

Received: 2015.07.22
Accepted: 2016.08.31
Published: 2016.10.06

Paksylina i jej znaczenie w procesie starzenia komórek skóry*

Paxillin and its role in the aging process of skin cells

Anna Skoczyńska¹, Elżbieta Budzisz¹, Kasjana Podgórna², Helena Rotsztein²

¹Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych, Katedra Kosmetologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Zakład Kosmetologii i Dermatologii Estetycznej, Katedra Kosmetologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Morfologia komórek starzejących ulega ciągłym zmianom na poziomie molekularnym, co zaburza ich funkcjonowanie. Wiąże się to z obniżeniem zdolności do syntezy składowych macierzy zewnątrzkomórkowej oraz dysfunkcją integrzyn i cząsteczek adhezyjnych (cząsteczek adhezji miejscowej). W skórze czynniki te powodują utratę łączności między macierzą zewnątrzkomórkową (Extracellular Matrix) a fibroblastami, co może się przyczyniać do pojawienia oznak starzenia skóry. Celem pracy jest zwrócenie uwagi na niezwykle istotne białko adaptorowe o masie 68 kDa jakim jest paksylina. Do rodziny tej zalicza się Hic-5, PaxB i leupaksynę (leupaxin). Paksylina oddziałuje z białkami wiążącymi aktynę, takimi jak winkulina, aktopaksyna (actopaxin) oraz kinazami związanymi z integrzynami (ILK, Integrin-linked kinase)). Ponadto odgrywa ważną rolę w zachowaniu integralności macierzy. Działanie paksyliny polega na transbłonowym przekaźnictwie sygnałów między integrzynami i czynnikami wzrostu. Paksylina jest matrycą oddziałującą z innymi cząsteczkami adhezyjnymi. Gromadzi ogniskowe cząsteczki adhezyjne, aktywuje uporządkowanie i organizację cytoszkieletu. Przekazywanie sygnału przez paksylinę wpływa na długotrwałe zmiany w ekspresji genów, proliferację komórki, organizację macierzy zewnątrzkomórkowej. Właściwe funkcjonowanie macierzy zewnątrzkomórkowej jest ważne w procesach gojenia, regeneracji i procesach naprawczych tkanek. Spadek lub brak ekspresji paksyliny wywołuje zmiany w strukturze i spójności ECM, a to objawia się pojawieniem cech starzenia komórek i narządów. Przywrócenie połączeń macierzy zewnątrzkomórkowej z komórkami stanowiłoby istotny element w procesach związanych z działaniami o charakterze przeciwstarzeniowym.

Słowa kluczowe:

paksylina • białka adhezji komórkowej • macierz zewnątrzkomórkowa • fibroblasty • starzenie skóry

Summary

Morphology of senescent cells is constantly changing at the molecular level, which in turn leads to disruption of their function. It is connected with reduced ability to synthesize extracellular matrix (ECM) and leads to the dysfunction of integrin adhesion molecules and adhesion clusters. In skin, these factors cause a loss of communication between the extracellular matrix and fibroblasts. This contributes to the appearance of signs of aging. The aim of this study is to draw attention to the very important molecule such as paxillin, which is an adaptor protein with mass of 68 kDa. This family of proteins includes Hic-5, PaxB and leupaxin. Paxillin binds to actin-binding proteins such as vinculin, actopaxin, and kinases (e.g. Integrin-linked kinase

* Praca została wykonana w ramach badań statutowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 503/3-066-02/503-31-001 i 503/3-066-01/503-31-001 oraz grantów finansowanych dla młodych naukowców przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi nr 502-03/3-066-02/502-34-072.

(ILK)). Moreover, it plays an important role in the integrity of the matrix, because it transduces transmembrane signaling between integrins and growth factors. Paxillin is a scaffold protein, activating the arrangement and organization of the cytoskeleton. Signaling through paxillin affects the long-term changes in gene expression, cell proliferation, and organization of the ECM. Correct functioning of the ECM is important for the wound healing processes and regeneration of tissues or tissue repair. Decrease or lack of paxillin expression results in changes in the structure and integrity of the ECM, which are manifested by aging of cells and organs. Restoration of the cellular matrix connections would be a significant element in the processes related to the anti-aging activities.

