1B) i białka Cbl, Grb2 oraz kompleks Jak2/PTP-1B.

#### Słowa kluczowe:

**fosfolipaza C $\gamma$ 1 • mechanizm aktywacji fosfolipazy C $\gamma$ 1 • metabolizm fosfatydyloinozytolo • receptorowe kinazy tyrozynowe**

#### Summary

Phospholipase C is an enzyme which catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) into second messengers inositol-1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG). These messengers then promote the activation of protein kinase C and release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores, initiating numerous cellular events including proliferation, differentiation, signal transduction, endocytosis, cytoskeletal reorganization or activation of ion channels. There have been identified 14 isozymes of PLC among which PLC $\gamma$ 1 and PLC $\gamma$ 2 are

\* Praca finansowana z grantu MNiSW numer N N401 063636.

of particular interest. PLC $\gamma$  contains catalytic region XY and a few regulatory domains: PH, EF and C2. The most unique features of these two enzymes are the Src homology domains (SH2, SH3) and split PH domain within the catalytic barrel. PLC $\gamma$ 1 and PLC $\gamma$ 2 have an identical domain structure, but they differ in their function and occurrence. Phospholipase C $\gamma$ 1 is expressed ubiquitously, especially in the brain, thymus and lungs.

PLC $\gamma$ 1 can be activated by receptor tyrosine kinases (i.e.: PDGFR, EGFR, FGFR, Trk), as well as non-receptor protein kinases (Src, Syk, Tec) or phosphatidic acid, tau protein and its analogue.

The molecular mechanism of PLC $\gamma$ 1 activation includes membrane recruitment, phosphorylation, rearrangements and activation in the presence of growth factors.

In reference to PLC $\gamma$ 1 regulation, a number of positive and negative modulators have been considered. The most important positive modulator is phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P $_3$ ). Protein kinase A and C, tyrosine phosphatases (SHP-1, PTP-1B) and Cbl, Grb2, Jak2/PTP-1B complex proteins have been described as negative regulators of PLC $\gamma$ 1 activation.

**Key words:** phospholipase C $\gamma$ 1 • activation mechanism of phospholipase C $\gamma$ 1 • phosphoinositide metabolism • receptor tyrosine kinase

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=954782>

**Word count:** 2578

**Tables:** 2

**Figures:** 2

**References:** 59

**Adres autora:** dr hab. Janusz Matuszyk, prof. PAN, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirsfelda, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: matuszyk@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **aa** – aminokwas; **ADP** – adenozylo-5'-difosforan; **ATP** – adenozylo-5'-trifosforan; **C2** – domena regulatorowa oddziałująca z błoną lipidową; **Cbl** – ligaza ubikwityny; **cSH2** – domena SH2 umiejscowiona w fosfolipazie C $\gamma$  w kierunku C-końca w relacji do drugiej domeny SH2; **DAG** – diacyloglicerol; **EF** – domena wiążąca wapń; **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); **EGFR** – receptor EGF; **ErbB2 (HER2/neu)** – ludzki receptor nabłonkowego czynnika wzrostu 2 (human epidermal growth factor receptor 2); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **FGFR** – receptor FGF; **GH** – hormon wzrostu (growth hormone); **GHR** – receptor GH; **Grb2** – białko wiążące receptor czynnika wzrostu 2 (growth factor receptor-bound protein 2); **G $\alpha_q$**  – białko G oddziałujące z fosfolipazą C (guanine nucleotide-binding protein); **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); **Ins(1,4,5)P $_3$**  – trifosforan-1,4,5-inozytolu; **Jak2** – niereceptorowa kinaza tyrozynowa Janus (Janus kinase 2); **LTP** – długotrwałe wzmocnienie transmisji synaptycznej; **NGF** – czynnik wzrostu nerwów (nerve growth factor); **NIH 3T3** – linia komórkowa mysich fibroblastów; **NRTK** – niereceptorowe kinazy tyrozynowe; **nSH2** – domena SH2 umiejscowiona w fosfolipazie C $\gamma$  w kierunku N-końca w relacji do drugiej domeny SH2; **PDGF** – płytkowy czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **PDGFR** – receptor PDGF; **PH** – domena wiążąca plekstrynę; **PI(3,4)P $_2$**  – difosforan-3,4-fosfatydyloinozytolu; **PI(3,4,5)P $_3$**  – trifosforan-3,4,5-inozytolu; **PI(4,5)P $_2$**  – difosforan-4,5-fosfatydyloinozytolu; **PI3K** – kinaza-3-fosfatydyloinozytolu; **PI3P** – fosforan-3-inozytolu; **PKA** – kinaza białkowa A; **PKC** – kinaza białkowa C; **PLC** – fosfolipaza C; **PLC $\beta$**  – fosfolipaza C $\beta$ ; **PLC $\gamma$ 1** – fosfolipaza C $\gamma$ 1; **PLC $\gamma$ 2** – fosfolipaza C $\gamma$ 2; **PLC $\delta$**  – fosfolipaza C $\delta$ ; **PLC $\epsilon$**  – fosfolipaza C $\epsilon$ ; **PLC $\zeta$**  – fosfolipaza C $\zeta$ ; **PLC $\eta$**  – fosfolipaza C $\eta$ ; **P03-4** – reszta fosforanowa; **PTP-azy** – fosfatazy tyrozynowe; **PTP-1B** – fosfataza tyrozynowa 1B; **pTyr** – fosfotyrozyna; **Ras** – małe białko G; **RA1** – domena wiążąca białko Ras w PLC $\epsilon$ ; **RasGEF** – domena występująca w PLC $\epsilon$  (Ras-GTP-ase Exchange Factor-like domain); **RTK** – receptorowe kinazy tyrozynowe; **SH2** – domena wiążąca reszty fosfotyrozyny (Src homology 2); **SH3** – domena wiążąca sekwencje bogate w prolinę (Src homology 3); **SHP-1** – fosfataza tyrozynowa 1C (PTP-1C); **SLP-76** – białko adaptorowe; **spPH** – rozdzielona domena regulatorowa PH w PLC $\gamma$ 1; **Src** – niereceptorowa kinaza tyrozynowa Src; **Trk** – receptory o wysokim powinowactwie do neurotrofin; **Trk B** – receptor neurotrofiny pochodzenia mózgowego; **XY** – domena katalityczna w fosfolipazie C.

