

Received: 2006.05.04
Accepted: 2006.07.12
Published: 2006.08.09

Fosfolipaza D w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna

Phospholipase D in mammalian cells: structure, properties, physiological and pathological role

Maria Szumiło, Iwonna Rahden-Staroń

Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

Fosfolipaza D (PLD) jest enzymem hydrolizującym wiązanie fosfodiesterowe glicerolipidu fosfatydylocholine z wytworzeniem kwasu fosfatydowego (PA) i choline. Kwas fosfatydowy jest wewnątrzkomórkowym lipidowym mediatorem wielu funkcji biologicznych przypisywanych PLD. PA jest prekursorem wielu innych bioaktywnych lipidów, takich jak np. diacyloglicerol (DAG) czy kwas lizofosfatydowy (LPA). Fosfolipaza D jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie, występuje u bakterii i drożdży, w roślinach i ssakach. U ssaków fosfolipazy D (izoformy PLD1 i PLD2) uczestniczą m.in. w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów, w powstawaniu i transporcie pęcherzyków sekrecyjnych, w procesach endocytozy i egzocytozy, migracji komórek, mitozie oraz reorganizacji cytoszkieletu. Regulatorami aktywności fosfolipazy D ssaków są fosfatydyloinozitol-4,5-bisfosforan (PIP₂), kinaza białkowa C (PKC), a także małe białka G z rodziny Rho, Ral i ARF. W pracy omówiono strukturę, funkcję biologiczną fosfolipazy D oraz jej udział w stanach patologicznych.

Słowa kluczowe:

fosfolipaza D (PLD) • izoformy PLD1 • PLD2 • regulatory aktywności PLD • kwas fosfatydowy • przekazywanie sygnałów

Summary

Phospholipase D (PLD) catalyzes the hydrolysis of the phosphodiester bond of glycerophospholipid phosphatidylcholine to generate phosphatidic acid (PA) and choline. Phosphatidic acid is widely considered to be the intracellular lipid mediator of many biological functions. PA is a precursor of many other bioactive lipids, including diacylglycerol (DAG) and lysophosphatidic acid (LPA). Phospholipase D activities have been described in multiple organisms, including bacteria, yeast, plants, and mammals. In mammalian cells, PLD (PLD1 and PLD2 isoenzymes) has been implicated in intracellular signal transduction, vesicle transport, endocytosis, exocytosis, cell migration, mitosis, and cytoskeletal reorganization. Mammalian phospholipase D is regulated by many factors, including phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), protein kinase C (PKC), and small G-proteins of the Rho, Ral, and ARF families. In this review we discuss the relationships of PLD1 and PLD2, their structure, biological function, and implications in pathological states.

Key words:

phospholipase D • PLD1 • PLD2 • PLD activity regulators • phosphatidic acid • signal transduction

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9546.pdf

Word count: 5023

Tables: –

Figures: –

References: 65

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

Wykaz skrótów: **PLD** – fosfolipaza D; **PLD1 i PLD2** – izoformy fosfolipazy D ssaków; **PLD1a i PLD1b** – warianty splicingowe PLD1 ssaków; **PLD2a, PLD2b, PLD2c** – warianty splicingowe PLD2 ssaków; **PLD-α, PLD-β, PLD-γ** – roślinne izoformy PLD; **HKD** – konserwatywna domena katalityczna PLD; **CRI, CRII, CRIII, CRIV** – regiony konserwatywne w PLD; **PH** – domena regulatorowa PLD (plekstrin homology domain); **PX** – domena oddziaływania PLD z białkami (phox homology domain); **PIP₂** – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; **PIP₃** – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan; **PC** – fosfatydylocholina; **PA** – kwas fosfatydowy; **LPA** – kwas lizofosfatydowy; **DAG** – 1,2-diacylglicerol; **PI** – fosfatydyloinozytol; **PKC** – kinaza białkowa C; **PKCα i PKCβ** – izoenzymy PKC ssaków; **ATP** – adenozynt trifosforan; **ADP** – adenozyndifosforan; **GTP** – guanozynt trifosforan; **ARF1, ARF2, ARF3, ARF4, ARF5, ARF6** – czynniki uczestniczące w ADP-rybozylacji białek (ADP-ribosylation factors); **RhoA, Rac-1, Cdc42Hs** – białka z rodziny Rho hydrolizujące GTP; **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; **AP3** – białko grupujące klatrynę; **PDGF** – płytkowy czynnik wzrostu; **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu; **H-Ras, Src, Fps, Raf** – onkogeny; **PMA** – 12-mirystylo-13-octanoforbolu.