Key words: paxillin • focal-adhesion proteins • extracellular matrix • aging

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1221385>

Word count: 2416

Tables: –

Figures: 2

References: 68

Adres autorki: prof. dr hab. n. med. Helena Rotsztein, Zakład Kosmetologii i Dermatologii Estetycznej, Katedra Kosmetologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź, e-mail: helena.rotsztein@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **Abl** – kinaza tyrozynowa w mysiej białaczce Abelsona (V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), **C3G** – czynnik wymiany nukleotydu guaninowego (guanine nucleotide exchange factor), **CAKβ/Pyk2/CadTK/RAFTK** – kinaza adhezyjna β (cell adhesion kinase β), **Chk** – kinaza homologiczna do C-końcowej kinazy tyrozynowej Src (CSK-homologous kinase), **Crk** – białko adaptorowe, protoonkogen C-Crk (Adapter molecule), **Crkl** – onkogen (v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like), **Csk** – C-końcowa kinaza tyrozynowa Src (C-terminal Src kinase), **Dock 180** – czynnik wymiany nukleotydu guaninowego (Dedicator of cytokinesis), **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (Extracellular Matrix), **FAK** – kinaza ogniskowo-adhezyjna (Focal Adhesion Kinase), **FAK/CAKβ** – tyrozynowa kinaza białkowa będąca protoonkogenem (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase), **Hic-5** – białko adaptorowe adhezji komórkowej (Hydrogen peroxide-inducible clone-5), **ILK** – kinaza związana z integrynami (Integrin-linked kinase), **isl-1** – czynnik transkrypcyjny z rodziny homeodomeny LIM, **Lck** – kinaza tyrozynowa specyficzna względem limfocytów (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), **LD** – sekwencja zbudowana z leucyny i kwasu asparaginowego (Leucin and Aspartate domain), **LIM** – domena białkowa zbudowana z dwóch przyległych motywów palca cynkowego (akronim Lin11, Isl, Mec-3), **lin-11** – czynnik transkrypcyjny z rodziny homeodomeny LIM, **MCF-7** – linia komórkowa raka piersi (akronim Michigan Cancer Foundation-7), **mec-3** – czynnik transkrypcyjny z rodziny homeodomeny LIM, **PAK3** – kinaza białkowa serynowo-treoninowa (Serine/threonine-protein kinase), **PBS** – sekwencja białkowa wiążąca paksylinę (Paxillin Binding Subdomain), **PIX** – czynnik wymiany nukleotydu oddziaływający z kinazą aktywowaną białkiem p21 (PAK-interacting exchange factor), **PtdIns(3,5)P₂** – fosfatydyloinozytylo-bisfosfonian (phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate), **SA-β-Gal** – β-galaktozydaza związana z procesem starzenia (Senescence Associated-β-Galactosidase), **SAHF** – ogniska heterochromatyny związane z procesem starzenia (Senescence-associated Heterochromatin Foci), **SH2** – konserwatywna domena białkowa zawarta w onkogenie Src oraz białkach przewodzących sygnały wewnątrzkomórkowe (Src Homology 2 domain), **SH3** – mała domena białkowa (60 aminokwasów) homologiczna względem kinazy Src (Src Homology 3 Domain), **Src** – białkowa kinaza tyrozynowa, **STAT3** – przekaźnik sygnałów i aktywator transkrypcji (Signal transducer and activator of transcription 3).



OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PAKSYLINY

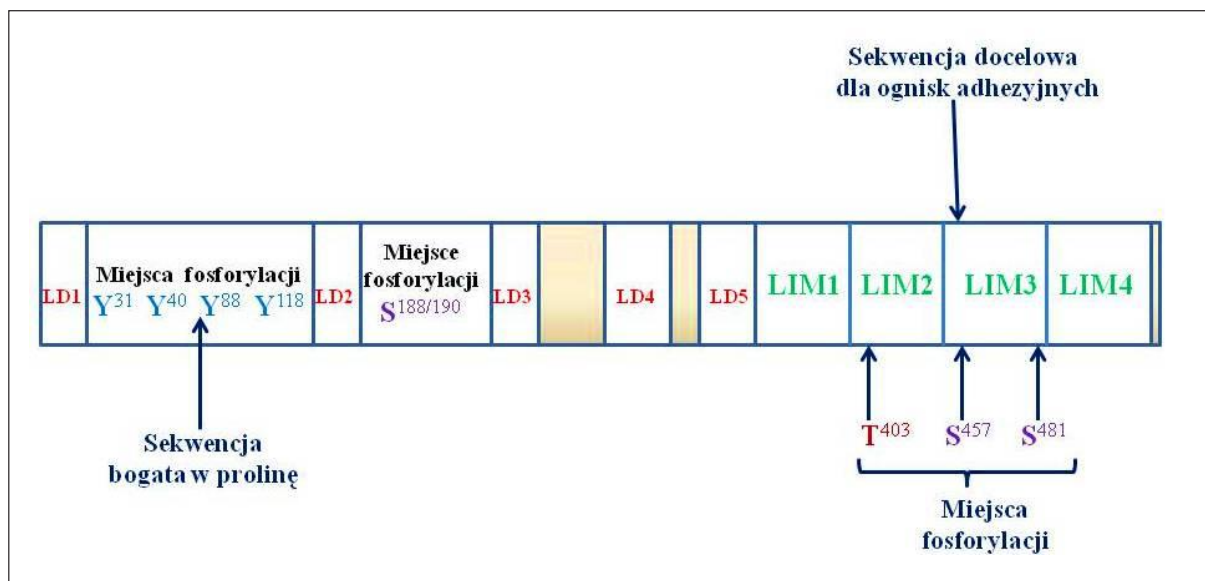
Paksylina jest sygnałowym białkiem adaptorowym, które po raz pierwszy zostało zidentyfikowane jako białko, które uległo transformacji przez onkogen *Src*. Jest zbudowane z 559 aminokwasów o masie około 68 kDa [22,44]. Do tej samej rodziny białek zalicza się Hic-5 (Multidomain LIM protein), PaxB i leupaksyna. Paksylina występuje u wyższych eukariontów w postaci 3 izoform. Pierwsza wyizolowana izoforma paksyliny jest określona jako paksylina α , ponadto opisano również paksylinę β i paksylinę γ [34,44]. Izoformy β i γ zawierają krótki fragment (β -34 aminokwasów; γ -48 aminokwasów) wstawiony między lizyną w pozycji 277 a fenyloalaniną w pozycji 278 [34,44]. Paksylina jest białkiem, które pełni funkcję przez asocjację z innymi białkami, pośredniczy bowiem w przekaźnictwie między integrzynami i czynnikami wzrostu. Paksylina jest transduktorem informacji z ECM, matrycą oddziałującą z innymi cząsteczkami adhezyjnymi. Ponadto aktywuje uporządkowanie i organizację cytoszkieletu, co ma podstawowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek [44,61]. Paksylina jest głównym białkiem, zawierającym fosfotyrozynę, które występuje w okresie rozwoju płodu. N-końcowa domena paksyliny zawiera miejsca wiążące dla dwóch białek ogniskowo-adhezyjnych; FAK (Focal Adhesion Kinase) i winkuliny. Brak domen LIM osłabia wiązanie się paksyliny do ognisk adhezyjnych [44,52]. Paksylina oddziałuje z białkami aktynowymi i z kinazami. Ulega fosforylacji w miejscu gdzie występuje tyrozyna, seryna, treonina w odpowiedzi na komórkową adhezję i/lub różne czynniki wzrostu, cytokiny. Izoforma β w porównaniu do izoformy α w ograniczonym stopniu wiąże się do winkuliny *in vitro*, natomiast izoforma γ nie wykazuje tę aktywność.

