

**Received:** 2008.06.23  
**Accepted:** 2008.10.14  
**Published:** 2008.11.03

## **Biologiczna rola fosfolipazy C zależnej od fosfatydylocholiny w komórkach ssaków**

### **Biological role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mammalian cells**

**Maria Szumiło, Iwonna Rahden-Staroń**

Katedra i Zakład Biochemii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

#### **Streszczenie**

Fosfolipaza C (PC-PLC) zależna od fosfatydylocholiny (PC) jest enzymem katalizującym hydroлизę wiązania estrowego między glicerolem i fosforanem w fosfatydylocholiny (PC) i innych fosfatydach, takich jak sfingomielina (SM) czy fosfatydyloetanolamina (PE). Enzym ten jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie, od bakterii do ssaków. W organizmach ssaków występuje w erytrocytach, limfocytach, w tkance mięśniowej, tkance tłuszczowej i układzie nerwowym. Produktami hydrolizy fosfatydylocholiny katalizowanej przez PC-PLC są fosfocholina i 1,2-diacylglicerol (DAG), dobrze poznany lipidowy „wtórny przekaźnik”. Szlak degradacji PC z udziałem PC-PLC jest aktywowany przez wiele czynników, takich jak cytokiny, czynniki wzrostu, mitogeny czy jony wapnia. Rozkład fosfatydylocholiny ma znaczenie w szlakach przekazywania sygnałów związanych z procesami regulującymi metabolizm komórki, jej wzrost i różnicowanie, a także w indukowaniu apoptotycznej śmierci komórki. W pracy omówiono strukturę i funkcję biologiczną PC-PLC ssaków.

**Słowa kluczowe:**

**fosfolipaza C (PC-PLC) • regulatory aktywności PC-PLC • przekaźnictwo sygnałów**

#### **Summary**

Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) catalyzes the hydrolysis of the ester linkage between glycerol and phosphate in phosphocholine (PC) and other phosphatides, such as sphingomylin (SM) and phosphatidylethanolamine (PE). PC-PLC activity has been described in many organisms, from bacteria to mammals. In mammalian cells the enzyme has been found in erythrocytes, lymphocytes, muscular tissue, adipose tissue, and the nervous system. Hydrolysis of PC by PC-PLC results in the production of phosphocholine and diacylglycerol (DAG), a well-characterized lipid second-messenger molecule. The PC-degradation pathway by PC-PLC is activated by many factors, including cytokines, growth factors, mitogens, and calcium ions. Degradation of PC has been implicated in intracellular signal transduction involved in the regulation of cell metabolism, growth, differentiation, and induction of apoptosis. In this review the structure and biological function of mammalian PC-PLC are discussed.

**Key words:**

**phospholipase C (PC-PLC) • PC-PLC activity regulators • signal transduction**

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=871217>**Word count:** 2131**Tables:** –**Figures:** –**References:** 61**Adres autorki:** dr Maria Szumilo, Katedra i Zakład Biochemii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: mszumilo@amwaw.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **PC-PLC** – fosfolipaza C zależna od fosfatydylocholino; **PLC (Bc)** – fosfolipaza C z *Bacillus cereus*; **PI-PLC** – fosfolipaza C zależna od fosfatydyloinozytolu; **PC-PLD** – fosfolipaza D zależna od fosfatydylocholino; **PLA<sub>2</sub>** – fosfolipaza A<sub>2</sub>; **PIP<sub>2</sub>** – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; **PI** – fosfatydyloinozytol; **IP<sub>3</sub>** – inozytolo-1,4,5- trifosforan; **PC** – fosfatydylocholino; **SM** – sfingomielina; **PE** – fosfatydyloetanoloamina; **PA** – kwas fosfatydowy; **DAG** – 1,2-diacyloglicerol; **cAMP** – cykliczny 3'-5' adenozymonofosforan; **LPS** – lipopolisacharyd; **GSH** – glutation; **CD14** – receptor błonowy makrofagów; **PKC** – kinaza białkowa C; **JAK** – kinaza tyrozynowa; **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; **NOS** – syntaza tlenu azotu; **p53, Rb** – onkogeny; **Fas** – antygen; **RhoA** – białko z rodziny Rho hydrolizujące GTP; **TSH** – tyreotropina; **PDGF** – płytkowy czynnik wzrostu; **IL-1, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10** – interleukiny-1, 2, 4, 6, 10; **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu; **VECs** – komórki śródbłonna naczyń (vascular endothelial cells); **EOC** – komórki nabłonkowe raka jajnika człowieka; **MSCs** – komórki macierzyste mezenchymy; **MNCs** – komórki nerwowe myszy; **CBRH-7919** – komórki raka wątroby szczura; **FRTL-5** – komórki tarczycy szczura; **HuT78** – komórki chłoniaków limfocytarnych T człowieka; **NK cells** – limfocyty NK (natural killers) u człowieka; **A20** – komórki chłoniaków limfocytarnych B myszy; **U937** – linia komórek białaczki człowieka; **NIH-3T3** – fibroblasty z zarodków mysich; **M12** – komórki chłoniaków limfocytarnych B myszy; **RAW 264,7** – mysie makrofagi; **TPA (PMA)** – 12-mirystylo-13-octan forbolu; **DEN** – dietyloamina – mitogeny; **D609** – sól sodowa tricyclodecan-9-yl-xanthogenate – inhibitor PC-PLC; **STAT6, NF-κB** – czynniki transkrypcyjne; **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **MnSOD, Cu/ZnSOD** – dysmutazy ponadtlenu; **COX-1, COX-2** – cyklooksygenazy; **NADPH** – zredukowana postać fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego.