WSTĘP

Fosfolipazy należą do dużej grupy enzymów, które katalizują reakcję hydrolizy fosfolipidów. Głównymi substratami fosfolipaz są glicerolofosfolipidy, które oprócz cholesterolu, glikolipidów i białek wchodzi w skład błon biologicznych. Złożoność struktur fosfolipidów wpływa na ich rolę, jaką odgrywają w utrzymywaniu stabilności, płynności i przepuszczalności błon, a w konsekwencji odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie kanałów jonowych i receptorów, czy tworzenie pęcherzyków wydzielniczych. Glicerolofosfolipidy zawierają glicerol, który w pozycji *sn*-1 najczęściej zestryfikowany jest nasyconymi kwasami tłuszczowymi, podczas gdy pozycję *sn*-2 zajmują nienasycone kwasy tłuszczowe (głównie kwas arachidonowy).

W warunkach prawidłowych homeostaza glicerolofosfolipidów jest utrzymywana dzięki równowadze między syntezą *de novo*, resyntezą przez reacylację, katabolizmem oraz transportem. W tych złożonych procesach uczestniczą liczne enzymy.

Fosfolipazy hydrolizujące glicerolofosfolipidy dzielimy na dwie grupy. Jedną grupę stanowią acylohydrolazy, do których należą fosfolipazy A₁ i A₂, rozkładające odpowiednio wiązania estrowe *sn*-1 i *sn*-2 fosfolipidów [50]. Drugą grupę stanowią fosfodiesterazy – fosfolipaza C hydrolizująca wiązanie glicerolo-fosforanowe oraz fosfolipaza D uwalniająca kwas fosfatydowy i cholinę.

FOSFOLIPAZA D – CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

Fosfolipaza D (PLD – EC 3.1.4.4) jest fosfodiesterazą katalizującą hydrolizę fosfatydylocholino (PC), głównego fosfolipidu błon do wolnej cholicy i kwasu fosfatydowego (PA).

Jest enzymem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie; występuje zarówno u wirusów i bakterii, u drożdży, roślin oraz zwierząt. Aktywność tego enzymu wykazano po raz pierwszy w 1947 r. w ekstraktach z marchwi [17]. U ssaków aktywność PLD wykazano we wszystkich typach komórek, z wyjątkiem leukocytów a jej głównym substratem jest fosfatydylocholina. Substratami mogą być także fosfatydyloetanoloamina i fosfatydyloinozytol [11].

W komórkach ssaków kwas fosfatydowy uwolniony przez fosfolipazę D, aktywując odpowiednie kinazy może działać jako wtórny przekaznik sygnałów.

Może być także prekursorem innych ważnych mediatorów sygnałów w komórkach ssaków. Z udziałem fosfohydrolazy z PA powstaje 1,2-diacylglicerol (DAG), a z udziałem fosfolipazy A₂ – kwas lizofosfatydowy (LPA). DAG jest dobrze poznanym aktywatorem kinazy białkowej C (PKC), podczas gdy LPA pośredniczy w wielu fizjologicznych funkcjach z udziałem receptorów związanych z białkami G [3,40].

PLD uczestniczy w wielu ważnych procesach fizjologicznych. Odgrywa ważną rolę w wydzielaniu pęcherzyków, w reorganizacji cytoszkieletu, w przebudowie błon, w procesach wzrostu i różnicowania komórek, ale także w procesach apoptozy, mitogenezy i onkogenezy [1,5]. Wiele doniesień literaturowych w ostatnich latach wskazuje także na udział PLD w procesach nowotworowych u ludzi [41,62,63]. Aktywność PLD jest regulowana przez liczne stimulatory, takie jak hormony, neuroprekaźniki, czynniki wzrostu, cytokiny i inne związki zaangażowane w komunikowaniu się komórek [5,11].

