

Received: 2007.10.11
Accepted: 2008.01.21
Published: 2008.02.12

Fosfolipaza C zależna od fosfatydyloinozytolu w komórkach ssaków – budowa, właściwości i funkcja

Phosphoinositide-specific phospholipase C in mammalian cells: Structure, properties, and function

Maria Szumiło, Iwonna Rahden-Staroń

Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie

Fosfolipaza C (PLC) katalizuje hydrolizę fosfatydyloinozytolo- 4, 5- bisfosforanu (PIP_2) z wytworzeniem 1,2-diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1, 4, 5-trifosforanu (IP_3). Enzym ten jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie, występuje w komórkach bakterii, drożdży, roślin i ssaków. U ssaków zidentyfikowano podrodziny PLC- β , PLC- γ , PLC- δ , PLC- ϵ , PLC- ζ , PLC- η fosfolipazy C. Uczestniczą one m.in. w wewnątrzkomórkowym przekaźnictwie sygnałów, powstawaniu pęcherzyków wydzielniczych, procesach endocytozy i egzocytozy, funkcjonowaniu kanałów jonowych, procesie mitozy, reorganizacji cytoszkieletu oraz w przekaźnictwie sygnałów w układzie nerwowym. Regulatorami aktywności fosfolipazy C ssaków są jony wapnia, receptory o aktywności kinazy tyrozynowej oraz receptory sprzężone z małymi białkami G z rodziny Ras i Rho. W pracy omówiono strukturę i funkcję biologiczną fosfolipazy C ssaków.

Słowa kluczowe:

fosfolipaza C (PLC) • izoformy PLC- β • PLC- γ • PLC- δ • PLC- ϵ • PLC- ζ • PLC- η • regulatory aktywności PLC • przekaźnictwo sygnałów

Summary

Phospholipase C (PLC) catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) to yield diacylglycerol (DAG) and inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). Phospholipase C activities have been described in several organisms, including bacteria, yeast, plants, and mammals. In mammalian cells, PLC (PLC- β , PLC- γ , PLC- δ , PLC- ϵ , PLC- ζ , and PLC- η isoforms) has been implicated in intracellular signal transduction, vesicle transport, endocytosis, exocytosis, ion channel function, mitosis, cytoskeletal reorganization, and neuronal signal transduction. Mammalian phospholipase C is regulated by many factors, including calcium ions, receptor tyrosine kinases, and small G-proteins of the Ras and Rho families. In this review the structure and biological function of PLC are discussed.

Key words:

phospholipase C (PLC) • isoforms PLC- β • PLC- γ • PLC- δ • PLC- ϵ • PLC- ζ • PLC- η • regulatory activities of PLC • signal transduction

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_62/11541.pdf

Word count: 3840

Tables: –

Figures: –

References: 64

Adres autorki: dr Maria Szumilo, Katedra i Zakład Biochemii AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa;
e-mail: mszumilo@amwaw.edu.pl

Wykaz skrótów: **PLC** – fosfolipaza C; izoenzymy fosfolipazy C: PLC- β , PLC- γ , PLC- δ , PLC- ϵ , PLC- ζ , PLC- η ; **PLD** – fosfolipaza D; **PLA₂** – fosfolipaza A₂; **PH** – domena regulatorowa (plekstrin homology domain); **X i Y** – domeny katalityczne; **EF-hand (EF-hand 1, EF-hand 2, EF-hand 3, EF-hand 4)** – domena regulacyjna (elongation factor hand – domain); **NES** – hydrofobowa sekwencja aminokwasowa w domenie EF-hand; **C2** – domena wchodząca w skład domeny katalitycznej Y; **CBR (CBR-1, CBR-2, CBR-3)** – regiony domeny C2 wiążące jony wapnia (calcium binding regions); **SH2, SH3** – domeny (Src homology domain); **IQ** – dodatkowa sekwencja aminokwasowa występująca tylko w PLC- δ 1; **RasGEF** – domena występująca tylko w PLC- ϵ (Ras guanine nucleotide exchange factor – like domain); **RA** – domena (Ras binding domain); **PIP₃** – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan; **PIP₂** – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; **PIP** – fosfatydyloinozytolo-4-fosforan; **PI** – fosfatydyloinozytol; **IP₃** – inozytolo-1,4,5- trifosforan; **PC** – fosfatydylocholina; **PA** – kwas fosfatydowy; **LPA** – kwas lizofosfatydowy; **DAG** – 1,2-diacylglicerol; **GTP** – guanozynotrifosforan; **PKC** – kinaza białkowa C; **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; **Ras, Src, Fps, Raf** – onkogeny; **Rac1, Rac2, Rac3, RhoA, cdc42** – białka z rodziny Rho hydrolizujące GTP; **RasGRP3** – białko uwalniające nukleotydy guanylowe z białka Ras; **GPRC** – receptory sprzężone z białkami G (G protein coupled receptors); **PDGF** – płytkowy czynnik wzrostu; **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu; **EGFR** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; **NGF** – czynnik wzrostu komórek nerwowych; **IF-6** – interleukina 6; **białko GAP** – białko stymulujące aktywność GTP-azową białek G (GTPase-activating protein).

WSTĘP

Fosfolipazy są integralnymi składnikami błon biologicznych, biorą udział w procesach syntezy i degradacji lipidów błon. Należą do dużej grupy enzymów hydrolizujących fosfolipidy do wolnych kwasów tłuszczowych i innych substancji lipofilnych. Głównymi substratami fosfolipaz są glicerolofosfolipidy, które oprócz cholesterolu, glikolipidów i białek wchodzą w skład błon biologicznych. Złożoność struktur fosfolipidów wpływa na rolę, jaką odgrywają w utrzymywaniu stabilności, płynności i przepuszczalności błon, a w konsekwencji odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie kanałów jonowych i receptorów, czy tworzenie pęcherzyków wydzielniczych. Prawidłowy metabolizm glicerolofosfolipidów polega na równowadze w procesach ich syntezy *de novo*, resyntezy przez reacylację, a procesami katabolicznymi oraz ich transportem. W tych złożonych procesach uczestniczą liczne enzymy, m.in. fosfolipazy.

Fosfolipazy hydrolizujące glicerolofosfolipidy dzielimy na dwie grupy. Do pierwszej grupy należą acylohydro-lazy: fosfolipazy A₁ i A₂, rozkładające odpowiednio wiązania estrowe *sn-1* i *sn-2* fosfolipidów. Do drugiej grupy należą fosfodiesterazy – fosfolipaza C hydrolizująca wiązanie glicerolofosforanowe oraz fosfolipaza D uwalniająca kwas fosfatydowy i cholinę [44,56].