## WSTĘP

Błona komórkowa to bardzo aktywna metabolicznie struktura, stanowiąca barierę chroniącą przed czynnikami zewnętrznymi, w obrębie której zachodzi wiele istotnych dla komórki procesów warunkujących m.in. wzrost, czy różnicowanie. Składa się ona z komponentu białkowego oraz lipidowego, tworzącego podwójną warstwę lipidową, stąd też często nazywana jest półprzepuszczalną, płynną mozaiką białkowo-lipidową. Przemiany fosfolipidów w błonie komórkowej są źródłem powstawania cząsteczek sygnałowych, przekazujących informacje z otoczenia do wnętrza komórki. Kaskada przemian inicjowana hydrolizą fosfatydyloinozytoli w wewnętrznej warstwie błony plazmatycznej stanowi jeden z istotniejszych systemów przekazywania sygnałów w komórce, a enzymem regulującym ten proces jest fosfolipaza C [EC.3.1.4.11].

Fosfolipaza C to zależne od jonów  $Ca^{2+}$  rozpuszczalne białko cytosolowe, ulegające translokacji do powierzchni błony komórkowej, gdzie katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu ( $PI(4,5)P_2$ ) i prowadzi do powstania dwóch wtórnych przekazników sygnału, jakimi są: trifosforan-1,4,5-inozytoli ( $Ins(1,4,5)P_3$ ) oraz diacyloglicerol (DAG) [39].  $Ins(1,4,5)P_3$  powoduje uwolnienie jonów  $Ca^{2+}$  z przestrzeni wewnątrzkomórkowych, a także wpływa na regulację różnych procesów komórkowych, takich jak m.in. modelowanie cytoszkieletu, cytokineza [24], endocytoza [10,22,34], czy aktywacja błonowych kanałów jonowych zarówno sodowych jak i potasowych [48]. Fosfatydyloinozytol jest substratem zarówno dla fosfolipazy C, jak i kinazy fosfatydyloinozytoloowej (PI3K), która pełni wiele ważnych funkcji w komórkach prawidłowych, np. w procesach ich różnicowania, migracji, adhezji, czy przeżycia, a także przyczynia się do rozwoju chorób [27,58]. DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), regulującą procesy odczulania receptorów, transport cząsteczek, bądź jonów przez membrany oraz uwalniania neuroprzekazników [38]. W kontekście procesów zachodzących w komórce długotrwałe, PKC pełni istotną rolę w jej różnicowaniu, ruchliwości, przerzutowaniu nowotworów oraz w długotrwałej transmisji synaptycznej [5,54].

Badania nad fosfolipazą C sięgają lat 50 ubiegłego wieku. Wtedy właśnie na podstawie wstępnych eksperymentów poczynionych przez Hokin i wsp. [20], a następnie Michella i wsp. [35], stwierdzono, że fosfolipaza C jest głównym enzymem biorącym udział w procesie przekazywania sygnału w komórce zależnym od fosfatydyloinozytoli oraz wzrostu stężenia jonów  $Ca^{2+}$ . W późnych latach 80 ub.w. wyizolowano trzy izoformy fosfolipazy C:  $\beta$ ,  $\gamma$  oraz  $\delta$ , a także odkryto ich sekwencje cDNA. Jednocześnie zidentyfikowano wiele regulatorów PLC, takich jak np. białka G ( $G\alpha$ ), czy kinazy tyrozynowe [44]. Pozwoliło to kolejnym badaczom podjąć próbę scharakteryzowania mechanizmów regulatorowych będących pod kontrolą poszczególnych izoform fosfolipazy C.

Zidentyfikowano i opisano czternaście izoenzymów fosfolipazy C w komórkach ssaków, które w oparciu o ich strukturę, a także mechanizmy regulacji podzielono na sześć głównych grup:  $\beta$  (1-4),  $\gamma$  (1, 2),  $\delta$  (1, 2, 3, 4) oraz  $\epsilon$ ,  $\zeta$  i  $\eta$  (1, 2) (ryc.1) [50].

PLC $\beta$  występuje głównie w mózgu [49] i odgrywa znaczącą rolę w transporcie pęcherzykowym w aparacie Golgiego (PLC $\beta$ 3), przekazywaniu sygnałów synaptycznym, uczeniu się i zapamiętywaniu, a także percepcji smaku gorzkiego (PLC $\beta$ 2) [41]. Biologiczna rola fosfolipazy C $\gamma$  nie została jednoznacznie określona. Stwierdzono jej udział m.in. w szlakach sygnałowych limfocytów T (PLC $\gamma$ 1), różnicowaniu limfocytów B (PLC $\gamma$ 2), negatywnej regulacji apoptozy, krzepnięciu krwi oraz wroście i różnicowaniu neuronów [41]. PLC $\delta$  to najpowszechniej występujący izoenzym PLC w tkankach zwierzęcych. Umiejscowiony jest głównie w mięśniach szkieletowych, płucach, sercu i jądrach. Jest on niezbędny do prawidłowego rozwoju trofoblastów w łożysku (PLC $\delta$ 1/ $\delta$ 3), pełni istotną rolę w reakcji akrosomowej podczas zapłodnienia, zaś jego deficyt przyczynia się do powstawania stanu zapalnego skóry [49,50]. Fosfolipaza C $\epsilon$  bierze udział m.in. w organizacji cytoszkieletu, przekazywaniu sygnałowym zależnym od białek Ras, podwyższeniu stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w cytosolu, a w odniesieniu do całego organizmu zaobserwowano istotną rolę PLC $\epsilon$  w regulacji skurczu mięśni gładkich, rozwoju serca oraz kłębuszków nerkowych. PLC $\epsilon$  występuje w sercu, płucach oraz nerkach [49]. PLC $\zeta$  jest obecna w jądrach, PLC $\eta$  głównie w mózgu [49]. Fosfolipaza C $\zeta$  odgrywa ważną rolę w procesach zapłodnienia i embriogenezy kręgowców, natomiast PLC $\eta$  odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie neuronów [41,45,50].