Dzięki klonowaniu i sekwencjonowaniu, poznano i opisano w ostatnich latach wiele izoform PLD u wielu gatunków, od

bakterii do ssaków. Bakteryjne PLD (niektóre mają większą swoistość substratową niż enzymy organizmów eukariotycznych) mogą odgrywać rolę w patogenezie.

U roślin opisano i zidentyfikowano za pośrednictwem klonowania cDNA trzy izoformy (PLD- α , PLD- β , PLD- γ). Różnią się one między sobą wymaganiami względem jonów wapnia (mM dla PLD- α , μ M dla PLD- β i γ) i fosfatydylinozytoli potrzebnych do modulowania aktywności. Funkcja PLD w komórkach roślinnych wiąże się z remodelowaniem błon podczas rozwoju, a także z naprawą uszkodzonych błon. Substratem fosfolipazy D roślin i drożdży jest również fosfatydyloseryna.

Początkowe badania sekwencji nukleotydowych PLD z bakterii i roślin nie wskazywały na ich wspólne pochodzenie i dopiero po sklonowaniu, zsekwencjonowaniu i badaniach porównawczych fosfolipaz m.in. drożdżowych i ludzkich wykazano duże podobieństwa w budowie enzymów z różnych, nawet odległych filogenetycznie, organizmów.

U drożdży fosfolipaza D jest kodowana w genie *spo14* [60]. Sekwencja aminokwasów drożdżowego PLD jest bardzo podobna do roślinnej PLD- α . Stwierdzono, że w komórkach drożdży aktywność PLD jest wymagana podczas powstawania błon w czasie mejozy [9].

W komórkach ssaków opisano dwie główne izoformy PLD – PLD1 i PLD2 [38].

Wszystkie sklonowane dotychczas geny eukariotycznych PLD mają silnie konserwatywny katalityczny rdzeń i zmienne rejony C - i N-końcowe [10,11].

Wspólną cechą wszystkich fosfolipaz D jest ich unikalna, silnie konserwatywna domena katalityczna HKD. Nazwa HKD wywodzi się z tego, iż domena ta zawiera motyw HxxxxKxD (H-histydyna, K-lizyna, D-kwas asparaginowy, x-dowolny aminokwas). Domena HKD występuje we wszystkich znanych PLD i powtórzona jest dwa razy (inna nazwa dla tych odcinków to: konserwatywny region II - CRII i konserwatywny region IV – CRIV, lub domeny transfosfatydowe).

Opisano również inne wysoce konserwatywne regiony w genach PLD, a obecne w strukturze PLD jako domena PH (plekstrin homology domain), domena PX (phox homology domain), domeny: I – CRI i III – CRIII, zmienne struktury C-końcowa i N-końcowa oraz około 100–150 aminokwasowy odcinek centralnie położony w PLD1 ssaków, a nieobecny w strukturze PLD2 ssaków, zwany pętlą („loop”).

Funkcje domen są nadal wyjaśniane. Domena PH swoim wiąże bisfosforany inozytydów np. fosfatydylinozytolo- 4,5-bisfosforan (PIP₂) lub fosfatydylinozytolo- 3,4-bisfosforan. Domena PH jest główną domeną regulatorową PLD i jest istotna m.in. przy umieszczaniu PLD1 w endosomach, po stymulowanej translokacji enzymu do błony plazmatycznej [5].

Domena PX wiąże fosfatydylinozytolo- 3,4,5-trifosforan (PIP₃), ale również 5-fosforan inozytoli, a także uczestniczy w oddziaływaniach typu białko-białko [7,32,46,55].

FOSFOLIPAZY D SSAKÓW

W organizmach ssaków występują dwie izoformy fosfolipazy D – PLD1 i PLD2, kodowane przez dwa geny, wykazujące około 50% homologię sekwencji aminokwasów.

Ekspresja obu izoform jest odmienna w różnych tkankach i liniach komórkowych. W danym typie komórki może ulegać ekspresji jedna z form, obie lub żadna z nich. Zdecydowana większość komórek ma obie aktywności: PLD1 i PLD2 [38].