Błony plazmatyczne komórki są bardzo aktywne metabolicznie. Przemiany fosfolipidów błonowych indukowane sy-

gnałami zewnętrznymi są źródłem cząsteczek sygnałowych przekazujących informacje do wnętrza komórki. Kaskada przemian rozpoczynająca się hydrolizą fosfatydyloinozytoli w wewnętrznej błonie plazmatycznej przez fosfolipazę C jest jednym z ważniejszych systemów przekazywania informacji docierających do komórki [36].

FOSFOLIPAZY C – CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

Fosfolipazy C zależne od fosfatydyloinozytoli (PLC, EC 3.1.4.11) są enzymami – fosfodiesterazami, które katalizują hydrolizę fosfatydów (np. fosfatydyloinozytolo-4, 5- bisfosforanu – PIP₂) z wytworzeniem 1,2-diacylglicerolu (DAG) i inozytolo-1, 4, 5-trifosforanu (IP₃). Gen fosfolipazy C leży na chromosomie 2 q33. Fosfolipazy C występują powszechnie w przyrodzie: od bakterii, poprzez grzyby, rośliny do ssaków [59]. Substratami PLC mogą być również fosfatydyloinozytolo-4-fosforan (PIP) lub fosfatydyloinozytol (PI).

Fosfolipazy C odgrywają istotną rolę w przekazaniu sygnałów w komórce. Są głównymi enzymami w metabolizmie fosfatydyloinozytolo-4, 5- bisfosforanu (PIP₂) i w lipidowych szlakach przekazywania sygnałów.

Hydroliza PIP₂ – fosfolipidu błon jest jednym z wczesnych zdarzeń w regulacji różnych funkcji komórkowych. Produktami w tej reakcji są wewnątrzkomórkowe „wtórne przekazywniki” – 1,2-diacylglicerol (DAG) i inozytolo-1, 4,



5-trifosforan (IP_3). DAG bierze udział w aktywacji kinazy białkowej C (PKC), zaś IP_3 w uwalnianiu jonów wapnia Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów. PLC hydrolyzuje PIP_2 umiejscowiony na wewnętrznej stronie błony plazmatycznej. Powstający IP_3 jest rozpuszczalny, dyfunduje przez cytoplazmę i oddziałuje ze swymi receptorami na powierzchni endoplazmatycznego retikulum, powodując uwalnianie jonów wapnia i wzrost ich stężenia w cytoplazmie. Natomiast DAG, który jako związek hydrofobowy pozostaje w wewnętrznej błonie plazmatycznej, aktywuje kinazę białkową C (w obecności jonów wapnia) [40].

Zmniejszenie stężenia PIP_2 w komórce jest samo w sobie ważnym sygnałem wewnątrzkomórkowym, ponieważ związek ten jest aktywatorem fosfolipazy D (PLD) i fosfolipazy A_2 (PLA_2). PIP_2 uczestniczy także w reorganizacji cytoszkieletu. Podczas polimeryzacji aktyny oddziałuje z wiążącymi się z aktyną białkami, a ponadto bierze udział w regulacji procesów endo- i egzocytozy oraz w regulacji funkcji kanałów jonowych. PIP_2 działa jako błonowe miejsce docelowe dla wielu białek sygnałowych zawierających w swej budowie domeny regulatorowe PH (plekstrin homology domains) [8,25,62,63].

FOSFOLIPAZY C SSAKÓW

W organizmach ssaków zidentyfikowano 14 izoform fosfolipazy C (nie uwzględniając wariantów splicingowych), które podzielono na 6 podrodzin: β , γ , δ , ϵ , ζ i η .

Podrodzina β zawiera 4 izoformy (PLC- β 1, PLC- β 2, PLC- β 3, PLC- β 4), podrodzina γ ma 2 izoformy (PLC- γ 1, PLC- γ 2), podrodzina δ ma 4 izoformy (PLC- δ 1, PLC- δ 2, PLC- δ 3, PLC- δ 4), podrodziny ϵ i ζ mają po jednej izoformie (PLC- ϵ i PLC- ζ), zaś podrodzina η ma dwie izoformy (PLC- η 1 i PLC- η 2). Podstawą klasyfikacji fosfolipaz C była homologia sekwencji aminokwasów i mechanizmy aktywacji. Izofomy w podrodzinach różnią się sposobem aktywacji, mechanizmami regulującymi aktywność PLC, podatnością do wiązania się z błoną komórkową, umiejscowieniem w komórce oraz rozmieszczeniem w tkankach.

Wszystkie izoformy hydrolyzują PIP_2 , wytwarzając dwa ważne „wtórne przekazywniki” (DAG i IP_3), które zmieniają wrażliwość komórki na procesy, takie jak: proliferacja, różnicowanie, apoptoza, reorganizacja cytoszkieletu, tworzenie pęcherzyków wydzielniczych, funkcjonowanie kanałów jonowych, działanie układu endokrynnego i przebieganie w układzie nerwowym [15].

Reakcja katalizowana przez fosfolipazę C przebiega dwuetapowo. Głównym substratem jest fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP_2). W pierwszym etapie – fosfotransferazowym – w wyniku oddziaływania grupy 2'hydroksylowej w pierścieniu inozytoli z grupą fosforanową powstaje DAG i cykliczny intermedial IP_3 . W etapie drugim, fosfoesterazowym, z cyklicznym IP_3 reaguje woda i powstaje niecykliczny IP_3 . Bakteryjne formy PLC tworzą jako produkt reakcji – cykliczny IP_3 .

Każda z izoform zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Ich masy cząsteczkowe wynoszą od 75 kDa dla PLC- ζ , 85 kDa dla PLC- δ , 120 kDa do 155 kDa dla PLC- β i dla PLC- γ , do 230–260 kDa dla PLC- ϵ [36,59].

Wszystkie izoformy zawierają dwa regiony o wysokiej homologii sekwencji (40–60% identyczności) zawierające katalityczne domeny X i Y, przedzielone regionami wstawnymi o różnej długości (50–400 aminokwasów). Izoenzymy β , γ , δ zawierają na N-końcu łańcucha polipeptydowego domenę PH (plekstrin homology domain). Domena ta została po raz pierwszy zidentyfikowana w białku plekstrynie i obecnie wiadomo, że występuje w ponad 100 różnych białkach komórkowych. W izoenzymach β , γ , δ występuje ponadto domena EF-hand (elongation factor-hand domain) umiejscowiona pomiędzy domenami PH i X, a także domena C2, którą czasami opisuje się jako część rozciągniętej domeny Y.

Izoformy β i δ zawierają krótką sekwencję 50–70 aminokwasową oddzielającą regiony X i Y, zaś izoforma γ ma długi 400-aminokwasowy odcinek z domenami SH (Src homology domains) – dwie domeny SH2 i jedną domenę SH3. Izofoma ϵ w przeciwieństwie do innych izoform, nie ma domeny PH. Na N-końcu łańcucha znajduje się domena RasGEF (Ras guanine nucleotide exchange factor – like domain), a na C-końcu jedna lub dwie domeny RA (Ras binding domain). W izoformach PLC- β (około 400 aa), PLC- δ i PLC- γ występuje C-końcowy fragment zawierający sekwencje aminokwasowe istotne dla oddziaływania z błonami, lokalizacji jądrowej czy aktywacji z udziałem podjednostek białek G.