## WSTĘP

Błony plazmatyczne komórek są bardzo aktywne metabolicznie. Fosfolipidy błonowe dzięki swej złożonej strukturze odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu stabilności, płynności i przepuszczalności błon. Odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie kanałów jonowych i receptorów, a także powstawanie pęcherzyków wydzielniczych. Przemiany fosfolipidów błonowych indukowane sygnałami zewnętrznymi są źródłem cząstek sygnałowych przekazujących informacje do wnętrza komórki. Jedną z ważniejszych dróg przekazywania informacji docierających do komórki jest szlak przemian rozpoczynający się hydrolizą fosfatydyloinozytolu (PI) umiejscowionego po wewnętrznej stronie błony plazmatycznej z udziałem fosfolipazy C zależnej od fosfatydyloinozytolu (PI-PLC). W piśmiennictwie istnieje bardzo dużo prac szczegółowo opisujących uwalnianie 1,2-diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1, -4, -5-trifosforanu z fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP<sub>2</sub>) z udziałem PI-PLC w organizmach ssaków [31,37,49].

Natomiast rola fosfolipazy C zależnej od fosfatydylocholino (PC-PLC) katalizującej hydrolizę fosfatydylocholino (PC) z uwolnieniem fosfocholiny i DAG jest wciąż mało poznana. Informacje o fosfolipazie C zależnej od fosfatydylocholino (PC) są stosunkowo skromne i dotyczą przede

wszystkim, enzymu bakteryjnego. PC-PLC ssaków jest słabo scharakteryzowana. Nie ma informacji o mechanizmie katalizowanej przez nią reakcji, wewnątrzkomórkowym umiejscowieniu, translokacji do miejsca działania - błony plazmatycznej, zwłaszcza w wyniku stymulacji komórek mitogenami czy transformacji komórek pod wpływem onkogenów [33,37,42].

W różnych typach nowotworów u ludzi (np. w raku sutka, macicy, prostaty) zaobserwowano zmiany w metabolizmie fosfatydylocholino objawiające się zwiększeniem stężenia fosfocholiny i związków zawierających w swej cząsteczce cholinę. Wzrost stężenia fosfocholiny w komórkach jest osiągnięty dzięki zmianom w aktywności enzymów, takich jak: kinaza choliny oraz dwóch enzymów zależnych od fosfatydylocholino – fosfolipazy D oraz fosfolipazy C. Proponuje się wykorzystanie tych enzymów jako molekularnych celów w terapii przeciwnowotworowej [1,14,15,17].

## FOSFOLIPAZA C (PC-PLC) – CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

Fosfolipaza C zależna od fosfatydylocholino (PC) – (PC-PLC, EC 3.1.4.3) nazywana też lecytynazą lub α-toksyną jest enzymem katalizującym hydrolizę wiązania estrowego między glicerolem i fosforanem w fosfatydylocholinie

(lecycynie) i innych fosfatydach, takich jak sfingomielina (SM) czy fosfatydyloetanolamina (PE).

Enzym wykrył Ottolenghi w 1969 r. w szczepach bakterii *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* – PLC (Bc), *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* [30,44].

Znaleziono ją w różnych tkankach ssaków, takich jak: tkanka mięśniowa, tłuszczowa, nerwowa, a także w erytrocytach i limfocytach. Aktywność PC-PLC oznaczono w cytosolu, błonach plazmatycznych i w jądrze komórkowym (nukleoplazma, chromatyna). Optimum pH dla PC-PLC wynosi 7–7,6. Aktywatorami są jony  $Ca^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  [38].

Nie ma jeszcze pełnej charakterystyki tego enzymu w organizmach eukariotycznych. Nie sklonowano ani nie zsekwenjonowano PC-PLC, której źródłem byłby organizm ssaka. Nasza wiedza na temat budowy, funkcji i aktywatorów fosfolipazy C zależnej od fosfatydylocholiny pozostaje niepełna. Skąpe dane literaturowe podają rozbieżne informacje dotyczące masy cząsteczkowej i liczby izoform enzymu. Jedni autorzy donoszą, że PC-PLC występuje w jednej postaci (np. 29 kDa w mięśniu sercowym psa i 40 kDa w ludzkich komórkach białaczkowych – U937), inni wykazują aktywność dwóch izoform. Na przykład w ludzkich limfocytach NK wykazano obecność enzymu o masie cząsteczkowej 40 i 66 kDa, a w płynie nasiennym wołu enzym zbudowany z dwóch podjednostek o m.cząst. 55 i 69 kDa [4,34].