BUDOWA I STRUKTURA PAKSYLINY

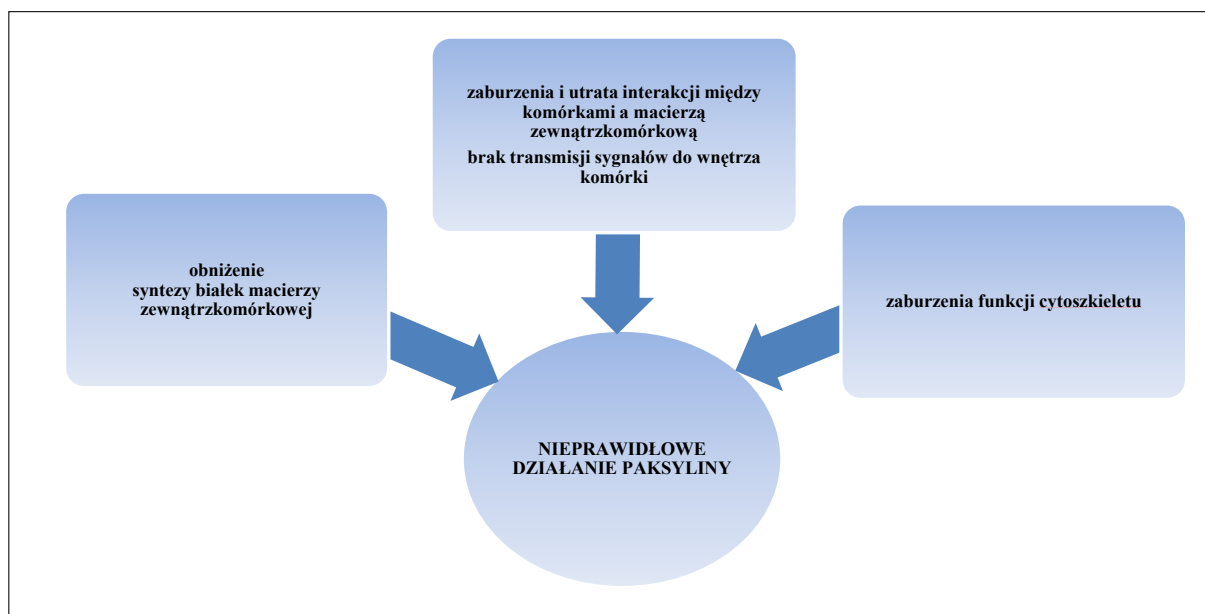
Struktura paksyliny (ryc.1) charakteryzuje się obecnością wielu motywów, które pośredniczą w przekazywaniu oddziaływań między białkami [43,44,56]. N-końiec paksyliny zawiera region bogaty w prolinę, który wiąże domenę SH3 (SRC Homology 3 Domain). Znajduje się również miejsce, które zawiera tyrozynę, wiążącą się do grupy SH2 (Src Homology 2 Domain). N-końcowa domena paksyliny jest zbudowana dodatkowo z pięciu powtórzeń sekwencji leucyny i kwasu asparaginowego, zwanej motywem LD (odpowiednio LD1, LD2, LD3, LD4, LD5), które odgrywają ważną rolę w wiązaniu białek aktynowych i sygnałowych w kompleksy [4,44]. Sekwencje rdzeniowe motywów LD są wysoce konserwatywne. C-końcowa część paksyliny składa się z czterech domen LIM, które należą do struktur wiążących cynk, przez co przypominają domeny palca cynkowego. Początkowo określono je jako trzy czynniki transkrypcyjne: *lin-11*, *isl-1*, *mec-3*. Domeny LIM mogą pełnić funkcję, które polegają na pośredniczeniu w oddziaływaniach między białkami [13,44]. Trzecia domena LIM odgrywa główną rolę w wiązaniu paksyliny do ognisk adhezyjnych [5,44], natomiast druga domena LIM ma najmniejszy udział w tym przypadku. Sekwencja docelowa paksyliny dla ognisk adhezyjnych jest umiejscowiona w C-końcowej części tego białka.

FUNKCJE PAKSYLINY

Paksylina jest ważnym białkiem adaptorowym, które kontroluje rozprzestrzenianie i ruchliwość komórki przez pośrednictwo w transbłonowym przekaźnictwie sygnałów między integrzynami i czynnikami wzrostu. Paksylina przekazuje informacje z macierzy zewnątrz-



Ryc. 1. Schemat budowy paksyliny. Motywy LD leżą w N-końcowej części paksyliny; domeny LIM są położone w obrębie C-końcowej części paksyliny. Zaznaczono również sekwencję bogatą w prolinę i miejsca fosforylacji tyrozyny, które są położone w N-końcowej domenie paksyliny oraz miejsca fosforylacji seryny, treoniny i sekwencję docelową dla ognisk adhezyjnych