Domena PH fosfolipazy C zawiera około 130 aminokwasów, o małej konserwatywności sekwencji wśród izoform. Ponieważ domena PH nie wykazuje właściwości katalitycznych, a występuje w różnych białkach związanych z błonami (np. serynowo-treoninowe kinazy białkowe, tyrozynowe kinazy białkowe, regulatory małych białek G) przypisuje się jej funkcję łącznika białka z powierzchnią błony. Domena PH w PLC ma bardzo duże powinowactwo do PIP_2 i dzięki temu enzym efektywnie hydrolyzuje ten substrat. Domena PH wiąże również podjednostki β i γ białek G, co może mieć znaczenie w regulacji aktywności PLC, zwłaszcza izoform PLC- β 1, PLC- β 2 i PLC- δ 1. W izoformie PLC β 2 podjednostki β i γ białek G mają także inne miejsca wiązania m.in. w pozycji 560–641 łańcucha peptydowego, ale najważniejsze dla aktywności tej izoformy jest miejsce wiązania w domenie PH [40].

Izoenzymy PLC eukariotów mogą zawierać do czterech domen EF-hand (EF-hand 1, EF-hand 2, EF-hand 3, EF-hand 4), występujących najczęściej w parach, podobnie jak w innych białkach zawierających te domeny np. kalmodulinie czy troponinie C. Domena EF-hand zawiera strukturę heliks-pętla-heliks. Domeny EF-hand 1 i EF-hand 2 ssaków, w odróżnieniu od EF-hand 3 i EF-hand 4, są zdolne do wiązania jonów Ca^{2+} lub Mg^{2+} . Domenom EF-hand przypisuje się funkcję regulacyjną, ale mechanizm ich działania pozostaje niewyjaśniony, tym bardziej że fosfolipazy C w niektórych organizmach nie mają tych domen (np. rośliny wyższe) lub utraciły część z nich (np. tylko dwie występują w *Arabidopsis*).

Domena C2, obecna we wszystkich eukariotycznych PLC, zwykle zawiera 120 aminokwasów. Jest częścią obszaru katalitycznego enzymu. Występuje w ponad 50 białkach uczestniczących w przekazywaniu sygnałów i oddziaływaniu z błonami. Domena C2 umiejscowiona jest na C-końcu łań-

cucha PLC i ma trzy odcinki o bardzo konserwatywnej sekwencji (od drożdży do organizmu człowieka), wiążące jony wapnia, zwane CBR (calcium binding regions), np. w izoformie PLC- δ 1 są to CBR-1 (643–653), CBR-2 (675–680) i CBR-3 (706–714). Przypuszcza się, że domena C2 uczestniczy w zależnym od jonów wapnia wiązaniu substratu i w ustawianiu w prawidłowym położeniu domeny katalitycznej PLC względem niego. Domena C2 PLC- β 1 bierze również udział w wiązaniu podjednostki α_q białka G, będącej fizjologicznym aktywatorem tej izoformy [40].

Aktywność PLC jest regulowana przez wiele różnych mechanizmów. Jednym z nich jest aktywacja z udziałem receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR – G protein coupled receptors) poprzez ich podjednostki α_q lub $\beta\gamma$. W innym mechanizmie aktywacja PLC następuje w wyniku oddziaływania z transbłonowymi receptorami mającymi aktywność kinazy tyrozynowej lub z receptorami asocjującymi z cytoplazmatyczną kinazą tyrozynową.

Aktywność wszystkich PLC zależy od obecności jonów Ca^{2+} . Najwrażliwsze na wpływ jonów wapnia są enzymy z podrodziny PLC- δ . Wiele izoform PLC zawiera wiele miejsc wiążących jony wapnia w swym centrum katalitycznym (np. dwie konserwatywne reszty histydyliny – His³¹¹ i His³⁵⁶, które zmodyfikowane np. w wyniku fosforylacji mogą powodować utratę aktywności PLC) [48].

Enzymy reprezentujące poszczególne podrodziny PLC charakteryzują się dużą różnorodnością mechanizmów ich aktywacji:

- PLC- β jest aktywowana przez receptory sprzężone z białkami G poprzez ich podjednostki α_q i $\beta\gamma$,
- PLC- γ jest aktywowana w wyniku fosforylacji reszt tyrozyny po stymulacji receptorowych lub cytosolowych kinaz tyrozynowych,
- PLC- δ jest aktywowana wysokimi stężeniami jonów wapnia i wiąże PIP_2 przez swoją domenę PH. Wydaje się ewolucyjnie najstarszym izoenzymem PLC,
- PLC- ϵ jest aktywowana przez onkogen Ras, ma aktywność PLC i aktywność czynnika wymiany nukleotydów guaninowych swoistego wobec Ras (RasGEF-Ras guanine nucleotide exchange activity),
- PLC- ζ ma mechanizm aktywacji wciąż niewyjaśniony; odgrywa istotną rolę w procesach zapłodnienia i embriogenezy kręgowców,
- PLC- η ma również mechanizm aktywacji niewyjaśniony, bierze udział w prawidłowym funkcjonowaniu neuronów [10,17,53].

Fosfolipazy C wypełniają swoją funkcję katalityczną, przede wszystkim w błonie plazmatycznej, w której są zakotwiczone dzięki obecności w swej cząsteczce domen wiążących lipidy (domeny PH i C2 wykazują powinowactwo do fosfolipidowych składników błon). Obecność PLC wykazano również w cytoplazmie i jądrze komórkowym, jednak wciąż nie jest znana ich funkcja w tych częściach komórki.

FOSFOLIPAZA C – PODRODZINA B (PLC-B)

U ssaków PLC- β występują w czterech izoformach: PLC- β 1, PLC- β 2, PLC- β 3, PLC- β 4 (i w wielu wariantach splicingowych), mają masę cząsteczkową 120–155 kDa.

Zidentyfikowano wiele fosfolipaz C będących homologami izoenzymu β w niższych organizmach, takich jak np.: mięczaki, owady (*Drosophila melanogaster*), płazy (*Xenopus laevis*) czy ptactwo domowe (indyk).