#### FUNKCJA PC-PLC W METABOLIZMIE SSAKÓW

Fosfatydylocholina (PC) jest głównym fosfolipidem błon plazmatycznych stanowiącym 40–60% puli fosfolipidów budujących błony. Homeostaza w metabolizmie fosfatydylocholiny jest osiągana w wyniku regulacji procesów jej syntezy i rozpadu.

Liczne badania wskazują, że rozkład fosfatydylocholiny ma znaczenie w szlakach przekazywania sygnałów związanych z procesami regulującymi metabolizm komórki, jej wzrost i różnicowanie. Brak fosfatydylocholiny wydaje się wystarczający do zaindukowania apoptotycznej śmierci komórki [2].

Hydroliza PC może być przeprowadzana przez dwa różne enzymy zależne od fosfatydylocholiny: fosfolipazę C (PC-PLC) i fosfolipazę D (PC-PLD). Produktami hydrolizy fosfatydylocholiny katalizowanej przez PC-PLC są fosfocholina i 1,2-diacylglicerol (DAG). Drugi enzym – PC-PLD hydrolizuje fosfatydylocholinę do choliny i kwasu fosfatydowego (PA). Mechanizm działania PA jest związany przede wszystkim z aktywacją kinaz serynowo/treoninowych. Kwas fosfatydowy uczestniczy w licznych procesach metabolicznych, takich jak: rozpad fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu ( $PIP_2$ ) do inozytolo-3,4,5-trifosforanu ( $IP_3$ ) czy uwalnianie kwasu arachidonowego przez aktywację fosfolipazy  $A_2$  ( $PLA_2$ ). Uczestniczy również w tworzeniu retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego [27,43,48].

DAG jest wtórnym przekaźnikiem aktywującym kinazę białkową C (PKC). Aktywacja PKC wywołuje różnorakie

zmiany w komórce, takie jak np. zmiany w aktywności czynników transkrypcyjnych i wpływ na przebieg transkrypcji wielu genów, modulowanie funkcjonowania kanałów jonowych i receptorów adrenergicznych, regulacja aktywności białek cytoszkieletu, a także białek transportujących i syntetyzujących neuroprzekaźniki, uwalnianie neuroprzekaźników z pęcherzyków synaptycznych, utrzymywanie homeostazy wapniowej, a ponadto regulowanie procesów apoptozy [8,16,25,26,39].

Rola fosfocholiny w przekaźnictwie sygnałów w komórce jest mniej poznana, ale liczne doniesienia literaturowe potwierdzają jej udział w procesach proliferacji i transformacji komórek [29,32,47,56,57].

Aktywność PC-PLC rośnie w regenerującej wątrobie szczura [3]. W wielu nowotworach doświadczalnych obserwuje się zmiany aktywności PC-PLC np. w nowotworach wątroby szczura wywołanych dietyloaminą (DEN) aktywność enzymu rośnie i jest prawie 30 razy większa w 20 tygodniu nowotworzenia w porównaniu z grupą kontrolną. Wykazano również istotny udział PC-PLC w proliferacji i różnicowaniu komórek raka wątroby CBRH-7919 (hepatocarcinoma) w hodowli *in vitro*. W komórkach tych obserwowano 2-krotny wzrost aktywności enzymu po indukcji estrem forbolu (PMA – 12-mirystylo-13-octan forbolu), a podczas ich różnicowania po stymulacji kwasem retinoidowym obserwowano 1,5-krotny spadek aktywności [54].

PC-PLD uczestniczy w proliferacji i różnicowaniu komórek tarczycy zaindukowanych tyreotropiną (TSH). W hodowli komórek tarczycy szczura FRTL-5 po indukcji TSH aktywna PC-PLC uwalniała DAG, który stymulował aktywność PC-PLD. We wzroście aktywności PC-PLD wywołanym TSH uczestniczyły także: małe białko G – RhoA i podjednostka  $\alpha$  PKC [19].

Stwierdzono, że PC-PLC jest zaangażowana w szlaki przekazywania sygnałów zależnych od wieku, co zaobserwowano w ludzkich fibroblastach płuca, w hepatocytach szczura, a także w śródbłonku naczyń człowieka (VECs – vascular endothelial cells) [11,23].

Liczne dane doświadczalne wskazują, że zaburzenia procesu apoptozy w komórkach śródbłonka naczyń VECs są przyczyną wielu stanów zapalnych i chorób degeneracyjnych. PC-PLC, podobnie jak p53 pełni główną rolę w szlakach przekazywania sygnałów apoptozy w ludzkich komórkach śródbłonka naczyń – VECs [59]. Stwierdzono, że PC-PLC jest zaangażowana we wzajemnych relacjach apoptozy i procesu starzenia w tych komórkach poprzez wpływ na poziom białka p53 i cAMP [10,12,45,60].