Ryc. 2. Skutki nieprawidłowego działania paksyliny na środowisko komórek skóry

trzkomórkowej (Extracellular Matrix, ECM), gromadzi cząsteczki adhezyjne w celu utworzenia kompleksu, aktywuje uporządkowanie i organizację cytoszkieletu [14,44,59]. Właściwe zorganizowanie macierzy zewnątrzkomórkowej pełni istotną rolę w procesach gojenia, regeneracji i naprawczych tkanek [25,26,39,44]. W badaniach prowadzonych u osób chorych na Alzheimera wykazano, że poziom ekspresji paksyliny oraz jej fosforylacja ulega zmianom [9,44]. Pozwala to przypuszczać, że skupiska molekuł adhezyjnych mogą być związane ze starzeniem się mózgu i z procesami neurodegeneracyjnymi [9,44]. Fosforylacja paksyliny jest ważna w adhezji i migracji komórki, jak również w skurczu mięśni. Zaburzenia funkcjonowania m.in. paksyliny mogą się przyczyniać do zaburzeń struktury i funkcjonowania fibroblastów. W związku z tym nie można wykluczyć jej istotnej roli w procesie starzenia. Przekazywanie sygnału przez paksylinę wpływa na długotrwałe zmiany w ekspresji genów, proliferację komórki, organizację macierzy zewnątrzkomórkowej. Paksylina bierze udział w przemieszczaniu się białek, takich jak Abl (V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) [7,31,32] i STAT3 [7,48] z jądra komórkowego do cząsteczek adhezji miejscowej. Paksylina i Hic-5 oddziałują z receptorami steroidowymi. Aktywują receptory androgenowe, progesteronu, glikokortykosteroidów [7,20,30,65]. Wszelkie zaburzenia jej działania wywołują dysfunkcję struktur stanowiących środowisko komórek skóry. Skutki nieprawidłowości w funkcjonowaniu paksyliny przedstawiono na ryc. 2.

ODDZIAŁYWANIA PAKSYLINY Z INNYMI BIAŁKAMI

Motywy LD znajdują się w obrębie *N*-końca paksyliny. Tym obszarem jest region, w którym zachodzą interakcje paksyliny z białkami wiążącymi aktynę i kinazami.

Białka wiążące aktynę

Winkulina jest białkiem ogniskowo-adhezyjnym, które wiąże się do *N*-końcowej domeny paksyliny przez motyw LD1, LD2 i LD4 [5,44,55]. Wiążąca sekwencja w winkulinie leży między 978 a 1000 aminokwasem [44,63]. Sekwencję nazwano subdomeną wiążącą paksylinę PBS (Paxillin Binding Subdomain), a pojawienie się mutacji w obrębie tej sekwencji zakłóca wiązanie się białka do paksyliny. Winkulina zawiera dodatkową sekwencję wiążącą do *N*-końca paksyliny, jak również regiony wiążące się do talin i aktyny. Interakcje z aktyną i taliną są regulowane przez fosfatydyloinozytylo-bisfosfonian (PtdIns(3,5)P₂) [21,44]. Prawdopodobnie winkulina pełni funkcję polegającą na łączeniu cytoszkieletu aktynowego do paksyliny. Porównanie sekwencji regionu winkuliny między pozycją 951 a 1000 z sekwencjami wiążącymi innych partnerów białkowych paksyliny umożliwiło potwierdzenie, że są do siebie podobne [37,38,44,50]. Sekwencja PBS w strukturze winkuliny pełni rolę w umiejscawianiu go w obrębie ognisk adhezyjnych [44,63].

Aktopaksyna (α -parvin) jest białkiem o masie 42 kDa, które wiąże się do motywu LD1 i LD4 paksyliny [37,44]. Aktopaksyna ma dwie homologiczne domeny kalponiny, których funkcja polega na wiązaniu aktyny. Zawiera sekwencję PBS, która również występuje w paksylinie. Paksylina wiąże się z aktopaksyną w celu zakotwiczenia cytoszkieletu aktynowego w ogniskach adhezyjnych, ponadto aktopaksyna i winkulina wprowadzają paksylinę do cytoszkieletu aktynowego, co doprowadza do zgrupowania paksyliny i połączonych białek. Jest to ważny mechanizm, uaktywniający cząsteczki sygnałowe, które są powiązane z paksyliną. Bodziec, który przyczynia się do kurczliwości indukuje fosforylację tyrozyny w paksylinie. Hamowanie polimeryzacji aktyny

lub kurczliwość często powodują zatrzymanie przekazywania sygnałów w ogniskach adhezyjnych [8,44]. W komórkach aktopaksyna występuje w ogniskach adhezyjnych i jej prawidłowe umiejscowienie występuje do czasu wiązania się z paksyliną.

KINAZY

Kinaza związana z integrynami, ILK (Integrin linked kinase pełna nazwa) jest białkową kinazą serynowo/treoninową oraz partnerem wiążącym β -integryny [15,44]. ILK w komórkach umiejscawia się z integrynami w ogniskach adhezyjnych. Ponadto wiąże się swoiście do motywu LD1 paksyliny w warunkach *in vitro* i *in vivo* [38,44]. W obszarze C-końcowej domeny ILK znajduje się sekwencja, która ma powinowactwo do PBS. Zawiera miejsce wiążące się do integryn $\beta 1$ i $\beta 3$, a oddziaływania z domenami podjednostek białek cytoplazmatycznych są istotne dla lokalizacji [15,44]. Wykazano, że mutacje w obrębie sekwencji PBS kinazy ILK również zakłócają interakcje z paksyliną [38,44]. PAK3 (Serine/threonine-protein kinase) może bezpośrednio wiązać się do paksyliny. Miejsce wiążące PIX (PAK-interacting exchange factor), w strukturze kinazy PAK3, leży między 184 a 205 pozycją [27,44]. N-końcowa domena PAK3 wiąże się do domeny LD4 w paksylinie. Zatem PIX i PAK3 współzawodniczą w procesie wiązania się do paksyliny, w związku z czym rozpatruje się dwa mechanizmy oddziaływania z paksyliną, włączające PAK3 do kompleksu sygnałowego. FAK jest partnerem wiążącym paksyliny [28,44,56]. Miejsce wiązania paksyliny kinazy FAK znajduje się w obrębie C-końcowej sekwencji [28,44]. FAK wiąże się do dwóch sekwencji paksyliny w obrębie domeny LD2 i LD4 [5,44]. Paksylina może być jednym z kilku komórkowych białek, których funkcja zmienia się pod wpływem wirusów brodawczaka. Onkoproteina E6 oddziałuje z kilkoma motywami LD paksyliny w warunkach *in vitro*, a w warunkach *in vivo* wykazano, że jest to motyw LD1 [44,54]. Mechanizm aktywacji opiera się na zakłóceniach kompleksu białkowego paksyliny [44,53]. E6 przyczynia się do uszkodzeń w obrębie włókien naprężeniowych, ponieważ oddziaływanie aktyny z paksyliną przez winkulinę i aktopaksynę, mogą zostać zakłócone w wyniku obecności tej onkoproteiny [37,44,53,54]. W warunkach *in vitro* paksylina wiąże się do syntetycznych peptydów, które naśladują działanie domeny $\beta 1$ i $\beta 3$ integryn [44,45]. Paksylina również oddziałuje z domeną $\alpha 4$ 4 razy silniej niż z podjednostkami β integryn [33,44], co sprzyja regulowaniu rozprzestrzeniania i ruchliwości komórki [33,44]. Kinaza ogniskowo-adhezyjna FAK i powiązane z nią białko CAK β /Pyk2/CadTK/RAFTK (Cell Adhesion Kinase β), to główne czynniki kontrolowania fosforylacji tyrozyny w paksylinie. Mechanizm indukowania fosforylacji paksyliny przez kinazy FAK/CAK β i Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase) jest złożony. Aktywacja kinaz powoduje gromadzenie się kinaz Src w kompleksy z kinazą FAK i CAK β . Jednym z substratów kinaz Src jest FAK/CAK β , a następstwem wzrost katalizacyjnej aktywności FAK/CAK β . Kinazy Src mogą pośred-