Izoformy PLC- β są różnie umiejscowione w organizmach ssaków. PLC- β 1 występuje w dwóch wariantach splicingowych i ulega ekspresji w wielu tkankach, a największa ilość enzymu jest obserwowana w swoistych regionach mózgu, takich jak: kora mózgowa, komórki piramidalne, mózdzek czy hipokamp. Każda z izoform PLC- β ma najwyższą ekspresję w różnych częściach mózgu, co może wskazywać na ich różną funkcję. PLC- β 2 wykazuje najwyższą ekspresję w płytkach krwi i leukocytach. PLC- β 3 jest obecna w mózgu, wątrobie, przysadce mózgowej i śliniankach. Natomiast PLC- β 4 występuje w siatkówce oka i mózdzku w wielu wariantach splicingowych [16,40].

Izoenzymy PLC- β funkcjonują jako enzymy efektorowe receptorów należących do białek transbłonowych z rodziny rodopsyny zawierających siedem transbłonowych segmentów. PLC- β są aktywowane przez wiele efektorów, zarówno przez bardzo proste związki, jak i przez bardzo złożone białka. Wśród nich m.in. przez podjednostki białek G z udziałem swoich domen C2 i długiego C-końcowego odcinka aminokwasowego (około 400 aa) (PLC- β 1 i PLC- β 4) [37]. Aktywacja PLC- β może być zahamowana przez cAMP po uprzedniej fosforylacji kinazy białkowej C (PKC) [41].

Aktywność wszystkich izoform PLC- β jest regulowana przez podjednostki α_q białka G. Izoformy PLC- β 2 i PLC- β 3 są dodatkowo aktywowane przez podjednostki $\beta\gamma$ białka G i w tej aktywacji uczestniczą ich domeny PH [18]. Mechanizm aktywacji izoform PLC- β pozostaje nie do końca wyjaśniony. Wydaje się, że domena PH izoenzymów PLC- β 2 i PLC- β 3 pełni podwójną rolę: jest miejscem oddziaływania z błoną plazmatyczną i miejscem interakcji z aktywatorem enzymów. PLC- β wiąże się z błoną plazmatyczną niezależnie od związania PIP_2 (tak jak to jest w przypadku wszystkich pozostałych izoenzymów). Preferuje ona wiązanie fosfatydylo-3-fosforanu albo obojętnej błon. Niedawno wykazano, że małe białka G z rodziny Rho (np. Rac1, Rac2, Rac3, cdc42) aktywując PLC- β wiążą się z jej N-końcową domeną PH w innych miejscach niż podjednostki $\beta\gamma$ białka G [51].

W jądrze komórkowym stwierdzono obecność wielu izoform PLC- β , przede wszystkim, PLC- β 1 [19,20,29]. Izoforma PLC- β 1 ma w obrębie długiego C-końcowego odcinka, region kilku aminokwasów zasadowych, funkcjonujący jako sygnał lokalizacji jądrowej. Izoforma PLC- β 1 wydaje się, że jest zaangażowana w procesach wzrostu i różnicowania.

W ostatnich latach wykazano wzrost aktywności izoformy PLC- β 2 w raku sutka u ludzi i udział tego enzymu w podziałach mitotycznych i migracji komórek nowotworowych [3,5,6]. Pojawiły się również doniesienia o kontroli aktywności izoformy PLC- δ 1 przez PLC- β 2, w którym bierze udział domena PH obu izoenzymów [13,37,43,51].

FOSFOLIPAZA C – PODRODZINA γ (PLC- γ)

Enzymy z podrodziny PLC- γ występują w dwóch postaciach: PLC- γ 1 i PLC- γ 2.



PLC- γ 1 ma masę cząsteczkową 120 kDa, zaś PLC- γ 2 155 kDa. Występują w komórkach krwiotwórczych, neuronach, różnych rejonach tkanki mózgowej, komórkach embrionalnych [4]. Są aktywowane przez kinazy tyrozynowe, będące podjednostkami receptorów czynników wzrostu, bądź przez cytosolowe kinazy tyrozynowe z rodziny Src. W aktywacji tej uczestniczą obecne w strukturze PLC- γ dwie domeny SH2 i jedna SH3.

Receptory peptydowych czynników wzrostu, takich jak np. naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu komórek nerwowych (NGF), receptory immunoglobulin i cytokin przekazują informacje do komórki aktywując wiele białek efektorowych, a wśród nich enzymy metabolizujące fosfoinozytydy, takie jak: 3-kinaza fosfatydyloinozytolu czy PLC- γ . Aktywacja tych enzymów mobilizuje z jednej strony magazyny wapniowe retikulum, a z drugiej uruchamia liczne szlaki, w których uczestniczą kinazy białkowe kontrolujące wiele ważnych procesów komórkowych, takich jak podziały komórkowe, transformację, różnicowanie, ruchliwość czy apoptozę.

Izoenzym PLC- γ zostaje zaktywowany w wyniku fosforylacji przez kinazę tyrozynową, będącą integralnym składnikiem cytoplazmatycznej części receptora, a uaktywniona po związaniu się czynników wzrostu z ich receptorami. Pod wpływem EGF lub PDGF w liniach komórkowych B lub T izoforma PLC- γ 1 jest fosforylowana w trzech pozycjach reszt tyrozyny: Tyr⁷⁷¹, Tyr⁷⁸³, Tyr¹²⁵³. Wydaje się, że do pełnej aktywności enzymu potrzebna jest przede wszystkim fosforylacja Tyr⁷⁸³, w mniejszym stopniu Tyr¹²⁵³ i w najmniejszym Tyr⁷⁷¹ [34,48]. Ostatnio wykazano, że aktywność PLC- γ może być również regulowana przez GTP-azy z rodziny Rho (RhoA, Rac1, Rac2, Rac3, cdc42), ale co ciekawe, w opisanym mechanizmie aktywacji PLC- γ nie obserwowano fosforylacji reszt tyrozynowych [39].

Mimo że PLC- γ nie zawiera w swej budowie klasycznych sekwencji sygnału lokalizacji jądrowej, to stwierdza się jej obecność wewnątrz jądra komórkowego, gdzie bierze udział w podziałach, różnicowaniu i wzroście komórek, a także w reorganizacji aktywności w cytoszkielet. Stwierdzono, że stymuluje ona syntezę DNA i podziały komórkowe uspionych fibroblastów NIH 3T3 [29,40]. Podwyższoną aktywność PLC- γ 1 zaobserwowano w nowotworach jelita i gruczołów sutkowych u ludzi [28], zaś w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera wykazano zmniejszenie aktywności PLC- γ 1 w porównaniu z grupą kontrolną [49].

FOSFOLIPAZA C – PODRODZINA δ (PLC- δ)

Podrodzina PLC- δ jest najstarszą filogenetycznie postacią PLC. PLC- δ 1 jest jednym z najpowszechniej występujących izoenzymów PLC w tkankach zwierzęcych (drugim jest PLC- γ 1). Występuje jako jedyny izoenzym u niższych organizmów, takich jak bakterie, drożdże czy grzyby pleśniowe (jedna izoforma).