PC-PLC prawdopodobnie bierze też udział w indukcji apoptozy wywołanej wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu – ROS (reactive oxygen species). Wykazano, że inicjacji apoptozy towarzyszy nasilona ekspresja p53 [59].

PC-PLC jest ponadto zaangażowana w przekazywanie sygnału do apoptozy wywołanych przez antygen Fas. Antygen Fas aktywuje PC-PLC i kwaśną sfingomielinazę zależną od PC-PLC. Jednym ze skutków tych aktywacji jest wzrost stężenia fosfolipidu – ceramidu w hodowli komórek ludzkich chłoniaków limfocytarnych T – HuT78 i jest to jedna

z przyczyn ich apoptotycznej śmierci. W kulturze mysich chłoniaków limfocytarnych B-A20 antygen Fas aktywując PC-PLC wywołuje w konsekwencji wzrost aktywności PC-PLD [42].

Fosfolipazy C – zarówno ta zależna od fosfatydyloinozytolu, jak i zależna od fosfatydylocholine, a także fosfolipaza D zależna od fosfatydylocholine uczestniczą w aktywacji makrofagów u myszy i u człowieka [10,58].

Zaobserwowano zmiany w aktywności PC-PLC w stanach zapalnych wywołanych ekspozycją makrofagów na pył krzemowy, a będących jedną z przyczyn wielu chorób płuc u ludzi np. pylicy krzemowej czy raka płuc. Indukcji cytokin TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  towarzyszył wzrost aktywności PC-PLC, a regulacja aktywności enzymu była zależna od stanu redox i stężenia jonów wapnia w komórkach makrofagów [22]. Również w ludzkich monocytach wydzielanie cytokiny IL-1 $\beta$  było poprzedzone wzrostem aktywności PC-PLC [5].

Stymulacja fibroblastów z zarodków mysich NIH-3T3 mitogenami, takimi jak np. płytkowy czynnik wzrostu – PDGF czy estrem forbolu – TPA (inaczej PMA) wywołuje zmiany w lokalizacji PC-PLC zarówno cytosolowej (przemieszcza się z cytoplazmy do błony plazmatycznej), jak i jądrowej postaci enzymu (wzrost liczby cząsteczek enzymu w nukleoplazmie). Efektem końcowym jest wzrost wytwarzania DAG w komórkach stymulowanych PDGF. Wskazuje się, że ekspresja, aktywacja i wewnątrzkomórkowe umiejscowienie PC-PLC są integralnymi elementami mechanizmów regulujących funkcje komórki [19,20,21].

W wielu ludzkich komórkach nowotworowych (np. w raku sutka, macicy i prostaty) wykazano zmieniony metabolizm fosfatydylocholine, który charakteryzuje się zwiększonym stężeniem fosfocholine i choline w komórce. W nabłonkowym raku jajnika – EOC (epithelial ovarian cancer) wzrasta poziom fosfocholine towarzyszy wzrost aktywności enzymów dostarczających ten fosfolipid komórkom: kinazy choline (około 12–20-krotny wzrost aktywności) oraz fosfolipaz: PC-PLC i PC-PLD (5-krotny wzrost aktywności) [1,13,17,50]. Wzajemne korelacje między metabolizmem fosfocholine i szlakami przekazywania sygnałów w komórkach pozostają nieznane. Zaobserwowane zmiany w metabolizmie fosfocholine w komórkach EOC umożliwiają wprowadzenie nowych nieinwazyjnych terapii w diagnostyce chorób nowotworowych.

Aktywacja PC-PLC jest konieczna, choć niewystarczająca do uruchomienia szlaków przekazywania sygnałów regulowanych przez interleukinę 4 (IL-4) w mysich chłoniakach limfocytarnych B – M12 [57]. IL-4 jest cytokiną uczestniczącą w regulacji procesów immunologicznych. Bierze udział w procesach proliferacji, różnicowania czy też apoptozy. Udział IL-4 wykazano w rozwoju chorób alergicznych np. astmy i chorób autoimmunologicznych np. reumatoidalnego zapalenia stawów. IL-4 aktywuje wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnałów, w których biorą udział tak różne składniki jak np.: kinazy tyrozynowe JAK (Janus kinase), kinazy serynowo/treoninowe czy czynniki transkrypcyjne: STAT6 i NF- $\kappa$ B. Wykazano, że jednym z najwcześniejszych zdarzeń w komórkach wrażliwych na IL-4 jest hydroliza fosfatydylocholine katalizowana przez PC-PLC [29,32,47,56].