nio fosforylować paksylinę lub bezpośrednio promują fosforylację paksyliny przez gromadzenie kinaz Src w kompleks, który następnie bierze udział w fosforylacji paksyliny. W zdrowych fibroblastach c-Abl (ABL proto-oncogene 1) może prowadzić do fosforylacji tyrozyny w paksylinie. Do czasu adhezji, c-Abl przemieszcza się z jądra do ognisk adhezyjnych oraz wiąże się z paksyliną [32,44]. Kinaza Csk (C-terminal Src kinase) prawdopodobnie również fosforyluje paksylinę [2,41,51]. Jednak znaczenie fizjologiczne fosforylacji tyrozynowej przez pośrednictwo kinazy Csk nie jest jeszcze wyjaśnione. Zidentyfikowano cztery miejsca podlegające fosforylacji w obrębie N-końcowej domeny paksyliny. Głównymi miejscami, które ulegają fosforylacji są tyrozyna w pozycji 31, 118 oraz 40 i 88 [36,44,46]. Rola fosforylacji tyrozyny polega na stworzeniu miejsca do wiązania paksyliny do białek zawierających domeny SH2. Tyrozyna w pozycji 37, 118 i 181 ma powinowactwo do domeny SH2 w białku adaptorowym Crk i CrkL (v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like), a to prowadzi do powstania kompleksu z paksyliną [3,43,44,46]. Kinazy Crk i CrkL łączą się przez domeny SH3 z innymi cząsteczkami sygnałowymi np. z czynnikiem wymiany nukleotydu guaninowego C3G i Dock 180 [18,44]. Pełnią funkcję w przekazywaniu sygnałów przez paksylinę, by zgromadzić cząsteczki w kompleks. Kinazy Csk i Chk (CSK-homologous kinase) również wiążą się z paksyliną przez domenę SH2 [2,24,41,44,46]. Kinaza Lck (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) należy do rodziny kinaz Src. W warunkach *in vivo* wiąże się z paksyliną w limfocytach T [40,44]. Oddziaływanie jest pośrednie i zachodzi przez domenę SH2 w kinazie Lck, w której w pozycji 40 występuje tyrozyna. To miejsce jest blisko sekwencji bogatej w prolinę i wykazano, że wiąże się do domeny SH3 kinazy Src w warunkach *in vitro* [44,62]. Paksylina ulega wzmoczonej fosforylacji seryny, gdy fibroblasty przyłączają się do fibronektyny lub gdy makrofagi przylegają do witronektyny (Vitronectin) [1,16,44]. Paksylina ulega również fosforylacji na serynie/treoninie podczas mitozy, a w przypadku komórek MCF-7 (linia komórkowa raka piersi) do czasu stymulacji za pomocą heregulin [44,57,64]. Istnieje dowód, że fosforylacja seryny w obrębie 3 domeny LIM może pełnić rolę w regulowaniu umiejscowienia paksyliny [6,43]. Nadekspresja mutantów paksyliny, które nie ulegają fosforylacji w domenie LIM, nieznacznie opóźnia adhezję do fibronektyny. To uzasadnia, że fosforylacja paksyliny prawdopodobnie reguluje adhezję komórki [6,44]. Główna sekwencja docelowa ogniska adhezyjnego leży między 2 i 3 domeną LIM paksyliny. Domeny LIM pośredniczą w oddziaływaniach między białkami w celu osiągnięcia przez paksylinę obszaru ogniska adhezyjnego. Oddziaływania z winkuliną, odgrywają rolę w umiejscowieniu paksyliny w ogniskach adhezyjnych, natomiast brak domeny LIM osłabia proces [43,52].

WPLYW PAKSYLINY NA PROCES STARZENIA KOMÓREK SKÓRY

Komórki starzejące się tracą zdolność do podziału. Charakteryzuje je zmiana morfologii i masy całkowi-