Najstarszym filogenetycznie i najlepiej poznany izoenzym PLC jest fosfolipaza C $\delta$ . Szczegółowe badania jej struktury pozwoliły ustalić wspólny szkielet budowy wszystkich enzymów należących do rodziny PLC. Każdy z nich zbudowany jest z katalitycznych domen XY oraz domen regulatorowych. Wśród domen regulatorowych wyróżniono domeny: wiążące plekstrynę i oddziałujące z powierzchnią błony komórkowej (PH), wiążącą wapń (EF) oraz oddziałującą z błoną lipidową (C2). Domena EF umieszczona jest zaraz za domeną PH. Domena C2, znajdująca się na końcu C każdego izoenzymu PLC odpowiada za oddziaływanie z błoną lipidową, w wyniku czego enzym przybiera odpowiednią konformację przestrzenną w stosunku do substratu [12]. W domenie katalitycznej XY niektórych fosfolipaz C, m.in. w PLC $\delta$  znajdują się dwie histydyny ( $His^{311}$ ,  $His^{356}$ ), kwas glutaminowy ( $Glu^{341}$ ,  $Glu^{390}$ ) oraz kwas asparaginowy w pozycji 343 ( $Asp^{343}$ ). Pojedyncza cząsteczka jonu  $Ca^{2+}$  wiąże się do centrum domeny XY utworzonej przez:  $Glu^{341}$ ,  $Glu^{390}$  oraz  $Asp^{343}$  [13]. Modyfikacja którejkolwiek z reszt histydyny, bądź reszty kwasu glutaminowego  $Glu^{341}$  przyczynia się do całkowitej utraty aktywności enzymu [11].

Wśród izoenzymów PLC wyróżnić można fosfolipazę C $\gamma$ 1 o masie cząsteczkowej około 148 kDa oraz C $\gamma$ 2 (około 147 kDa), których aktywność regulowana jest m.in. przez receptorowe kinazy tyrozynowe [41]. Cechą charakterystyczną enzymów z rodziny fosfolipaz C $\gamma$  jest występowanie w obrębie domeny katalitycznej XY tandemowych sekwencji Src: SH2, SH3 oraz rozdzielonej domeny PH (split PH – spPH). Fosfolipazy C $\gamma$ 1 i C $\gamma$ 2 mają identyczną strukturę domenową. Różnica dotyczy ich występowania oraz funkcji.

Fosfolipaza C $\gamma$ 2 ulega ekspresji w komórkach hematopoetycznych i jej występowanie stwierdzono w płucach, śledzionie i grasicy [23]. Wykazano, że pełni ona ważną

funkcję w układzie odpornościowym, gdzie wspomaga rozwój limfocytów B [30].

PLC $\gamma$ 1 powszechnie występuje w tkankach ssaków [50]. Jej występowanie wykazano zwłaszcza w mózgu, grasicy i płucach. Najwyższym poziomem ekspresji PLC $\gamma$ 1 charakteryzują się oligodendrocyty oraz astrocyty w mózgu dorosłego szczura [49]. Ponadto zaobserwowano wzmożoną aktywność fosfolipazy C $\gamma$ 1 w komórkach nowotworowych raka sutka czy odbytu [56]. PLC $\gamma$ 1 jest aktywowana w odpowiedzi na stymulację czynnikami wzrostu i pełni ważną rolę w regulacji ruchliwości komórek nowotworowych [54]. Dowody na to, że PLC $\gamma$ 1 bierze udział w procesie nowotworzenia wynikają z serii eksperymentów przeprowadzonych na ludzkich liniach komórkowych *in vivo*, *in vitro* oraz *ex vivo*. Dwa spokrewnione ze sobą receptory: EGFR oraz ErbB2 (znany również jako neu bądź HER2) ulegają nadekspresji w komórkach nowotworowych [16] i wiążą PLC $\gamma$ 1 [55]. Zahamowanie aktywności PLC $\gamma$ 1 uniemożliwiało migrację komórek glejaka wielopostaciowego do zdrowych tkanek [30]. Podobne działanie zaobserwowano w przypadku komórek raka stercza [52], raka płaskokomórkowego pęcherza moczowego oraz raka piersi, których ekspansja zmniejszyła się po zastosowaniu inhibitorów PLC $\gamma$  [28,29]. Fosfolipaza C $\gamma$ 1 pełni ważną rolę w komórkach nerwowych. Na przykład fizjologiczne znaczenie ścieżki sygnałowej PLC $\gamma$  aktywowanej receptorem TrkB przeprowadzono na mysich mutantach, w których miejsce rekrutacji fosfolipazy C $\gamma$  w receptorze TrkB (Tyr<sup>816</sup>) zastąpiono fenyloalaniną. Homozygotyczne myszy z mutacją w miejscu Tyr<sup>816</sup> charakteryzowały się prawidłową żywotnością, lecz były nadpobudliwe w porównaniu z grupą kontrolną. Na podstawie dalszych eksperymentów wyjaśniono, że mutanty charakteryzowały się upośledzeniem w indukcji zarówno wczesnej, jak i późnej fazy długotrwałego wzmocnienia transmisji synaptycznej (LTP) hipokampa [36]. Wyniki te wskazują, że przekazywanie sygnałów pochodzących od PLC $\gamma$ 1 aktywowanej TrkB pełni istotną rolę w inicjacji i utrzymaniu LTP.

### CHARAKTERYSTYKA FOSFOLIPAZY C $\gamma$ 1

PLC $\gamma$ 1 ma sekwencje tandemowe znajdujące się w obrębie domeny katalitycznej XY. Są to domeny: SH2 (nSH2, znajdująca się na końcu N sekwencji tandemowych oraz cSH2, znajdująca się dalej w kierunku końca C), SH3 oraz rozdzielona domena PH (spPH).