U ssaków (także u roślin wyższych) obecne są cztery izoformy PLC- δ (1, 2, 3, 4) i ich liczne warianty splicingowe (przede wszystkim PLC- δ 4). Izoenzymy te są białkami zawierającymi wiele domen o masie cząsteczkowej 83–87 kDa (homologia ich sekwencji aminokwasowej waha się

w granicach 45–85%). W swym pojedynczym łańcuchu polipeptydowym zawierają na N-końcu domenę PH (około 120 aa), region EF-hand, części katalityczne X i Y, domenę C2 na C-końcu łańcucha (około 120 aa). PLC- δ nie ma domen SH i dlatego nie może być substratem kinaz tyrozynowych. Izoformy PLC- δ 1 i PLC- δ 3 mają około 14-aminokwasową, bogatą w aminokwasy hydrofobowe (głównie leucynę) sekwencję NES (nuclear export sequence) będącą częścią domeny EF-hand. Sekwencja NES jest odpowiedzialna za ich transport do jądra komórkowego [2,33,35].

Izoformy PLC- δ występują zarówno w cytosolu jak i w błonach plazmatycznych (PLC- δ 1 i PLC- δ 3), a także w błonie jądrowej i wewnątrz jądra komórkowego (PLC- δ 4) [36]. PLC- δ jako jedyny izoenzym PLC ma bardzo duże powinowactwo do PIP₂. Miejsce wiążące ten fosfolipid znajduje się w jego N-końcowej domenie PH.

Najlepiej poznano izoformę PLC- δ 1. Jest ona szeroko rozpowszechniona w tkankach zwierzęcych, choć jest jej znacznie mniej niż izoform PLC- β i PLC- δ . Najwięcej enzymu PLC- δ 1 znaleziono w mięśniach szkieletowych, zwłaszcza w czasie ich różnicowania, w śledzionie, płucach, jądrach i mózgu [2]. Umiejscowiony jest on głównie w cytosolu, choć nie wyklucza się możliwości przemieszczania się do jądra komórkowego [8,62]. Masa cząsteczkowa tego enzymu wynosi 85 kDa. Jego mechanizm działania jest dosyć dobrze opisany. Przebiega w dwóch etapach. Najpierw enzym wiąże się z powierzchnią błony plazmatycznej (proces ten stymuluje kwas fosfatydowy), a następnie reaguje z substratem PIP₂. Po związaniu substratu, PLC- δ 1 w dalszym ciągu pozostaje związany z błoną plazmatyczną.

Spośród wszystkich izoenzymów fosfolipazy C najbardziej wrażliwe na obecność jonów wapnia są izoenzymy PLC- δ . Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca²⁺ powoduje wzrost powinowactwa PLC- δ do substratu (prawie 20-krotne obniżenie K_m). W sytuacji, gdy region katalityczny wykazuje słabe powinowactwo do PIP₂, w wiązaniu substratu pomaga domena C2 razem z jonami Ca²⁺. Domena ta może wiązać co najmniej dwa jony wapnia [15,62].

Niedawno wykazano nowy mechanizm regulacji aktywności PLC- δ 1 wymagający bezpośredniej interakcji enzymu z małym białkiem G- Ra1 i kalmoduliną. Odbywa się to poprzez odkryty w ostatnich latach motyw IQ (poza regionem katalitycznym) wiążący oba białka, a niewystępujący w pozostałych izoformach PLC. Związanie kalmoduliny w obrębie motywu IQ hamuje aktywność PLC- δ 1. Zahamowanie aktywności zostaje cofnięte po dodaniu białka Ra1 [50].

W przeciwieństwie do PLC- β i PLC- δ ani kaskada fosforylacji białek, ani podjednostki białek G nie wpływają na aktywność PLC- δ 1. Poza jonami wapnia regulatorami aktywności PLC- δ 1 mogą być liczne poliaminy, fosfolipidy oraz swoiste białka. Aktywatorami PLC- δ 1 są: spermina, sfingozyna (i jej analogi), kwas fosfatydowy, fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina, białko GAP (Rho GTPase-activating protein) i nietypowe białko G (G_i).

Jednym z lepiej poznanych białkowych aktywatorów PLC- δ 1 jest G_i. To nietypowe białko G występuje w wielu tkankach.

Jest enzymem o masie 74–87 kDa, zbudowanym z wielu domen o różnych aktywnościach katalitycznych. Białko G_h katalizuje hydrolizę GTP oraz ATP, a także ma aktywność transglutaminazy, która katalizuje albo transamidację reszt glutaminowych z poliamin albo też powstawanie wiązań – mostków między białkami poprzez γ -glutamylowe reszty lizyny. Enzym G_h może również te wiązania hydrolizować. Związanie GTP przez białko G_h hamuje jego aktywność transamidową. G_h występuje zarówno w cytosolu, jak i w błonach (także jądrowej). Jego ekspresja podlega precyzyjnej regulacji. Wzrost ekspresji mRNA G_h wykazano podczas różnicowania, a także w obecności interleukiny 6 (IL-6), interferonu- β i kwasu retinowego [28].

Stwierdzono, że sfingomielina, fosfatydyloseryna, ceramid, gangliozyd oraz małe monomeryczne białko G z rodziny RhoA hamują aktywność PLC- δ 1 [13,28]. Z kolei białko GAP (Rho GTPase-activating protein) hydrolizując GTP w RhoA powoduje zahamowanie aktywności białka RhoA i tym samym jest stymulatorem aktywności PLC- δ 1 [28].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o kontroli aktywności izoenzymu PLC- δ 1 przez PLC- β 2. Odbywa się to w wyniku asocjacji obu izoenzymów ze sobą w fizjologicznych stężeniach jonów wapnia w komórce (10^{-7} mola/l). Kompleks PLC- β 2 i PLC- δ 1, powstający głównie w błonie plazmatycznej, gdzie obecny jest substrat PIP₂, powoduje zahamowanie aktywności izoenzymu PLC- δ 1. Mechanizm tego hamowania nie jest do końca poznany. Ponieważ domeny PH obu enzymów odgrywają rolę w ich aktywności katalitycznej i ponieważ domeny PH obu enzymów wiążą podjednostki $\beta\gamma$ białka G, wydaje się, że właśnie ten region bierze udział w hamowaniu aktywności PLC- δ 1 [13].

Wiedza o funkcji fizjologicznej PLC- δ 1 jest ograniczona. Białku temu przypisuje się rolę amplifikatora poziomu jonów wapnia wewnątrz komórki [31]. Wydaje się, że PLC- δ 1 odgrywa rolę w rozwoju nadciśnienia u ludzi. Obserwowany wzrost aktywności PLC- δ 1 w nadciśnieniu tętniczym skorelowany jest ze zmianami w składzie fosfolipidów błon naczyń krwionośnych (przede wszystkim spadek zawartości sfingomieliny) [22]. Natomiast w chorobach neurodegeneracyjnych u ludzi np. w chorobie Alzheimera wykazano zmiany w umiejscowieniu izoenzymu PLC- δ 1 w różnych regionach mózgu, a także wzrost ilości enzymu we frakcji cytosolowej, kosztem frakcji błonowej w części korowej mózgu. Przemieszczeniu się enzymu towarzyszył wzrost jego aktywności [12,35,38,49].