PLD1 ssaków jest białkiem zbudowanym z 1074 aminokwasów o masie cząsteczkowej 120 kDa. Jej głównym substratem jest fosfatydylcholina, a aktywatorami: kinaza białkowa C (PKC), małe GTP-azy z rodziny Rho i ARF i fosfatydylinozytolo 4,5-bisfosforan (PIP₂). Poznano dwa warianty splicingowe enzymu, tj. PLD1a i PLD1b. Wariant b jest uboższy o 38-aminokwasowy region w porównaniu z PLD1a. Struktura domen w PLD1 jest zasadniczo taka sama jak w PLD2. Są cztery domeny rdzeniowe CR-I, CR-II, CR-III i CR-IV, domeny PX i PH [32]. PLD1 ma 100–150 aminokwasową pętlę pomiędzy domeną CR-I i CR-II, której nie ma w PLD2.

W komórkach człowieka i szczura wykazano, że PLD1 występuje w dwóch izoformach PLD1a i PLD1b, będącymi produktami alternatywnego splicingu prekursorowego mRNA. PLD1 ssaków jest potranslacyjnie modyfikowana. PLD1b szczura jest glikoproteiną i wydaje się, że N-glikozylacja umożliwia dotarcie enzymu do właściwego przedziału błonowego. U człowieka PLD1a ma resztę kwasu palmitynowego, któremu przypisuje się udział w aktywności enzymu [35].

Nie zaobserwowano różnic funkcjonalnych, ani też w mechanizmach regulacji aktywności między PLD1a i PLD1b u człowieka. Natomiast stwierdzono, że w komórkach szczura postać PLD1b jest mniej wrażliwa niż PLD1a na jedno z małych białek G – RhoA [7].

Najwyższą ekspresję PLD1 wykazano w nerkach i płucach, ale inne tkanki też mają aktywne izoformy PLD1a i PLD1b. Aktywność PLD1 wykazano w licznych błonach komórkowych, takich jak: błona jądrowa, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, pęcherzyki wydzielnicze czy błona plazmatyczna. PLD1 umiejscawia się wewnątrzkomórkowo, przede wszystkim w organelach i pęcherzykach przedziału endosomalno-lizosomalnego.

PLD2 ssaków jest białkiem zbudowanym z 933 aminokwasów o masie cząsteczkowej 106 kDa. Wykazuje 53% korelację sekwencji aminokwasów z PLD1 [5].

PLD2 i PLD1 różnią się głównie obszarami N- i C-końcowymi w łańcuchu polipeptydowym. Zsekwencjonowano trzy warianty splicingowe ludzkiej PLD2: PLD2a, PLD2b i PLD2c. Geny PLD2 sklonowano m.in. w organizmach człowieka, szczura i myszy [13,31,38,40,53].

PLD2 są aktywowane przez PIP₂, a hamowane przez olefiny. Wykazano, że PLD2 człowieka i myszy jest niewrażliwa na małe GTP-azy z rodziny Rho. W komórkach człowieka zaobserwowano, że białko ARF aktywuje PLD2,

ale ten proces jest dużo słabszy niż aktywacja PLD1 przez ARF (około 100 × mniejsza) [33]. Aktywatorem PLD2 są również receptorowe kinazy tyrozynowe, które regulują aktywność PLD2 przez fosforylację tyrozyny w częsteczkę tego białka, co wywołuje zmianę lokalizacji enzymu i/lub zmianę jego aktywności [2,37]. Coraz częściej wśród aktywatorów PLD2 wymieniana jest PKC, a dokładniej jej izoforma α [5].

Aktywność PLD2 może być również kontrolowana z udziałem mechanizmów, w które są zaangażowane liczne inhibitory białek. Dane literaturowe wskazują na hamowanie aktywności PLD2 jako główny mechanizm regulacji aktywności tego enzymu. Do inhibitorów aktywności PLD2 zaliczamy białka cytoplazmatyczne: np. synaptofajinę, AP3 – białko grupujące klatrynę, α - i β -synukleinę i fodrynę [34].