W obrębie domeny SH2 dochodzi do oddziaływań z rejonami białek zawierającymi ufosforylowaną tyrozynę, zaś w domenie SH3 z fragmentami bogatymi w prolinę (motywy PXXP) [40]. Domena spPH zawiera sekwencje odpowiedzialne za autoinhibicję enzymu. Zaobserwowano, że C-końcowa część domeny spPH wiąże się bezpośrednio z kanałem wapniowym TRPC3 [57]. Funkcje domen SH2 i SH3 zostały zbadane przez Poulina i wsp. [43] poprzez ich inaktywację, a następnie ekspresję otrzymanych wariantów białek w pozbawionych PLC $\gamma$ 1 mysich fibroblastach. Ci sami badacze pięć lat później wykazali wewnętrzną interakcję między ufosforylowaną Tyr<sup>783</sup> i domeną cSH2, co w efekcie sprzyjało aktywacji fosfolipazy C $\gamma$ 1, wskazując na znaczącą rolę cSH2 w opisywanym procesie [42]. Badania Serrano i wsp. [47] dowodzą, że fosforylacja tyrozyny w pozycji 775 również wpływa na aktywację

PLC $\gamma$ 1, natomiast przeniesienie reszty fosforanowej na tyrozynę w pozycjach: 472, 771 i 1253 nie wpływa na mobilizację jonów Ca<sup>2+</sup>, a tym samym na aktywację szlaku sygnałowego PKC.

SLP-76 jest białkiem adaptorowym zaangażowanym w przekazywanie sygnałów przez receptory limfocytów T. Yablonski i wsp. [59] wykazali, że oddziaływanie między domeną SH3 PLC $\gamma$ 1 i białkiem adaptorowym SLP-76 sprzyja zwiększeniu stężeniu fosforylacji oraz aktywacji PLC $\gamma$ 1.

W przypadku domen regulatorowych PH, EF, czy C2 nie zaobserwowano znaczących różnic pod względem budowy w porównaniu do pozostałych izoenzymów fosfolipazy C. Niewiele wiadomo na temat ich roli w aktywacji PLC $\gamma$ 1, chociaż ostatnie badania wskazują na szczególnie udział PLC $\gamma$ 1 w reorganizacji cytoszkieletu poprzez oddziaływanie domeny PH fosfolipazy C $\gamma$ 1 z  $\beta$ -tubuliną [6].

Aktywacja PLC $\gamma$ 1 może przebiegać w sposób zależny od receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK) albo od nich niezależny z udziałem: niereceptorowych kinaz tyrozynowych (NRTK), kwasu fosfatydowego [25], kwasu arachidonowego i białka tau (w komórkach pochodzenia nerwowego) lub jego analogu (w komórkach nieneuronalnych) [21], co wskazuje na allosteryczny mechanizm regulacji enzymu.

### ANALIZA *IN SILICO* SEKWENCJI AMINOKWASOWYCH FOSFOLIPAZY C

Na podstawie przeprowadzonej analizy sekwencji aminokwasowych zaobserwowano, że sekwencja fosfolipazy C $\gamma$ 1 jest wysoce konserwatywna między różnymi gatunkami ssaków. W tabeli 1 porównano sekwencje aminokwasowe fosfolipazy C $\gamma$ 1 człowieka, myszy i szczura.

Wykazano 95% podobieństwo sekwencji aminokwasowych w przypadku porównania PLC $\gamma$ 1 człowieka i myszy. Homologia sekwencji aminokwasowych PLC $\gamma$ 1 człowieka i szczura wynosiła 96%, natomiast w przypadku PLC $\gamma$ 1 myszy i szczura zaobserwowano 98% podobieństwo sekwencji.

Ludzka fosfolipaza C $\gamma$ 1 jest zbudowana z 1290 aminokwasów, zaś PLC $\gamma$ 2 składa się z 1265 aminokwasów. W wyniku porównania sekwencji aminokwasowych fosfolipazy C $\gamma$ 1 oraz C $\gamma$ 2 u człowieka wykazano występowanie 49% sekwencji homologicznych.

W tabeli 2 zestawiono podobieństwo sekwencji poszczególnych domen fosfolipazy C $\gamma$ 1 i C $\gamma$ 2 u człowieka. Na podstawie przeprowadzonej analizy zauważono wysoki stopień homologii dla domeny katalitycznej X (77%), w obrębie której znajduje się fragment rozdzielonej domeny spPH. Podobieństwo sekwencji w przypadku domen SH2 wynosiło ponad 60%, a dla domeny SH3 59%. Wysoką homologię wykazano także dla domeny regulatorowej C2 (62%), aczkolwiek jej funkcję w odniesieniu do aktywności enzymu jeszcze nie poznano.

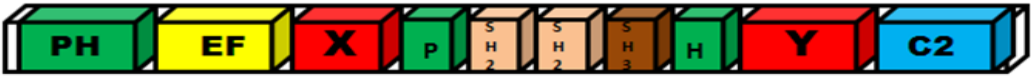
### AKTYWACJA FOSFOLIPAZY C $\gamma$ 1 W SPOSÓB ZALEŻNY OD RECEPTOROWYCH KINAZ TYROZYNOWYCH

Fosfolipazy C $\gamma$ 1 i C $\gamma$ 2 są jedynymi izoenzymami w rodzinie białek PLC aktywowanymi w odpowiedzi na czynnik wzrostu przez receptorowe kinazy tyrozynowe, m.in.

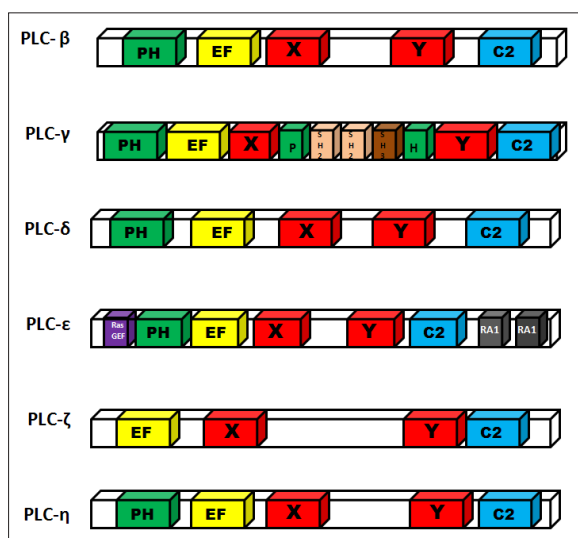
Tabela 1. Porównanie sekwencji aminokwasowych fosfolipazy Cγ1 człowieka, myszy i szczura