Stosunkowo niewiele wiadomo o pozostałych izoformach podrodziny PLC- δ : PLC- δ 2, PLC- δ 3, PLC- δ 4. Ekspresję PLC- δ 2 wykazano w rdzeniu kręgowym, ale nie stwierdzono jej w mięśniach szkieletowych, w komórkach układu pokarmowego i limfatycznego, ani też w komórkach krwiotwórczych [33]. Postać PLC- δ 3 występuje w niewielkich ilościach w większości komórek i tkanek, najwięcej jest jej w nerkach, mięśni sercowym i w aorcie. Pomiedzy odcinkami katalitycznymi X i Y ma fragment złożony z 13 kwaśnych aminokwasów (głównie reszty kwasu glutaminowego), co różni go od pozostałych izoenzymów PLC- δ . PLC- δ 3 wykazuje dużą swoistość wiązania się z błonami zawierającymi PIP₂ lub kwas fosfatydowy [33]. Izoforma PLC- δ 3 jest niewrażliwa na sperminę i sfingozynę [40].

Obecność PLC- δ 1 i PLC- δ 3 jest konieczna dla prawidłowego rozwoju trofoblastów w łożysku [31].

Izoforma PLC- δ 4 jest również szeroko rozpowszechniona. Zidentyfikowano wiele wariantów alternatywnego splicingu mRNA dla PLC- δ 4. Występuje on przede wszystkim w jądrze komórkowym. Jest białkiem błonowym. Ulega ekspresji w mięśniach szkieletowych, w nerkach, wątrobie, w różnych odcinkach układu pokarmowego (żołądek, jelito grube, odbyt), w jądrach i tkance mózgowej. Pełni główną rolę w proliferacji komórek. Zwiększoną ekspresję PLC- δ 4 zaobserwowano w szybko rosnących komórkach mysich, takich jak regenerująca wątroba czy komórki nowotworowe np. hepatoma, komórki po transformacji onkogenem Src [1,32,40,45]. W nowotworach u ludzi również wykazano zmiany aktywności PLC- δ 4. Spadek aktywności enzymu obserwowano w: gruczole krokowym, tarczycy, skórze, trzustce, natomiast w nowotworach sutka, jąder, płuca i macicy wykazano wzrost aktywności PLC- δ 4 w porównaniu z tkankami zdrowymi. Na podstawie wyników badań z zastosowaniem linii komórek raka sutka MCF-7 postawiono hipotezę, że zaburzenia ekspresji PLC- δ 4 mogą prowadzić do inicjacji procesu onkogenezy w niektórych tkankach [9,24,26,27,57,58].

INNE PODRODZINY FOSFOLIPAZY C (PLC- ϵ , PLC- ζ , PLC- η)

Enzymy z podrodziny PLC- ϵ i PLC- ζ występują w pojedynczych postaciach.

PLC- ϵ mają masę cząsteczkową 230–260 kDa i są aktywowane przez małe białka G z rodziny Ras i RhoA [61]. Pośredniczą w przenoszeniu sygnałów od receptorów związanych z białkami G w dwojaki sposób, tzn. poprzez hydrolizę fosfatydyloinozytolu oraz poprzez bezpośrednią aktywację szlaku kinazy białkowej zależnej od mitogenów (Ras/MAPK) [26,47,52,55,60]. Niedawno zaobserwowano aktywację izoformy PLC- ϵ w wyniku pobudzenia receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Pobudzony receptor aktywuje izoformę PLC- γ 1 i białko c-Src, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji białka RasGRP3 (białko uwalniające nukleotydy guanylowe z białka Ras). Białko RasGRP3 aktywuje izoformę PLC- ϵ [14,21,54,61]. Wykazano, że PLC- ϵ bierze również udział w hamowaniu aktywacji integryny, białka transbłonowego występującego u większości zwierząt, uczestniczącego m. in. w przekazaniu sygnałów do komórki [23].

PLC- ζ ma masę cząsteczkową 75 kDa. Największe ilości PLC- ζ zaobserwowano w nasieniu i oocytach kręgowców. Izoenzym ten bierze udział w procesach zapłodnienia i rozwoju embrionalnego, wpływając na wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w zapłodnionym jajku [46]. W środowisku o małym stężeniu jonów wapnia, w ludzkich oocytach PLC- ζ stymuluje partenogenetyczną aktywację oocytów [42].

PLC- ζ , podobnie jak PLC- δ 1 i PLC- β ma zasadowe sekwencje umożliwiające jej transport i lokalizację jądrową [29].

Enzymy z podrodziny PLC- η występują w dwóch izoformach (PLC- η 1, PLC- η 2). Ostatnio wyizolowano PLC- η z mózgu człowieka i myszy zawierające w swej strukturze katalityczne domeny X i Y, domenę C2 oraz domenę



PH. Gen ludzkiej PLC- η koduje 1002 aminokwasy, gen mysz 1003. Ich masa cząsteczkowa wynosi około 115 kDa. Obecność różnych wariantów splicingowych PLC- η wykazano w różnych tkankach zwierzęcych, ale tylko mózg i płuca mają tę samą postać 115 kDa enzymu. Do aktywności enzymów potrzebne są jony Ca^{2+} . W analizie hybrydyzacji *in situ* wykazano obecność PLC- η w wielu regionach mózgu, takich jak: kora mózgowa, hipokamp, strefa niepewna (zona incerta) oraz mózdzek, co potwierdza udział PLC- η w prawidłowej pracy neuronów w mózgu [17,38,53,64].