Ekspresję PLD2 wykazano we wszystkich badanych tkankach i typach komórek. U człowieka najbardziej aktywny enzym zlokalizowano w gruczole krokowym, w macicy i śledzionie, w sercu, trzustce, nerkach i płucach. Najmniejszą aktywność PLD2 wykazano w mięśniach szkieletowych [33,51]. W przeciwieństwie do PLD1, której umiejscowienie było związane z wewnętrznymi błonami, PLD2 jest umiejscowiona przede wszystkim w błonie plazmatycznej. Główną rolę fizjologiczną PLD2 jest rearanżacja cytoszkieletu i udział w endocytozie [49].

W wielu typach komórek ssaków wykazano, że aktywacja fosfolipaz D może następować w wyniku zewnątrzkomórkowego sygnału wywołanego stymulacją hormonalną, neuroprzekaznikami, czynnikami wzrostu, cytokinami oraz pod wpływem wielu innych agonistów receptorów błonowych [6,37]. Zróżnicowana natura czynników stymulujących PLD wskazuje, że aktywność tego enzymu jest regulowana za pośrednictwem wielu różnorodnych mechanizmów.

Wśród aktywatorów fosfolipaz D w komórkach ssaków wymieniane są: serynowo-treoninowe (np. PKC) i tyrozynowe kinazy białkowe, małe białka G (np. ARF – czynnik uczestniczący w reakcji ADP-rybozylacji białek i białko RhoA), fosfatydyloinozytole (np. PIP_2), oraz jony metali (np. Ca^{+2} lub Mg^{+2}).

Fosfolipazy D ssaków są enzymami efektorowymi w szlakach przekazywania sygnałów inicjowanych przez receptory związane z białkami G i receptorami kinaz tyrozynowych występujących na powierzchni komórki. W licznych badaniach genetycznych i farmakologicznych zaobserwowano szeroki zakres działania PLD w wielu komórkowych procesach.

BŁONOWE I ROZPUSSZCZALNE FOSFOLIPAZY D. LOKALIZACJA KOMÓRKOWA

Opisano dwie postaci błonowe i jedną rozpuszczalną (cytosolową) fosfolipazy D. Pierwszą scharakteryzowaną postacią błonową fosfolipazy D ssaków była PLD aktywowana oleinianem i innymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Enzym ten jest integralnym składnikiem błony, którego nie można wyekstrahować roztworami soli o wysokich stężeniach. Wykazuje preferencje do fosfatydylocholiiny jako substratu. Jej obecność stwierdzono w błonach

synaptycznych, mikrosomalnych i cytoplazmatycznych mózgu szczura, błonach plazmatycznych komórek wątroby szczura, płucach świni i mięśni sercowym. Struktura pierwszorzędowa, regulacja i funkcja enzymu zależnego od oleinianu pozostaje niewyjaśniona [10,13].

Drugą postacią błonową PLD jest enzym zależny od małych białek G – ARF i RhoA. Jego peryferyjna lokalizacja w błonie komórek m.in. wątroby, nerek, płuc itp. pozwala na częściowe uwalnianie enzymu z błony pod wpływem dużej siły jonowej (jest to niemożliwe w wypadku PLD aktywowanej oleinianem) [14].

Postać cytosolowa fosfolipazy D występuje w różnych komórkach. Niektóre z nich preferują jako substrat fosfatydyloinozytol (PI) lub fosfatydyloetanoloaminę zamiast fosfatydylocholiiny. Cytosolowe PLD są stymulowane w obecności jonów Ca^{+2} , są również aktywowane przez ARF, co wskazuje, że prawdopodobnie są produktem genu PLD1.

Reasumując, w komórkach ssaków występują liczne izoformy PLD różniące się swoistością substratową, zależnością od jonów wapnia, lokalizacją subkomórkową (w połączeniu z błonami lub w cytosolu) i zależnością od stanu fizjologicznego komórki [31].