Gatunek	Długość [aa]	Gatunek	Długość [aa]	Homologia [%]
Człowiek	1290	Mysz	1302	95
Człowiek	1290	Szczur	1290	96
Mysz	1302	Szczur	1290	98

Tabela 2. Porównanie sekwencji aminokwasowych poszczególnych domen fosfolipazy Cγ1 oraz Cγ2 u człowieka



Enzym	Domena PH+EF		Domena X		Domena nSH2		Domena cSH2		Domena SH3		Domena Y		Domena C2	
	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia	długość [aa]	homologia
PLCγ1	111		145		98		83		57		118		106	
PLCγ2	117	53%	146	77%	104	62%	83	63%	57	59%	175	54%	106	62%



Ryc. 1. Domeny izoenzymów fosfolipazy (wg [15] zmodyfikowano)

przez: EGFR, PDGFR, FGFR, czy Trk [26]. Ponadto wyróżniono także trzy rodziny niereceptorowych kinaz tyrozynowych aktywujących PLCγ1: Src, Syk oraz Tec [59].

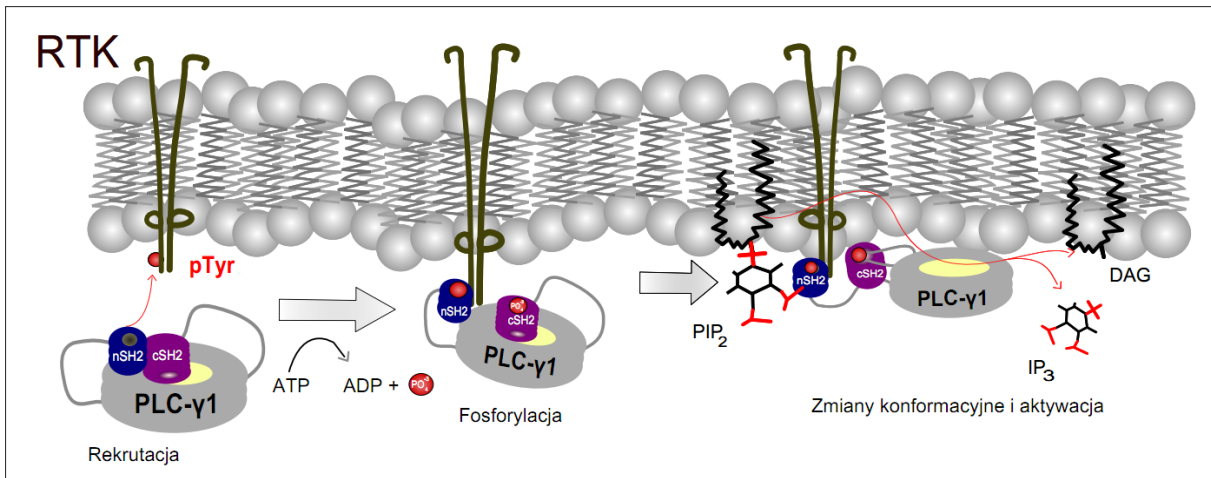
Aktywacja PLCγ1 przez RTK wymaga uprzedniej fosforylacji i aktywacji samej RTK, a także fosforylacji reszty Tyr w miejscu RTK wiążącym PLCγ1. Zastąpienie Tyr innym aminokwasem, np. fenyloalaniną (w sekwencji RTK w miejscu rekrutacji PLCγ1), zapobiega asocjacji PLCγ1 z RTK oraz skutkuje zahamowaniem wytwarzania trifosforanu inozytoli (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) przez komórki NIH 3T3. Mimo że mutacja miejsc fosforylacji Tyr<sup>1021</sup> w receptorze PDGF [53], Tyr<sup>785</sup> w receptorze NGF [33], czy Tyr<sup>766</sup> w receptorze FGF [37] zapobiega asocjacji fosfolipazy Cγ1 z RTK i wytwarzaniu Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> przez komórki, to jednak warianty receptorów z wprowadzonym miejscem mutacji wciąż pośredniczą w fosforylacji fosfolipazy Cγ1 zależnej od kinaz tyrozynowych.

Już na początku lat 90 ub.w. udowodniono, że fosforylacja fosfolipazy Cγ1 pod wpływem działania czynników wzrostu, takich jak PDGF i EGF zachodzi na resztach Tyr: 771, 783 oraz 1253 (w przypadku PLCγ1 pochodzącej od szczura) lub 1254 (w przypadku ludzkiej PLCγ1). Kolejne badania wykazały związek pomiędzy zwiększeniem stężenia fosforylacji enzymu i jego podwyższoną aktywnością. Na podstawie wyników badań Sekiya i wsp. [46] stwierdzono, że fosforylacja i późniejsza aktywacja PLCγ1 zależy od rodzaju komórek oraz stosowanego stymulatora. Przeniesienie reszty fosforanowej na Tyr<sup>1253</sup> nie wpływa na aktywność enzymu, a fosforylacja jedynie Tyr<sup>783</sup> jest niewystarczająca do pełnej aktywacji PLCγ1.

### MOLEKULARNY MECHANIZM AKTYWACJI FOSFOLIPAZY Cγ1

Molekularny mechanizm aktywacji fosfolipazy Cγ1 w odpowiedzi na stymulację czynnikami wzrostu można podzielić na trzy zasadnicze etapy: rekrutacja enzymu do powierzchni błony komórkowej, fosforylacja PLCγ1 oraz zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu prowadzące do odblokowania centrum aktywnego (ryc. 2).