Opisany niedawno PLC- η 2 jest enzymem bardzo swoistym, występującym tylko w neuronach hipokampu, kory mózgowej i opuszce węchowej. Jest złożony z konserwatywnych domen, takich jak: domena PH, EF-hand, domen katalitycznych X i Y, domeny C2 i swoistego C-końcowego regionu. PLC- η 2 zawiera 1164 aminokwasy i ma masę cząsteczkową 125 kDa. PLC- η 2 jest bardziej wrażliwy na stężenie jonów wapnia niż izoenzymy PLC- δ , które dotychczas były uważane za najbardziej wrażliwe [30].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Akutagawa A., Fukami K., Banno Y., Takenawa T., Kannagi R., Yokoyama Y., Oda K., Nagino M., Nimura Y., Yoshida S., Tamiya-Koizumi K.: Disruption of phospholipase C δ 4 gene modulates the liver regeneration in cooperation with nuclear protein kinase C. *J. Biochem.*, 2006; 140: 619–625
- [2] Ananthanarayanan B., Das S., Rhee S.G., Murray D., Cho W.: Membrane targeting of C2 domains of phospholipase C- δ isoforms. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 3568–3575
- [3] Bach T.L., Chen Q.M., Kerr W.T., Wang Y., Lian L., Choi J.K., Wu D., Kazanietz M.G., Koretzky G.A., Zigmund S., Abrams C.S.: Phospholipase c β is critical for T cell chemotaxis. *J. Immunol.*, 2007; 179: 2223–2227
- [4] Bae Y.S., Lee T.G., Park J.C., Hur J.H., Kim Y., Heo K., Kwak J.Y., Suh P.G., Ryu S.H.: Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol. Pharmacol.*, 2003; 63: 1043–1050
- [5] Bertagnolo V., Benedusi M., Brugnoli F., Lanuti P., Marchisio M., Querzoli P., Capitani S.: Phospholipase C- β 2 promotes mitosis and migration of human breast cancer derived cells. *Carcinogenesis*, 2007; 28: 1638–1645
- [6] Cai Y., Stafford L.J., Bryan B.A., Mitchell D., Liu M.: G-protein-activated phospholipase C- β , new partners for cell polarity proteins Par3 and Par6. *Oncogene*, 2005; 24: 4293–4300
- [7] Cockcroft S.: The latest phospholipase C, PLC- η , is implicated in neuronal function. *Trends Biochem. Sci.*, 2006; 31: 4–7
- [8] Czech M.P.: PIP $_2$ i PIP $_3$: complex roles at the cell surface. *Cell*, 2000; 100: 603–606
- [9] de Bono J.S., Rowinsky E.K.: The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol. Med.*, 2002; 8: S19–S26
- [10] Frye C.A., Wolf A.A.: In the ventral tegmental area, the membrane-mediated actions of progesterin for lordosis of hormone-primed hamsters involve phospholipase C and protein kinase C. *J. Neuroendocrinol.*, 2007; 19: 717–724
- [11] Fukami K.: Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J. Biochem.*, 2002, 131: 293–299
- [12] Gryckiewicz E., Dettlaff A., Pawelczyk T.: Increased activity of phospholipase C in aorta of spontaneously hypertensive rats correlates with decreased sphingomyelin: total phospholipid ratio. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 1998; 3: 3–11
- [13] Guo Y., Rebecchi M., Scarlata S.: Phospholipase C β 2 binds to and inhibits phospholipase C δ 1. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 1438–1447
- [14] Hains M.D., Wing M.R., Maddileti S., Siderovski D.P., Harden T.K.: G α 12/13- and Rho-dependent activation of phospholipase C- ϵ by lysophosphatidic acid and thrombin receptors. *Mol. Pharmacol.*, 2006; 69: 2068–2075
- [15] Horowitz L.F., Hirdes W., Suh B.C., Hilgemann D.W., Mackie K., Hille B.: Phospholipase C in living cells: Activation, inhibition, Ca^{2+} requirement, and regulation of M current. *J. Gen. Physiol.*, 2005; 126: 243–262
- [16] Hwang J.I., Kim H.S., Lee J.R., Kim E., Ryu S.H., Suh P.G.: The interaction of phospholipase C-beta3 with shank2 regulates mGluR-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 12467–12473
- [17] Hwang J.I., Oh Y.S., Shin K.J., Kim H., Ryu S.H., Suh P.G.: Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC- η . *Biochem. J.*, 2005; 389: 181–186
- [18] Ilkkaeva O., Kinch L.N., Paulssen R.H., Ross E.M.: Mutations in the carboxyl-terminal domain of phospholipase C- β 1 delineate the dimer interface and a potential G α_q interaction site. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 4294–4300
- [19] Irvine R.F.: Nuclear lipid signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003; 4: 349–360
- [20] Irvine R.F.: Nuclear inositol signalling – expansion, structures and clarification. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1761: 505–508
- [21] Kelley G.G., Kaproth-Joslin K.A., Reks S.E., Smrcka A.V., Wojcikiewicz R.J.: G-protein-coupled receptor agonists activate endogenous phospholipase C- ϵ and phospholipase C- α 3 in a temporally distinct manner. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 2639–2648
- [22] Kosugi T., Osanai T., Kamada T., Nakano T., Okumura K.: Phospholipase C activity in skin fibroblasts obtained from patients with essential hypertension. *J. Hypertens.*, 2003; 21: 583–590
- [23] Lad Y., McHugh B., Hodgkinson P.S., MacKinnon A.C., Haslett C., Ginsberg M.H., Sethi T.: Phospholipase C α suppresses integrin activation. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 29501–29512
- [24] Lee C.S., deFazio A., Ormandy C.J., Sutherland R.L.: Inverse regulation of estrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells treated with phorbol ester. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1996; 58: 267–275
- [25] Lemmon M.A.: Phosphoinositide recognition domains. *Traffic*, 2003; 4: 201–213
- [26] Leung D.W., Tompkins C., Brewer J., Ball A., Coon M., Morris V., Waggoner D., Singer J.W.: Phospholipase C δ -4 overexpression upregulates ErbB1/2 expression, Erk signaling pathway, and proliferation in MCF-7 cells. *Mol. Cancer*, 2004; 3: 1–15
- [27] Liu S., Liu W., Jakubczak J.L., Erexson G.L., Tindall K.R., Chan R., Muller W.J., Adhya S., Garges S., Merlino G.: Genetic instability favoring transversions associated with ErbB2-induced mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 3770–3775
- [28] Lynn J.S., Hughes A.D.: Phospholipase C isoforms, cytoskeletal organization, and vascular smooth muscle differentiation. *News Physiol. Sci.*, 2000; 15: 41–45

PODSUMOWANIE

Fosfolipaza C (PLC) jest najważniejszym enzymem w metabolizmie fosfatydyloinozytolu (PIP $_2$) i lipidowych szlakach przekazywania sygnałów. PLC wytwarza „wtórne przekaźniki” w błonie plazmatycznej: diacyloglicerol (DAG) i trifosforan inozytolu (IP $_3$).

W przedstawianej pracy zebrano aktualną wiedzę na temat aktywności katalitycznej fosfolipazy C, jej aktywatorów i inhibitorów oraz roli w organizmie. Do najważniejszych receptoriów PLC zaliczamy receptorowe małe białka G, transbłonowe receptory z aktywnością kinaz tyrozynowych oraz jony wapnia.

Fosfolipazy C, będąc głównymi enzymami zaangażowanymi w szlakach przekazywania sygnałów i uczestnicząc w regulacji licznych funkcji komórkowych mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie wielu chorób, takich jak nadciśnienie, choroba wieńcowa, nowotwory czy choroba Alzheimera.