Inną grupą lipidowych mediatorów stanu zapalnego są prostaglandyny. Powstają z kwasu arachidonowego uwalnianego z lipidów błonowych wielu różnych komórek z udziałem cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1 i COX-2) w odpowiedzi na czynniki, takie jak: urazy fizyczne, chemikalia drażniące czy produkty pochodzenia bakteryjnego, np. lipopolisacharyd (LPS). LPS będący glikolipidowym składnikiem ścian komórek bakterii Gram-ujemnych wiąże się z makrofagami poprzez receptor błonowy – CD14. Po jego związaniu się z receptorem rośnie aktywność enzymów, takich jak fosfolipazy: A<sub>2</sub>, PC-PLD, PI-PLC, PC-PLC oraz aktywność kinaz białkowych: PKC, JAK i MAPK. LPS zwiększa również wytwarzanie wielu prozapalnych cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-1, -6 i -10. Zaobserwowano również wzrost aktywności enzymów indukowanych stresem, tj. syntazy tlenku azotu (iNOS) i cyklooksygenazy 2 (COX-2) [10,20].

W makrofagach mysich RAW 264.7 zaindukowanych LPS-em wykazano wzrost aktywności enzymów odpowiedzialnych za zwiększone wytwarzanie kwasu fosfatydowego, w kolejności działania: PC-PLC, PKC, PC-PLD. Wzrost aktywności wspomnianych enzymów był odpowiedzialny za zwiększoną ekspresję COX-2 i w rezultacie zwiększoną syntezę prostaglandyn, zwłaszcza prostaglandyny E [20, 45].

W ludzkich cytotoksycznych limfocytach T zaindukowanych interleukiną 2 wykazano zmiany aktywności obu izoform PC-PLC (40 i 66 kDa). Wzrostowi cytotoksyczności limfocytów T towarzyszyło przemieszczanie się cząsteczek enzymu z cytoplazmy (aparatu Golgiego, endoplazmatyczne retikulum) do zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej (2-krotny wzrost ilości enzymu). Ponieważ w obecności inhibitora PC-PLC – D609 (sól sodowa trycycloodecan-9-yl-xanthogenate) obserwowano spadek cytotoksyczności limfocytów T, to sugeruje się udział PC-PLC w tym procesie [38].

W innych badaniach wykazano, że zahamowanie aktywności PC-PLC przez D609 indukuje różnicowanie neuronów w komórkach macierzystych mezenchymy u szczurów (MSCs). Procesowi temu towarzyszy wzrost reaktywnych form tlenu ROS, wzrost ekspresji białka Rb i wzrost aktywności oksydazy NADPH, przy niezmienionej aktywności dysmutaz ponadtlenkowych (MnSOD i Cu/ZnSOD). Autorzy wskazują na udział PC-PLC w różnicowaniu neuronów w komórkach MSCs przez zwiększenie aktywności oksydazy NADPH i poziomu ROS, a także wpływ na ekspresję onkogenu Rb [40]. W ostatnich latach wykazano, że ROS funkcjonują jako swoiste „wtórne przekazywacze” w kaskadach przekazywania sygnałów zaangażowanych w komórkowych procesach proliferacji, różnicowania i apoptozy w organizmach ssaków. ROS regulują różnicowanie np. fibroblastów skóry, neuronów czy komórek mięśnia sercowego. Rola PC-PLC w tych procesach jest wciąż wyjaśniana [9,35,41,51,52]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach dojrzewania ośrodkowego układu nerwowego. W hodowli komórek nerwowych myszy (MNCs) wykazano udział PC-PLC w regulacji przeżywalności neuronów poprzez stymulowanie ekspresji integryny beta4 i onkogenu Rb [24].

D609 działa przeciwwirusowo i przeciwzapalnie. Większość z tych właściwości jest wiązana z hamującym wpływem

na aktywność PC-PLC. D609 nie blokuje aktywności enzymów, takich jak: PI-PLC, PC-PLD, PLA<sub>2</sub>. Hamowanie aktywności PC-PLC zmniejsza syntezę DAG, który aktywuje kinazę białkową C i kwaśną sfingomielinazę. D609 wykazuje ponadto właściwości antyoksydacyjne zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Jego działanie przypomina glutation (GSH). Wykazano, że D609 chroni zarówno mózg gryzonia – gerbila *in vivo*, jak i neurony tegoż ssaka hodowane *in vitro* przed chorobą Alzheimera, którą wywoływano stresem oksydacyjnym i cytotoxycywnością zainicjowanymi obecnością peptydu beta-amyloidowego. Podanie D609 chroniło również komórki nerwowe zwierząt doświadczalnych przed apoptozą zaindukowaną wolnymi rodnikami [6,46].

W ostatnich latach zaobserwowano udział licznych związków pochodzenia lipidowego w różnych typach cytotoxycywności. Wśród nich najczęściej wymienia się: DAG, ceramid czy kwas arachidonowy powstające odpowiednio z udziałem PC-PLC, sfingomielinazy i fosfolipazy A<sub>2</sub>. Stwierdzono, że PC-PLC uczestniczy w przekazywaniu sygnałów cytotoxycywnych pochodzących np. od cytokiny TNF- $\alpha$ , lipopolisacharydu, glutaminianu czy enterotoksyny B ze *Staphylococcus* [21,55].