W przypadku braku stymulatora domena katalityczna XY enzymu jest zablokowana przez domenę cSH2. Nieaktywny enzym nie jest związany z błoną komórkową i pozostaje w cytosolu. Następnym etapem aktywacji RTK jest przyłączenie się domeny nSH2 fosfolipazy Cγ1 do fosfotyrozyny w RTK, w wyniku czego następuje rekrutacja PLCγ1 z cytoplazmy do powierzchni błony. Dochodzi wówczas do katalizowanej przez RTK reakcji przeniesienia reszty fosforanowej z ATP na resztę Tyr<sup>783</sup> fosfolipazy Cγ1, znajdującej się między domenami cSH2 i SH3. Prowadzi to do połączenia domeny cSH2 z fosfotyrozyną w PLCγ1. Skutkiem tego są zmiany konformacji cząsteczki enzymu, w efekcie których następuje zniesienie inhibicyjnego wpływu domeny cSH2, odblokowanie centrum aktywnego, a następnie hydroliza PI(4,5)P<sub>2</sub> do Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> oraz DAG. Następnie enzym oddysocjowuje od powierzchni



Ryc. 2. Molekularny mechanizm aktywacji PLC $\gamma$ 1 ([18] zmodyfikowano)

blony i ulegając defosforylacji powraca do nieaktywnego stanu [18].

### REGULATORY PROCESU AKTYWACJI FOSFOLIPAZY C $\gamma$ 1

Fosfolipaza C $\gamma$ 1 podlega pozytywnej i negatywnej regulacji. Do pozytywnych modulatorów procesu aktywacji PLC $\gamma$ 1 należy trifosforan (3,4,5) fosfatydyloinozytolu (PI(3,4,5)P $_3$ ), a do negatywnych m.in.: kinazy białkowe fosforylujące reszty seryny i treoniny (PKA, PKC), fosfatazy tyrozynowe (PTP-azy: SHP-1, PTP-1B) i białka wiążące się z enzymem, takie jak: Cbl, Grb2, czy kompleks Jak2/PTP-1B.

PI3K fosforyluje grupę hydroksylową PI(4,5)P $_2$  w pozycji 3 pierścienia inozytowego w wyniku czego powstaje PI(3,4,5)P $_3$ , który następnie ulega defosforylacji do PI(3,4)P $_2$  oraz fosforanu inozytolu (PI3P). Występowanie PI(4,5)P $_2$  oraz PI(3,4,5)P $_3$  uzależnione jest m.in. od uprzedniej stymulacji komórek czynnikami wzrostu. PI(3,4)P $_2$ , a także PI(3,4,5)P $_3$  pełnią funkcje wewnątrzkomórkowych przekaźników sygnału. Błonowy fosfolipid PI(3,4,5)P $_3$  może wspomagać rekrutację PLC $\gamma$ 1 do błony komórkowej na skutek połączenia z N-kończącą domeną PH oraz cSH2 fosfolipazy C $\gamma$ 1 [3]. Dzięki temu PI(3,4,5)P $_3$  wpływa na przejściową kumulację jonów wapnia w komórce, co potwierdzili Bae i wsp. [4]. Stosując farmakologiczny inhibitor PI3K (LY294002) zaobserwowano prawie 40% spadek wytwarzania Ins(1,4,5)P $_3$  oraz kumulacji Ca $^{2+}$  w komórkach NIH 3T3 stymulowanych PDGF. Z kolei Falasca i wsp. [14] wykazali wzmożoną aktywację PLC $\gamma$ 1 przez PI(3,4,5)P $_3$ , wytwarzanym w szlaku PI3K, co podkreśla znaczącą rolę obydwu enzymów w metabolizmie fosfatydyloinozytolu, a przede wszystkim potwierdza mechanizm allosterycznej regulacji enzymu PLC $\gamma$ 1. Dodatkowo Sekiya i wsp. [46] sugerują, że PLC $\gamma$ 1 jest częściowo aktywna przy nieobecności PI(3,4,5)P $_3$ , co wskazuje na udział także innych czynników wytwarzanych przez PDGF w aktywacji enzymu. Jednym z nich jest kwas fosfatydowy, który powoduje zwiększenie stopnia fosforylacji enzymu i wzmacnia aktywację PLC $\gamma$ 1 [25].

Utrzymanie równowagi pomiędzy procesem fosforylacji i defosforylacji jest jednym z ważniejszych punktów kontrolnych wpływających na aktywację fosfolipazy C $\gamma$ 1.

Oprócz receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK) występują również fosfatazy tyrozynowe (PTP-azy). PTP-azy są dużą rodziną białek zawierających wysoce konserwatywną domenę katalityczną swoistą dla fosfotyrozyn [19]. Zaobserwowano, że fosfataza SHP-1 zapobiega fosforylacji PLC $\gamma$ 1 po uprzedniej stymulacji komórek czynnikiem wzrostu hepatocytów (HGF) [33].

Aktywność fosfolipazy C $\gamma$ 1 może być również regulowana w wyniku fosforylacji reszt seryny/treoniny. Negatywne regulacje PLC $\gamma$ 1 przez PKA, czy PKC udowodnili Alava i wsp. [1]. Badania Bae i wsp. [2] wykazały, że fosforylacja seryny w pozycji 1248 (Ser1248) przez PKC lub PKA, w odpowiedzi na stymulację komórek czynnikami wzrostu, skutkowałą inaktywacją enzymu zarówno w wyniku zmian strukturalnych w cząsteczce enzymu, jak i jego defosforylacją przez fosfatazy.

Ze względu na wielodomenową budowę białka Cbl wykazano wiele jego interakcji z białkami sygnałowymi, w tym z PLC $\gamma$ 1 [51]. Cbl wiąże się bezpośrednio do domeny SH3 fosfolipazy C $\gamma$ 1 i hamuje fosforylację reszt tyrozyny, a także powoduje ubikwitinację i degradację PLC $\gamma$ 1 w proteasomie [7]. Z kolei białko adaptorowe Grb2 wiąże się bezpośrednio do fosfotyrozyny (pTyr $^{783}$ ), w wyniku czego niemożliwe jest związanie enzymu z substratem PI(3,4)P $_2$  [8].

Hormon wzrostu (GH) jest zarówno autokrynnym, jak i parakrynnym czynnikiem wzrostu regulującym różne procesy komórkowe, np.: proliferację, wzrost komórek, czy apoptozę. Interakcja GH ze swoistymi dla siebie receptorami GHR powoduje fosforylację m.in. kinazy Janus 2 (Jak2). Choi i wsp. [9] wykazali, iż w wyniku działania GH fosfolipaza C $\gamma$ 1 wiąże się z białkiem Jak2 poprzez domenę nSH2, zaś domena SH3 łączy się z fosfatazą tyrozynową PTP-1B, co skutkuje zahamowaniem aktywności enzymu.