tej, co powoduje zmiany w prawidłowym funkcjonowaniu w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Różnice są spowodowane wzrostem ilości reaktywnych form tlenu (ROS, Reactive Oxygen Species), akumulacją produktów pośrednich działania ROS, takich jak np. lipofuscyna. Dochodzi do zmian w funkcjonowaniu mitochondrium i lizosomów, a to powoduje pojawienie się β -galaktozydazy (SA- β -Gal, Senescence Associated- β -Galactosidase), ognisk heterochromatyny (SAHF, Senescence-associated Heterochromatin Foci) [29,35]. Komórki somatyczne mogą podlegać starzeniu, gdy zachodzi nadekspresja onkogenów Ras i Raf. Wówczas jest to tzw. starzenie indukowane działaniem onkogenów [29,47,68]. Onkogeny powodują nieodwracalne zahamowanie wzrostu komórek. Pojawienie się zmian w cytoszkieletcie może być spowodowane zaburzeniami w funkcjonowaniu fibroblastów, na które składa się utrata ich proliferacji i zdolności do syntezy kolagenu, jak również dysfunkcja integrzyn i ognisk molekuł adhezyjnych [12,23,29]. Są to główne czynniki prowadzące do zaniku łączności między macierzą zewnątrzkomórkową a fibroblastami. Przyczynia się to do pojawienia oznak starzenia skóry. Liczne badania nadal są prowadzone nad problemem zachowania prawidłowego przekazywania sygnałów między ECM a fibroblastami [66]. Varani i Dame [59] zaobserwowali, że w fibroblastach pobranych z nieopalonej skóry osób powyżej 80 r.ż. doszło do zmniejszenia biosyntezy prokolagenu typu I. Degradacja enzymatyczna i nieenzymatyczna (np. wolnorodnikowa) powodująca zmiany strukturalne i funkcjonalne kolagenu, łącznie ze zmianami w strukturze integrzyn i cząsteczkami ogniskowej adhezji prowadzą do utraty funkcjonalności ECM skóry właściwej [19,59,60,66]. Starzejące się fibroblasty wykazują niższy poziom proliferacji oraz mniejszą zdolność do syntezy kolagenu, a to może spowodować lub pogłębiać kliniczne objawy starzenia [59,66]. Paksylina jest białkiem adaptorynym i matrycą oddziaływającą z innymi cząsteczkami adhezyjnymi. Oddziałuje z integrzynami i czynnikami wzrostu, pełniącymi rolę cząsteczek sygnalizacyjnych. Ułatwia to przekazywanie informacji z ECM i organizację wewnątrzkomórkowego cytoszkieletu. Badania Zhenga i wsp. [66] określiły poziom ekspresji genu kodującego paksylinę w ludzkich fibroblastach skóry właściwej, pobranych od 7 młodych (16-25 lat) i 6 starszych (52-77 lat) osób [66]. Znaczny spadek stężenia tego białka wykryto metodą Western blot w fibroblastach pochodzących ze skóry osób starszych. Immunofluorescencyjne analizy ilościowe pozwoliły określić redukcję paksyliny w komórkach osób z tej grupy, która utrzymywała się na poziomie 28,7%, a obszary z niewielką obecnością paksyliny stanowiły punktowe ogniska adhezyjne. Wykazano, że fibroblasty skóry właściwej pozbawione genu kodującego paksylinę charakteryzują się zmniejszoną biosyntezą i wydzielaniem prokolagenu I, co może się przekładać na zmiany struktury i integralności macierzy zewnątrzkomórkowej [59]. Testy badające aktywność paksyliny wzglę-

dem fibroblastów wykazały, że wraz ze zmniejszeniem jej ilości spada integralność struktury komórkowej fibroblastów, a pojawiają się objawy starzenia skóry [66]. Odkryto również, że białko to sprzyja zwiększeniu wydajności fibroblastów, co warunkuje prawidłową organizację macierzy zewnątrzkomórkowej [59,66]. Wiele uwagi poświęca się także innemu biomarkrowi starzenia – progerynie, która jest zmutowaną postacią laminy A. Obecność progeryny powoduje, że u osób starszych pojawiają się zmiany w jądrach komórek skóry, podobne jak u chorych na progerię Hutchinsona-Gilforda. Zmiany te mogą być wywołane wzrostem reaktywnych form tlenu, obniżeniem stężenia enzymów antyoksydacyjnych, modyfikacją histonów i uszkodzeń DNA. Progeryna oddziałuje ze środowiskiem komórki i powoduje zmiany w poziomie i lokalizacji czynników remodelujących chromatynę, czynników transkrypcyjnych i naprawy DNA. Ponadto obniża stężenie enzymów antyoksydacyjnych oraz aktywację proteosomu, zmieniając morfologię jądra komórkowego. Wszystko to wiedzie do hiperprolifracji komórki, zamknięcia cyklu komórkowego, apoptozy i dysfunkcji tkanek i narządów [49]. Dysfunkcja telomerów wpływa na inicjowanie procesu starzenia się komórek [10,49]. Cao i wsp. [10,49] wykazali, że postępujące uszkodzenia w obrębie sekwencji telomerów w starzejących się komórkach aktywują syntezę progeryny. W wycinkach skórnych młodych osób ilość progeryny była poniżej limitu detekcji. Wykazano, że z wiekiem progeryna pojawia się głównie w fibroblastach skóry właściwej i terminalnie zróżnicowanych keratynocytach. W przeciwieństwie do progeryny, zawartość paksyliny w fibroblastach starzejącej się skóry maleje z wiekiem [66]. Przywrócenie połączeń macierzy zewnątrzkomórkowej oraz poprawa elastyczności w skórze właściwej pozostają celami badawczymi w obszarze działań przeciwstarzeniowych skóry.

PODSUMOWANIE

Należy stwierdzić, że problem starzenia skóry jest ciągle aktualny, prowadzi się badania w celu wyjaśnienia roli różnych biomarkerów w procesie starzenia fibroblastów skóry właściwej. Dużo uwagi poświęca się paksylinie, bo uważa się, że zakłócenia syntezy paksyliny w fibroblastach zmieniają ich morfologię i fizjologię. Z tego względu można ją określić jako główny czynnik do walki z oznakami starzenia skóry.

W przygotowywaniu wielu preparatów kosmetycznych bierze się pod uwagę wpływ biomarkerów na komórki skóry. Uznano, że odpowiednia zawartość paksyliny w ludzkich fibroblastach może być utrzymywana dzięki zastosowaniu kompozycji składającej się z jednego lub kilku jej stymulatorów. Opracowane receptury kosmetyczne, które zawierają te stymulatory zostały opatentowane w Stanach Zjednoczonych w 2011 r. [67]. Paksylina i inne molekuły adhezyjne z pewnością będą przedmiotem dalszych badań naukowych.