Liczni autorzy donoszą, że PC-PLC bierze także udział w regulacji stężenia kationów Ca<sup>2+</sup> i Na<sup>+</sup>, co wykazano np. w ludzkich limfocytach i co może wskazywać, że enzym ten odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu wewnątrzkomórkowej homeostazy kationów, a co za tym idzie może

być istotnym ogniwem w patogenezie nadciśnienia i arteriosklerozy [26,28].

W komórkach nerki psa i mózgu człowieka wykazano udział PC-PLC w toksyczności wywołanej przez metylmercury (MeHg). Aktywacja PC-PLC spowodowana obecnością MeHg prowadziła do apoptotycznej śmierci komórek wskutek wzrostu stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> [18].

## PODSUMOWANIE

Fosfolipaza C zależna od fosfatydylochliny (PC-PLC) jest jednym z najważniejszych enzymów w metabolizmie fosfatydylochliny. Rozkład fosfatydylochliny z udziałem PC-PLC z uwolnieniem fosfocholiny i DAG jest ważnym szlakiem przekazywania informacji docierających do komórki regulujących jej metabolizm, wpływając na wzrost, różnicowanie i proces apoptozy. Wśród czynników regulujących aktywność PC-PLC do najważniejszych zaliczamy: cytokiny prozapalne, czynniki wzrostu, mitogeny, a także jony wapnia. Mimo stosunkowo ubogiej wiedzy na temat PC-PLC ssaków pojawia się coraz więcej doniesień literaturowych wskazujących na udział PC-PLC w patogenezie chorób człowieka, takich jak: choroby nowotworowe, neurodegeneracyjne, a także w procesach zapalnych czy chorobach naczyń wieńcowych. Dalsze badania wyjaśniające molekularne właściwości, funkcję i rolę PC-PLC w wielu różnych schorzeniach pozwolą na znalezienie inhibitorów enzymu w celu farmakologicznej interwencji w leczeniu osób z tymi chorobami.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Ackerstaff E., Glunde K., Bhujwala Z.M.: Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? *J. Cell. Biochem.*, 2003; 90: 525–533
- [2] Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Larsen E.C., Chen X., Sun D., Tsao F.H.: CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A<sub>2</sub> and CTP: phosphocholine cytidylyltransferase after stroke. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 6718–6725
- [3] Albi E., Cataldi S., Rossi G., Magni M.V.: A possible role of cholesterol-sphingomyelin/phosphatidylcholine in nuclear matrix during rat liver regeneration. *J. Hepatol.*, 2003; 38: 623–628
- [4] Albi E., Viola Magni M.P.: The role of intranuclear lipids. *Biol. Cell.*, 2004; 96: 657–667
- [5] Andrei C., Margiocco P., Poggi A., Lotti L.V., Torrisi M.R., Rubartelli A.: Phospholipases C and A<sub>2</sub> control lysosome-mediated IL-1 $\beta$  secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 9745–9750
- [6] Ansari M.A., Joshi G., Huang Q., Opii W.O., Abdul H.M., Sultana R., Butterfield D.A.: *In vivo* administration of D609 leads to protection of subsequently isolated gerbil brain mitochondria subjected to *in vitro* oxidative stress induced by amyloid  $\beta$ -peptide and other oxidative stressors: relevance to Alzheimer's disease and other oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006; 41: 1694–1703
- [7] Antony P., Farooqui A.A., Horrocks L.A., Freysz L.: Effect of D609 on phosphatidylcholine metabolism in the nuclei of LA-N-1 neuroblastoma cells: a key role for diacylglycerol. *FEBS Lett.*, 2001; 509: 115–118
- [8] Becker K.P., Hannun Y.A.: Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 1448–1461
- [9] Cat B., Stuhlmann D., Steinbrenner H., Alili L., Holtkotter O., Sies H., Brenneisen P.: Enhancement of tumor invasion depends on trans-differentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 2727–2738
- [10] Cuschieri J., Billgren J., Maier R.V.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) is required for LPS-mediated macrophage activation through CD14. *J. Leukoc. Biol.*, 2006; 80: 407–414
- [11] Cheng Y., Zhao Q., Liu X., Araki S., Zhang S., Miao J.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, p53 and ROS in the association of apoptosis and senescence in vascular endothelial cells. *FEBS Lett.*, 2006; 580: 4911–4915
- [12] Du C., Zhao Q., Araki S., Zhang S.L., Miao J.Y.: Apoptosis mediated by phosphatidylcholine-specific phospholipase C is associated with cAMP, p53 level, and cell-cycle distribution in vascular endothelial cells. *Endothelium*, 2003; 10: 141–147
- [13] Fang X., Schummer M., Mao M., Yu S., Tabassam F.H., Swaby R., Hasegawa Y., Tanyi J.L., LaPushin R., Eder A., Jaffe R., Erickson J., Mills G.B.: Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1582: 257–264
- [14] Glunde K., Jie C., Bhujwala Z.M.: Molecular causes of the aberrant choline phospholipid metabolism in breast cancer. *Cancer Res.*, 2004; 64: 4270–4276
- [15] Glunde K., Serkova N.J.: Therapeutic targets and biomarkers identified in cancer choline phospholipid metabolism. *Pharmacogenomics*, 2006; 7: 1109–1123
- [16] Gutcher I., Webb P.R., Anderson N.G.: The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003; 60: 1061–1070
- [17] Iorio E., Mezzananza D., Alberti P., Spadaro F., Ramoni C., D'Ascenzo S., Millimaggi D., Pavan A., Dolo V., Canevari S., Podo F.: Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res.*, 2005; 65: 9369–9376
- [18] Kang M.S., Jeong J.Y., Seo J.H., Jeon H.J., Jung K.M., Chin M.R., Moon C.K., Bonventre J.V., Jung S.Y., Kim D.K.: Methylmercury-induced toxicity is mediated by enhanced intracellular calcium through activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2006; 216: 206–215