- [29] Manzoli L., Billi A.M., Martelli A.M., Coco L.: Regulation of nuclear phospholipase C activity. *Acta Biochim. Polon.*, 2004, 51: 391–395
- [30] Nakahara M., Shimozawa M., Nakamura Y., Irino Y., Morita M., Kudo Y., Fukami K.: A novel phospholipase C, PLC η 2, is a neuron-specific isozyme. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 29128–29134
- [31] Nakamura Y., Hamada Y., Fujiwara T., Enomoto H., Hiroe T., Tanaka S., Nose M., Nakahara M., Yoshida N., Takenawa T., Fukami K.: Phospholipase C- δ 1 and - δ 3 are essential in the trophoblast for placental development. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 10979–10988
- [32] Nakano T., Osanai T., Tomita H., Sekimata M., Homma Y., Okumura K.: Enhanced activity of variant phospholipase C- δ 1 protein (R257H) detected in patients with coronary artery spasm. *Circulation*, 2002; 105: 2024–2029
- [33] Ochocka A.M., Pawelczyk T.: Isozymes delta of phosphoinositide-specific phospholipase C and their role in signal transduction in the cell. *Acta Biochim. Polon.*, 2003; 50: 1097–1110
- [34] Oh-hora M., Johmura S., Hashimoto A., Hikida M., Kurosaki T.: Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C- γ 2 to Ras in B cell receptor signaling. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 1841–1851
- [35] Pawelczyk T.: Isozymes delta of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Acta Biochem. Polon.*, 1999; 46: 91–98
- [36] Pawelczyk T.: Przekazywanie sygnału w komórce z udziałem fosfatyloinozytoloswoistych fosfolipaz C. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1999; 53: 173–182
- [37] Philip F., Guo Y., Scarlata S.: Multiple roles of pleckstrin homology domains in phospholipase C β function. *FEBS Lett.*, 2002; 531: 28–32
- [38] Phillis J.W., O'Regan M.H.: A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2004; 44: 13–47
- [39] Piechulek T., Rehlen T., Walliser C., Vatter P., Moepps B., Gierschik P.: Isozyme-specific stimulation of phospholipase C- γ 2 by Rac GTPases. *J. Biol. Chem.*, 2004; 280, 38923–38931
- [40] Rebecchi M.J., Pentyala S.N.: Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.*, 2000; 80: 1291–1335
- [41] Rhee S.G.: Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001; 70: 281–312
- [42] Rogers N.T., Hobson E., Pickering S., Lai F.A., Braude P., Swann K.: Phospholipase C ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction*, 2004; 128: 697–702
- [43] Ross E.M., Mateu D., Gomes A.V., Arana C., Tran T., Litoch I.: Structural determinants for phosphatidic acid regulation of phospholipase C- β 1. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 33087–33094
- [44] Sadurska B., Szumiło M.: Fosfolipazy A w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 116–123
- [45] Santi P., Solimando L., Zini N., Santi S., Riccio M., Guidotti L.: Inositol-specific phospholipase C in low and fast proliferating hepatoma cell lines. *Int. Oncol.*, 2003; 22: 1147–1153
- [46] Saunders C.M., Larman M.G., Parrington J., Cox L.J., Royle J., Blayney L.M., Swann K., Lai F.A.: PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 2002; 129: 3533–3544
- [47] Seifert J.P., Wing M.R., Snyder J.T., Gershburg S., Sondek J., Harden T.K.: Rho A activates purified phospholipase C- ϵ by a guanine nucleotide-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 47992–47997
- [48] Sekiya F., Poulin B., Kim Y.J., Rhee S.G.: Mechanism of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C – gamma1. Tyrosine 783 phosphorylation is not sufficient for lipase activation. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 32181–32190
- [49] Shimohama S., Sasaki Y., Fujimoto S., Kamiya S., Taniguchi T., Takenawa T., Kimura J.: Phospholipase C isozymes in the human brain and their changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 1997; 82: 999–1007
- [50] Sidhu R.S., Clough R.R., Bhullar R.P.: Regulation of phospholipase C- δ 1 through direct interactions with the small GTPase Ra1 and calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 21933–21941
- [51] Snyder J.T., Singer A.U., Wing M.R., Harden T.K., Sondek J.: The pleckstrin homology domain of phospholipase C- β 2 as an effector site for Rac. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 21099–21104
- [52] Song C., Hu C.D., Masago M., Kariyai K., Yamawaki-Kataoka Y., Shibatohe M., Wu D., Satoh T., Kataoka T.: Regulation of a novel human phospholipase C, PLC- ϵ , through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 2752–2757
- [53] Stewart A.J., Mukherjee J., Roberts S.J., Lester D., Farquharson C.: Identification of a novel class of mammalian phosphoinositol-specific phospholipase C enzymes. *Int. J. Mol. Med.*, 2005; 15: 117–121
- [54] Stope M.B., vom Dorp F., Szatkowski D., Bohm A., Keiper M., Nolte J., Oude Weernink P.A., Roskopf D., Evellin S., Jakobs K.H., Schmidt M.: Rap 2B-dependent stimulation of phospholipase C- ϵ by epidermal growth factor receptor mediated by c-Src phosphorylation of Ras-GRP3. *Mol. Cell Biol.*, 2004; 24: 4664–4676
- [55] Szamałek M., Baer-Dubowska W.: Białka RasGRP – czynniki aktywujące Ras. *Post. Biochem.*, 2007; 53: 112–120
- [56] Szumiło M., Rahden-Staroń I.: Fosfolipaza D w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 421–430
- [57] Tachibana T., Noguchi K., Ruda M.A.: Analysis of gene expression following spinal cord injury in rat using complementary DNA microarray. *Neurosci. Lett.*, 2002; 327:133–137
- [58] Tilli C.M., Ramaekers F.C., Broers J.L., Hutchison C.J., Neumann H.A.: Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, 2003; 148: 102–109
- [59] Williams R.L.: Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1441: 255–267
- [60] Wing M.R., Bourdon D.M., Harden T.K.: PLC- ϵ : a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G $\alpha\beta\gamma$ -mediated signaling. *Mol. Interv.*, 2003; 5: 273–280
- [61] Wing M.R., Snyder J.T., Sondek J., Harden T.K.: Direct activation of phospholipase C- ϵ by RhoA. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 41253–41258
- [62] Yagisawa H., Yamaga M., Okada M., Sasaki K., Fujii M.: Regulation of the intracellular localization of phosphoinositide-specific phospholipase C- δ 1. *Advan. Enzyme Regul.*, 2002; 42: 261–284
- [63] Yin H.L., Janmey P.A.: Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.*, 2003; 65: 761–789
- [64] Zhou Y., Wing M.R., Sondek J., Harden T.K.: Molecular cloning and characterization of PLC- η 2. *Biochem. J.*, 2005; 391: 667–676