### PODSUMOWANIE

Fosfolipaza C $\gamma$ 1 pełni szczególną rolę w metabolizmie fosfatydyloinozytolu, stanowiąc tym samym jeden z ważniejszych elementów szlaków sygnałowych prowadzących do wytworzenia wtórnych przekaźników sygnału inicjującego przez czynniki wzrostu lub hormony. Biologiczna rola PLC $\gamma$ 1 nie została w pełni wyjaśniona. Wiadomo

natomiast, że uczestniczy ona w wielu ważnych procesach komórkowych, takich jak np.: podziały komórkowe, różnicowanie, ruchliwość komórki, apoptoza, czy transformacje nowotworowe. Jednym ze sposobów aktywacji

enzymu jest jego związanie z receptorowymi kinazami tyrozynowymi. Niedawno szczegółowo zbadano i poznano mechanizm molekularnej aktywacji PLC $\gamma$ 1 przez receptorowe kinazy tyrozynowe.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Alava M.A., DeBell K.E., Conti A., Hoffman T., Bonvini E.: Increased intracellular cyclic AMP inhibits inositol phospholipid hydrolysis induced by perturbation of the T cell receptor/CD3 complex but not by G-protein stimulation. Association with protein kinase A-mediated phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1. *Biochem. J.*, 1992; 284: 189–199
- [2] Bae S.S., Choi J.H., Oh Y.S., Yun S.U., Ryu S.H., Suh P.G.: Regulation of phospholipase C- $\gamma$ 1 by protein kinase A-dependent phosphorylation. *Adv. Enzyme Regul.*, 2002; 42: 195–211
- [3] Bae Y.S., Cantley L.G., Chen C.S., Kim S.R., Kwon K.S., Rhee S.G.: Activation of phospholipase C- $\gamma$  by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 4465–4469
- [4] Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., Rhee S.G.: Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 217–221
- [5] Blobel G.C., Stribling S., Obeid L.M., Hannun Y.A.: Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv.*, 1996; 27: 213–248
- [6] Chang J.S., Kim S.K., Kwon T.K., Bae S.S., Min D.S., Lee Y.H., Kim S.O., Seo J.K., Choi J.H., Suh P.G.: Pleckstrin homology domains of phospholipase C- $\gamma$ 1 directly interact with  $\beta$ -tubulin for activation of phospholipase C- $\gamma$ 1 and reciprocal modulation of  $\beta$ -tubulin function in microtubule assembly. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 6897–6905
- [7] Choi J.H., Bae S.S., Park J.B., Ha S.H., Song H., Kim J.H., Cocco L., Ryu S.H., Suh P.G.: Cbl competitively inhibits epidermal growth factor-induced activation of phospholipase C- $\gamma$ 1. *Mol. Cells*, 2003; 15: 245–255
- [8] Choi J.H., Hong W.P., Yun S., Kim H.S., Lee J.R., Park J.B., Bae Y.S., Ryu S.H., Suh P.G.: Grb2 negatively regulates epidermal growth factor-induced phospholipase C- $\gamma$ 1 activity through the direct interaction with tyrosine-phosphorylated phospholipase C- $\gamma$ 1. *Cell. Signal.*, 2005; 17: 1289–1299
- [9] Choi J.H., Kim H.S., Kim S.H., Yang Y.R., Bae Y.S., Chang J.S., Kwon H.M., Ryu S.H., Suh P.G.: Phospholipase C $\gamma$ 1 negatively regulates growth hormone signalling by forming a ternary complex with Jak2 and protein tyrosine phosphatase-1B. *Nat. Cell Biol.*, 2006; 8: 1389–1397
- [10] Di Paolo G., De Camilli P.: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 2006; 443: 651–657
- [11] Ellis M.V., Sally U., Katan M.: Mutations within a highly conserved sequence present in the X region of phosphoinositide-specific phospholipase C- $\delta$ 1. *Biochem. J.*, 1995; 307: 69–75
- [12] Essen L.O., Perisic O., Cheung R., Katan M., Williams R.L.: Crystal structure of mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C $\delta$ . *Nature*, 1996; 380: 595–602
- [13] Essen L.O., Perisic O., Katan M., Wu Y., Roberts M.F., Williams R.L.: Structural mapping of the catalytic mechanism for a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochemistry*, 1997; 36: 1704–1718
- [14] Falasca M., Logan S.K., Lehto V.P., Baccante G., Lemmon M.A., Schlessinger J.: Activation of phospholipase C $\gamma$  by PI 3-kinase induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.*, 1998; 17: 414–422
- [15] Fukami K., Inanobe S., Kanamaru K., Nakamura Y.: Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog. Lipid Res.*, 2010; 49: 429–437
- [16] Gao, X., Porter A.T., Grignon D.J., Pontes J.E., Honn K.V.: Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate*, 1997; 31: 264–281
- [17] Gilmore A.P., Burridge K.: Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, 1996; 381: 531–535
- [18] Gresset A., Hicks S.N., Harden T.K., Sondek J.: Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C- $\gamma$  isozymes. *J. Biol. Chem.*, 2010; 46: 35836–35847
- [19] Haj F.G., Markova B., Klamann L.D., Bohmer F.D., Neel B.G.: Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 739–744
- [20] Hokin M.R., Hokin L.E.: Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.*, 1953; 203: 967–977
- [21] Hwang S.C., Jhon D.Y., Bae Y.S., Kim J.H., Rhee S.G.: Activation of phospholipase C- $\gamma$  by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 18342–18349
- [22] Itoh T., Koshiba S., Kigawa T., Kikuchi A., Yokoyama S., Takenawa T.: Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science*, 2001; 291: 1047–1051
- [23] Jakus Z., Simon E., Frommhold D., Sperandio M., Mócsai A.: Critical role of phospholipase C $\gamma$ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.*, 2009; 206: 577–593
- [24] Janetopoulos C., Devreotes P.: Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. *J. Cell Biol.*, 2006; 174: 485–490
- [25] Jones G.A., Carpenter G.: The regulation of phospholipase C- $\gamma$ 1 by phosphatidic acid. Assessment of kinetic parameters. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 20845–20850
- [26] Kaplan D.R., Miller F.D.: Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2000; 10: 381–391
- [27] Kashiwada M., Lu P., Rothman P.B.: PIP3 pathway in regulatory T cells and autoimmunity. *Immunol. Res.*, 2007; 39: 194–224
- [28] Kassiss J., Moellinger J., Lo H., Greenberg N.M., Kim H.G., Wells A.: A role for phospholipase C- $\gamma$ -mediated signaling in tumor cell invasion. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 2251–2260
- [29] Kassiss J., Radinsky R., Wells A.: Motility is rate-limiting for invasion of bladder carcinoma cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2002; 34: 762–775
- [30] Khoshyomn S., Penar P.L., Rossi J., Wells A., Abramson D.L., Bhushan A.: Inhibition of PLC gamma-1 activation blocks glioma cell motility and invasion of fetal rat brain aggregates. *Neurosurgery*, 1999; 44: 568–577
- [31] Kurosaki T., Maeda A., Ishiai M., Hashimoto A., Inabe K., Takata M.: Regulation of the phospholipase C- $\gamma$ 2 pathway in B cells. *Immunol. Rev.*, 2000; 176: 19–29
- [32] Loeb D.M., Stephens R.M., Copeland T., Kaplan D.R., Greene L.A.: A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C- $\gamma$ 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 8901–8910
- [33] Machide M., Kamitori K., Kohsaka S.: Hepatocyte growth factor-induced differential activation of phospholipase C $\gamma$ 1 and phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by tyrosine phosphatase SHP-1 in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 31392–31398
- [34] Martin T.F.: PI(4,5)P $_2$  regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001; 13: 493–499
- [35] Michell R.H.: Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975; 415: 81–147
- [36] Minichiello L., Korte M., Wolf D., Kühn R., Unsicker K., Cestari V., Rossi-Arnaud C., Lipp H.P., Bonhoeffer T., Klein R.: Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, 1999; 24: 401–414
- [37] Mohammadi M., Dionne C.A., Li W., Li N., Spivak T., Honegger A.M., Jaye M., Schlessinger J.: Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature*, 1992; 358: 681–684
- [38] Ohno S., Nishizuka Y.: Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem.*, 2002; 132: 509–511
- [39] Pawelczyk T.: Przekazywanie sygnału w komórce z udziałem fosfotyloinozytolosowych fosfolipaz C. *Postepy Hig. Med. Dozw.*, 1999; 53: 173–182
- [40] Pawson T.: SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Adv. Cancer Res.*, 1994; 64: 87–110
- [41] PhosphoSitePlus. <http://www.phosphosite.org> (07.06.2011)