PIŚMIENNICTWO

- [1] Bellis S.L., Perrotta J.A., Curtis M.S., Turner C.E.: Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. *Biochem. J.*, 1997; 325: 375-381
- [2] Bergman M., Joukov V., Virtanen I., Alitalo K.: Overexpressed Csk tyrosine kinase is localized in focal adhesions, causes reorganization of $\alpha_v\beta_5$, integrin, and interferes with HeLa cell spreading. *Mol. Cell Biol.*, 1995; 15: 711-722
- [3] Birge R.B., Fajardo J.E., Reichman C., Shoelson S.E., Songyang Z., Cantley L.C., Hanafusa H.: Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Mol. Cell Biol.*, 1993; 13: 4648-4656
- [4] Brown M.C., Curtis M.S., Turner C.E.: Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains. *Nat. Struct. Biol.*, 1998; 5: 677-678
- [5] Brown M.C., Perrotta J.A., Turner C.E.: Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J. Cell Biol.*, 1996; 135: 1109-1123
- [6] Brown M.C., Perrotta J.A., Turner C.E.: Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Mol. Biol. Cell*, 1998; 9: 1803-1816
- [7] Brown M.C., Turner C.E.: Paxillin: Adapting to change. *Physiol. Rev.*, 2004; 84: 1315-1339
- [8] Burrige K., Chrzanowska-Wodnicka M.: Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1996; 12: 463-518
- [9] Caltagarone J., Hamilton R.L., Murdoch G., Jing Z., DeFranco D.B., Bowser R.: Paxillin and hydrogen peroxide-inducible-clone 5 expression and distribution in control and Alzheimer disease hippocampi. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2010, 69: 356-371
- [10] Cao K., Blair C.D., Faddah D.A., Kieckhafer J.E., Olive M., Erdos M.R., Nabel E.G., Collins F.S.: Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 2011; 121: 2833-2844
- [11] Chavrier P., Goud B.: The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999; 11: 466-475
- [12] Cristofalo V.J., Kritchevsky D.: Cell size and nucleic acid content in the diploid human cell line WI-38 during aging. *Med. Exp. Int. Exp. Med.*, 1969; 19: 313-320
- [13] Dawid I.B., Breen J.J., Toyama R.: LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.*, 1998; 14: 156-162
- [14] Deakin N.O., Turner C.E.: Paxillin comes of age. *J. Cell Sci.*, 2008; 121: 2435-2444
- [15] Dedhar S.: Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000; 12: 250-256
- [16] De Nichilo M.O., Yamada K.M.: Integrin $\alpha\beta_5$ -dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 11016-11022
- [17] Donaldson J.G., Jackson C.L.: Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000; 12: 475-482
- [18] Feller S.M., Posern G., Voss J., Kardinal C., Sakkab D., Zheng J., Knudsen B.S.: Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins. *J. Cell Physiol.*, 1998; 177: 535-552
- [19] Fisher G.J., Varani J., Voorhees J.J.: Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch. Dermatol.*, 2008; 144: 666-672
- [20] Fujimoto N., Yeh S., Kang H.Y., Inui S., Chang H.C., Mizokami A., Chang C.: Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 8316-8321
- [21] Gilmore A.P., Burrige K.: Regulation of vinculin binding to tallin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature*, 1996; 381: 531-535
- [22] Glenney J.R. Jr., Zokas L.: Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell Biol.*, 1989; 108: 2401-2408
- [23] Greenberg S.B., Grove G.L., Cristofalo V.J.: Cell size in aging monolayer cultures. *In Vitro*, 1977; 13: 297-300
- [24] Grgurevich S., Mikhael A., McVicar D.W.: The Csk homologous kinase, Chk, binds tyrosine phosphorylated paxillin in human blastoc T cells. *Biochem. Res. Commun.*, 1999; 256: 668-675
- [25] Hagel M., George E.L., Kim A., Tamimi R., Opitz S.L., Turner C.E., Imamoto A., Thomas S.M.: The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol. Cell Biol.*, 2002; 22: 901-915
- [26] Hao Q., Rutherford S.A., Low B., Tang H.: Selective regulation of hydrogen peroxide signaling by receptor tyrosine phosphatase- α . *Free Radic. Biol. Med.*, 2006; 41: 302-310
- [27] Hashimoto S., Tsubouchi A., Mazaki Y., Sabe H.: Interaction of paxillin with p21-activated kinase (PAK). Association of paxillin α with the kinase-inactive and the Cdc42-activated forms of PAK3. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 6037-6044
- [28] Hildebrand J.D., Schaller M.D., Parsons J.T.: Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol. Biol. Cell*, 1995; 6: 637-647
- [29] Hwang E.S., Yoon G., Kang H.T.: A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009; 66: 2503-2524
- [30] Kasai M., Guerrero-Santoro J., Friedman R., Leman E.S., Getzenberg R.H., DeFranco D.B.: The Group 3 LIM domain protein paxillin potentiates androgen receptor transactivation in prostate cancer cell lines. *Cancer Res.*, 2003; 63: 4927-4935
- [31] Lewis J.M., Baskaran R., Taagepera S., Schwartz M.A., Wang J.Y.: Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 15174-15179
- [32] Lewis J.M., Schwartz M.A.: Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 14225-14230
- [33] Liu S., Thomas S.M., Woodside D.G., Rose D.M., Kiosses W.B., Pfaff M., Ginsberg M.H.: Binding of paxillin to $\alpha 4$ integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature*, 1999; 402: 676-681
- [34] Mazaki Y., Hashimoto S., Sabe H.: Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 7437-7444
- [35] Muller M.: Cellular senescence: molecular mechanisms, *in vivo* significance, and redox considerations. *Antioxid. Redox Signal*, 2009; 11: 59-98
- [36] Nakamura K., Yano H., Uchida H., Hashimoto S., Schaefer E., Sabe H.: Tyrosine phosphorylation of paxillin alpha is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 27155-27164
- [37] Nikolopoulos S.N., Turner C.E.: Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J. Cell Biol.*, 2000; 151: 1435-1448