- [19] Kim J.H., Kim S.W., Jung P.J., Yon C., Kim S.C., Han J.S.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and RhoA are involved in the thyrotropin-induced activation of phospholipase D in FRTL-5 thyroid cells. *Mol. Cells*, 2002; 14: 272–280
- [20] Lee S.C., Han J.S., Seo J.K., Cha Y.N.: Modulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidylcholine-specific phospholipase C and D in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Mol. Cells*, 2003; 15: 320–326
- [21] Li Y., Maher P., Schubert D.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates glutamate-induced nerve cell death. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 7748–7753
- [22] Liu H., Zhang H., Forman H.J.: Silica induces macrophage cytokines through phosphatidylcholine-specific phospholipase C with hydrogen peroxide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2007; 36: 594–599
- [23] Luberto C., Yoo D.S., Suidan H.S., Bartoli G.M., Hannun Y.A.: Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and resynthesis on the activation of NF- $\kappa$ B in normal and SV40-transformed human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 14760–14766
- [24] Lv X., Wang N., Su L., Zhang S., Miao J.: Inhibition of PC-PLC blocked the survival of mouse neural cells by up-regulating the expression of integrin  $\beta$ 4 and Rb. *Dev. Neurosci.*, 2006; 28: 499–504
- [25] Mateos M.V., Uranga R.M., Salvador G.A., Giusto N.M.: Coexistence of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D activities in rat cerebral cortex synaptosomes. *Lipids*, 2006; 41: 273–280
- [26] Murphy S., Frishman W.H.: Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol. Rev.*, 2005; 13: 3–12
- [27] Nakajima K., Sonoda H., Mizoguchi T., Aoki J., Arai H., Nagahama M., Tagaya M., Tani K.: A novel phospholipase A1 with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein, p125. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 11329–11335
- [28] Nofer J.R., Junker R., Seedorf U., Assmann G., Zidek W., Tepel M.: D609-phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor attenuates thapsigargin-induced sodium influx in human lymphocytes. *Cell. Signal.*, 2000; 12: 289–296
- [29] O’Shea J.J., Gadina M., Schreiber R.D.: Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*, 2002; 109(Suppl.): S121–S131
- [30] Ottolenghi A.: Preparation and characterization of murine phospholipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1969; 46: Abstr. 91
- [31] Pawelczyk T.: Przekazywanie sygnału w komórce z udziałem fosfatydyloinozytoloswoitych fosfolipaz C. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1999; 53: 173–182
- [32] Perez-G M., Melo M., Keegan A.D., Zamorano J.: Aspirin and salicylates inhibit the IL-4- and IL-13-induced activation of STAT6. *J. Immunol.*, 2002; 168: 1428–1434
- [33] Plo I., Lautier D., Levade T., Sekouri H., Jaffrézou J.P., Laurent G., Bettaieb A.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D are respectively implicated in mitogen-activated protein kinase and nuclear factor  $\kappa$ B activation in tumour-necrosis-factor- $\alpha$ -treated immature acute-myeloid-leukaemia cells. *Biochem J.*, 2000; 351: 459–467
- [34] Preuss I., Kaiser I., Gehring U.: Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 5081–5091
- [35] Puceat M.: Role of Rac-GTPase and reactive oxygen species in cardiac differentiation of stem cells. *Antioxid. Redox Signal.*, 2005; 7: 1435–1439
- [36] Raben D.M., Baldassare J.J.: Nuclear envelope signaling-role of phospholipid metabolism. *Eur. J. Histochem.*, 2000; 44: 67–80
- [37] Ramoni C., Spadaro F., Barletta B., Dupuis M.L., Podo F.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mitogen-stimulated fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 2004; 299: 370–382
- [38] Ramoni C., Spadaro F., Menegon M., Podo F.: Cellular localization and functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in NK cells. *J. Immunol.*, 2001; 167: 2642–2650
- [39] Rebecchi M.J., Pentylala S.N.: Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.*, 2000; 80: 1291–1335
- [40] Sadurska B., Szumiło M.: Fosfolipazy A w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 116–123
- [41] Shibata Y., Branicky R., Landaverde I.O., Hekimi S.: Redox regulation of germline and vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2003; 302: 1779–1782