- [42] Poulin B., Sekiya F., Rhee S.G.: Intramolecular interaction between phosphorylated tyrosine-783 and the C-terminal Src homology 2 domain activates phospholipase C $\gamma$ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 4276–4281
- [43] Poulin B., Sekiya F., Rhee S.G.: Differential roles of the Src homology 2 domains of phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) in platelet-derived growth factor induced activation of PLC- $\gamma$ 1 in intact cells. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 6411–6416
- [44] Rhee S.G., Choi K.D.: Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms. *Adv. Second Messengers Phosphoproteins Res.*, 1992; 26: 35–61
- [45] Saunders C.M., Larman M.G., Parrington J., Cox L.J., Royle J., Blayney L.M., Swann K., Lai F.A.: PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 2002; 129: 3533–3544
- [46] Sekiya F., Poulin B., Kim Y.J., Rhee S.G.: Mechanism of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C- $\gamma$ 1. Tyrosine 783 phosphorylation is not sufficient for lipase activation. *J. Biol. Chem.*, 2004; 31: 32181–32190
- [47] Serrano C.J., Graham L., DeBell K., Rawat R., Veri M.C., Bonvini E., Rellahan B.L., Reischl I.G.: A new tyrosine phosphorylation site in PLC $\gamma$ 1: the role of tyrosine 775 in immune receptor signaling. *J. Immunol.*, 2005; 174: 6233–6237
- [48] Suh B.C., Hille B.: Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2005; 15: 370–378
- [49] Suh P.G., Park J.I., Manzoli L., Cocco L., Peak J.C., Katan M., Fukami K., Kataoka T., Yun S., Ryu S.H.: Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep.*, 2008; 41: 415–434
- [50] Szumiło M., Rahden-Staroń I.: Fosfolipaza C zależna od fosfatydylinozytolu w komórkach ssaków – budowa, właściwości i funkcja. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 47–54
- [51] Tsygankov A.Y., Teckchandani A.M., Feshchenko E.A., Swaminathan G.: Beyond the RING: CBL proteins as multivalent adapters. *Oncogene*, 2001; 20: 6382–6402
- [52] Turner T., Epps-Fung M.V., Kassisi J., Wells A.: Molecular inhibition of phospholipase C $\gamma$  signaling abrogates DU-145 prostate tumor cell invasion. *Clin. Cancer Res.*, 1997; 3: 2275–2282
- [53] Valius M., Bazenet C., Kazlauskas A.: Tyrosines 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  subunit and are required for binding of phospholipase C $\gamma$  and a 64-kilodalton protein, respectively. *Mol. Cell Biol.*, 1993; 13: 133–143
- [54] Way K.J., Katai N., King G.L.: Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet. Med.*, 2001; 18: 945–959
- [55] Wells A.: Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv. Cancer Res.*, 2000; 78: 31–101
- [56] Wells A., Grandis J.R.: Phospholipase C- $\gamma$ 1 in tumor progression. *Clin. Exp. Metastasis*, 2003; 20: 285–290
- [57] Wen, W., Yan, J., Zhang M.: Structural characterization of the split pleckstrin homology domain in phospholipase C- $\gamma$ 1 and its interaction with TRPC3. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 12060–12068
- [58] Wong K.K., Engelman J.A., Cantley L.C.: Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2010; 20: 87–90
- [59] Yablonski D., Kadlecsek T., Weiss A.: Identification of a phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC- $\gamma$ 1 and NFAT. *Mol. Cell Biol.*, 2001; 21: 4208–4218

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.