- [38] Nikolopoulos S.N., Turner C.E.: Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 23499-23505
- [39] Nishio K., Inoue A.: Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extra ordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. *Histochem. Cell Biol.*, 2005; 123: 263-273
- [40] Ostergaard H.L., Lou O., Arendt C.W., Berg N.N.: Paxillin phosphorylation and association with Lck and Pyk2 in anti-CD3 – or anti-CD44-stimulated T cells. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 5692-5696
- [41] Sabe H., Hata A., Okada M., Nakagawa H., Hanafusa H.: Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 3984-3988
- [42] Salgia R., Li J.L., Lo S.H., Brunkhorst B., Kansas G.S., Sobhany E.S., Sun Y., Pisick E., Hallek M., Ernst T., Tantravahi R., Bo Chen L., Griffin J.D.: Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 5039-5047
- [43] Salgia R., Uemura N., Okuda K., Li J.L., Pisick E., Sattler M., de Jong R., Druker B., Heisterkamp N., Chen L.B., Groffen J., Griffin J.B.: CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 29145-29150
- [44] Schaller M.D.: Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 2001; 20: 6459-6472
- [45] Schaller M.D., Otey C.A., Hildebrand J.D., Parsons J.T.: Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking β integrin cytoplasmic domains. *J. Cell Biol.*, 1995; 130: 1181-1187
- [46] Schaller M.D., Parsons J.T.: pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol. Cell Biol.*, 1995; 15: 2635-2645
- [47] Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W.: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997; 88: 593-602
- [48] Silver D.L., Naora H., Liu J., Cheng W., Montell D.J.: Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesion and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Res.*, 2004; 64: 3550-3558
- [49] Skoczyńska A., Budzisz E., Dana A., Rotsztein H.: New look at the role of progerin in skin aging. *Prz. Menopauzalny*, 2015; 14: 53-58
- [50] Tachibana K., Sato T., D'Avirro N., Morimoto C.: Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J. Exp. Med.*, 1995; 182: 1089-1099
- [51] Takayama Y., Tanaka S., Nagai K., Okada M.: Adenovirus-mediated overexpression of C-terminal Src kinase (Csk) in type I astrocytes interferes with cell spreading and attachment to fibronectin. Correlation with tyrosine phosphorylations of paxillin and FAK. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 2291-2297
- [52] Thomas S.M., Hagel M., Turner C.E.: Characterization of a focal adhesion protein, Hic-5, that shares extensive homology with paxillin. *J. Cell Sci.*, 1999; 112: 181-190
- [53] Tong X., Howley P.M.: The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 4412-4417
- [54] Tong X., Salgia R., Li J.L., Griffin J.D., Howley P.M.: The bovine papillomavirus E6 protein binds to the LD motif repeats of paxillin and blocks its interaction with vinculin and the focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 33373-33376
- [55] Turner C.E., Brown M.C., Perrotta J.A., Riedy M.C., Nikolopoulos S.N., McDonald A.R., Bagrodia S., Thomas S., Leventhal P.S.: Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: a role in cytoskeletal remodeling. *J. Cell Biol.*, 1999; 145: 851-863
- [56] Turner C.E., Miller J.T.: Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J. Cell Sci.*, 1994; 107: 1583-1591
- [57] Vadlamudi R., Adam L., Talukder A., Mendelsohn J., Kumar R.: Serine phosphorylation of paxillin by heregulin-beta 1: role of p38 mitogen activated protein kinase. *Oncogene*, 1999; 18: 7253-7264
- [58] Vande Pol S.B., Brown M.C., Turner C.E.: Association of bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. *Oncogene*, 1998; 16: 43-52
- [59] Varani J., Dame M.K., Rittie L., Fligel S.E., Kang S., Fisher G.J., Voorhees J.J.: Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am. J. Pathol.*, 2006; 168: 1861-1868
- [60] Varani J., Schuger L., Dame M.K., Leonard C., Fligel S.E., Kang S., Fisher G.J., Voorhees J.J.: Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photo-damaged skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2004; 122: 1471-1479
- [61] Webb D.J., Brown C.M., Horwitz A.F.: Illuminating adhesion complexes in migrating cells: moving toward a bright future. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003; 15: 614-620
- [62] Weng Z., Taylor J.A., Turner C.E., Brugge J.S., Seidel-Dugan C.: Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 14956-14963
- [63] Wood C.K., Turner C.E., Jackson P., Critchley D.R.: Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J. Cell Sci.*, 1994; 107: 709-717
- [64] Yamakita Y., Totsukawa G., Yamashiro S., Fry D., Zhang X., Hanks S.K., Matsumura F.: Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK. *J. Cell Biol.*, 1999; 144: 315-324
- [65] Yang L., Guerrero I., Hong H., DeFranco D.B., Stallcup M.R.: Interaction of the $\tau 2$ transcriptional activation domain of glucocorticoid receptor with a novel steroid receptor coactivator, Hic-5, which localizes to both focal adhesions and the nuclear matrix. *Mol. Biol. Cell*, 2000; 11: 2007-2018
- [66] Zheng Q., Chen S., Chen Y., Lyga J., Santhanam U.: Critical role of paxillin in aging of human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2012; 132: 1290-1293
- [67] Zheng Q., Plains M., Wyborski R., Santhanam U., Lyga J. W., Chen S. W.: United States Patent Application Publication Paxillin stimulating compositions and cosmetic uses thereof, US2011/0151029 A1. <http://www.google.com/patents/US20110151029> (05.05.2015)
- [68] Zhu J., Woods D., McMahon M., Bishop J.M.: Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes. Dev.*, 1998; 12: 2997-3007

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.