- [42] Shin I., Han J.S.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C-mediated induction of phospholipase D activity in Fas-expressing murine cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2000; 126: 445–453
- [43] Sonoda H., Aoki J., Hiramatsu T., Ishida M., Bandoh K., Nagai Y., Taguchi R., Inoue K., Arai H.: A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A<sub>1</sub> that produces lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 34254–34263
- [44] Stonehouse M.J., Cota-Gomez A., Parker S.K., Martin W.E., Hankin J.A., Murphy R.C., Chen W., Lim K.B., Hackett M., Vasil A.I., Vasil M.L.: A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol. Microbiol.*, 2002; 46: 661–676
- [45] Subbaramaiah K., Yoshimatsu K., Scheri E., Das K.M., Glazer K.D., Golijanin D., Soslow R.A., Tanabe T., Naraba H., Dannenberg A.J.: Microsomal prostaglandin E synthase-1 overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 12647–12658
- [46] Sultana R., Newman S., Mohmmad-Abdul H., Keller J.N., Butterfield D.A.: Protective effect of the xanthate, D609, on Alzheimer’s amyloid  $\beta$ -peptide (1-42)-induced oxidative stress in primary neuronal cells. *Free Radic. Res.*, 2004; 38: 449–458
- [47] Suzuki K., Nakajima H., Kagami S., Suto A., Ikeda K., Hirose K., Hiwasa T., Takeda K., Saito Y., Akira S., Iwamoto I.: Proteolytic processing of Stat6 signaling in mast cells as a negative regulatory mechanism. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 27–38
- [48] Szumiło M., Rahden-Staroń I.: Fosfolipaza D w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 421–430
- [49] Szumiło M., Rahden-Staroń I.: Fosfolipaza C zależna od fosfatydyloinozytolu w komórkach ssaków – budowa, właściwości i funkcja. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 47–54
- [50] Vance J.E., Vance D.E.: Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem. Cell Biol.*, 2004; 82: 113–128
- [51] Wang N., Du C.Q., Wang S.S., Xie K., Zhang S.L., Miao J.Y.: D609 induces vascular endothelial cells and marrow stromal cells differentiation into neuron-like cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2004; 25: 442–446
- [52] Wang N., Sun C., Huo S., Zhang Y., Zhao J., Zhang S., Miao J.: Cooperation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and basic fibroblast growth factor in the neural differentiation of mesenchymal stem cells *in vitro*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008; 40: 294–306
- [53] Wang N., Xie K., Huo S., Zhao J., Zhang S., Miao J.: Suppressing phosphatidylcholine-specific phospholipase C and elevating ROS level, NADPH oxidase activity and Rb level induced neuronal differentiation in mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, 2007; 100: 1548–1557
- [54] Wu X., Lu H., Zhou L., Huang Y., Chen H.: Changes of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in hepatocarcinogenesis and in the proliferation and differentiation of rat liver cancer cells. *Cell Biol. Int.*, 1997; 21: 375–381
- [55] Wymann M.P., Schneider R.: Lipid signalling in disease. *Nature Rev.*, 2008; 9: 162–176
- [56] Zamorano J., Mora A.L., Boothby M., Keegan A.D.: NF- $\kappa$ B activation plays an important role in the IL-4-induced protection from apoptosis. *Int. Immunol.*, 2001; 13: 1479–1487
- [57] Zamorano J., Rivas M.D., Garcia-Trinidad A., Qu C.K., Keegan A.D.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity is necessary for the activation of STAT6. *J. Immunol.*, 2003; 171: 4203–4209
- [58] Zhang F., Zhao G., Dong Z.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and D in stimulation of RAW264.7 mouse macrophage-like cells by lipopolysaccharide. *Int. Immunopharmacol.*, 2001; 1: 1375–1384
- [59] Zhao J., Miao J., Zhao B., Zhang S.: Upregulating of Fas, integrin  $\beta$ 4 and P53 and depressing of PC-PLC activity and ROS level in VEC apoptosis by safrrole oxide. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 5809–5813
- [60] Zhao Q., Araki S., Zhang S., Miao J.: Rattlesnake venom induces apoptosis by stimulating PC-PLC and upregulating the expression of integrin  $\beta$ 4, p53 in vascular endothelial cells. *Toxicon*, 2004; 44: 161–168
- [61] Zhao Q., Wang N., Jia R., Zhang S., Miao J.: Integrin  $\beta$ 4 is a target of rattlesnake venom during inducing apoptosis of vascular endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.*, 2004; 41: 1–6