PLD zlokalizowano w jądrze, w cytoplazmie, błonie jądrowej, błonie plazmatycznej, w retikulum endoplazmatycznym, aparacie Golgiego, a także w pęcherzykach sekrecyjnych. Z danych literaturowych wynika, że PLD1 i PLD2 są enzymami, które w zależności od stanu fizjologicznego komórki mogą zmieniać lokalizację z cytosolowej na błonową i odwrotnie lub też występować w obu miejscach jednocześnie. W błonach plazmatycznych licznych komórek ssaków wykazano dużą aktywność PLD1, tj. tych, które są aktywowane przez ARF lub RhoA. Dużą aktywność tej izoformy fosfolipazy D zaobserwowano również w jądrze i aparacie Golgiego. Puli jądrowej tego enzymu przypisuje się udział w przenoszeniu sygnałów przez otoczkę jądrową i/lub wpływ na dynamikę pęcherzyków otoczek jądrowych podczas mitozy.

Umiejscowienie PLD w błonie plazmatycznej sprzyja sygnałowej naturze aktywacji enzymów, czyli aktywacji pod wpływem sygnałów zewnętrznych i jest potwierdzeniem, że aktywacja PLD może być ściśle powiązana z receptorami na powierzchni komórki. Uważa się, że PLD umiejscowiona w błonie lub uwolniona z błony plazmatycznej może być aktywowana przez receptory na powierzchni komórki bezpośrednio i niezależnie od innych kaskad aktywujących. Aktywacja PLD obecnej w błonie plazmatycznej drogą bezpośrednią od receptora, wydaje się klasycznym przykładem efektorowego enzymu wytwarzającego związek, który działa jako „drugi przekaznik”, w tym przypadku jest to PA [48].

Wykazano, że jeśli stymulacja kinazy białkowej C poprzedza aktywację PLD, to obserwowano niezależny od PKC mechanizm aktywacji fosfolipazy D [31,32].

W retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego wykazano, że aktywność PLD jest wykorzystywana w czasie powstawania i transportu pęcherzyków wydzielniczych. Główny udział w tym transporcie przypisuje się PA.

W ostatnim okresie pojawiły się doniesienia o obecności PLD aktywowanej oleinaniem w mitochondriach ssaków i jej roli w mięśniu sercowym chorych na cukrzycę [37].

REGULACJA AKTYWNOŚCI FOSFOLIPAZY D. AKTYWATORY

Fosfolipazy D działają według mechanizmu „bisubstrate” lub „ping-pong” ze związkiem pośrednim – intermedia-tem, którym jest enzym kowalencyjnie połączony z kwasem fosfatydowym.

Podczas reakcji katalizowanej przez PLD tworzy się kompleks enzym-substrat, w którym reszta fosfatydowa wiąże się kowalencyjnie z histydyną PLD. W obecności wody powstaje następnie kwas fosfatydowy. Do pełnej aktywności PLD są potrzebne obie domeny HKD [32].

Większość fosfolipaz D ma unikalną zdolność katalizy reakcji transfosfatydylacji, polegającą na tym, że zamiast wody (na etapie uwalniania produktu) mogą one wykorzystać pierwszorzędowe, krótkołańcuchowe alkohole jako akceptory grup fosfatydowych. W wyniku tej reakcji powstaje stabilny produkt: ester alkilowy kwasu fosfatydowego (fosfatydylo-alkohol), który nie występuje naturalnie w komórkach ssaków [59]. Ta reakcja jest bardzo wydajna. Kiedy w komórce brakuje swoistych inhibitorów aktywności PLD – alkohole pierwszorzędowe mogą być użyte jako antagoniści przekazywania sygnałów do komórki zależnych od PLD, dzięki hamowaniu powstawania kwasu fosfatydowego [31].

Aktywacja PLD przez zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe odgrywa ważną rolę w regulacji czynności komórki.

Jak wspomniano wcześniej, w warunkach fizjologicznych aktywacja PLD dostarcza kwasu fosfatydowego, który działa jako wewnątrzkomórkowy przekaznik [9]. Aktywacja PLD jest ważnym elementem regulacyjnym w komórkach eukariotycznych. W większości, jeśli nie we wszystkich, organellach komórkowych ssaków są obecne fosfolipazy D, które pełnią różnorodne funkcje w wielu procesach fizjologicznych [40].

Cząsteczki lipidowego pochodzenia uczestniczą w regulacji proliferacji komórek, ich różnicowaniu, w różnych swoistych czynnościach, wreszcie w procesach starzenia się i ich śmierci. Bioaktywne lipidy funkcjonują zarówno jako zewnątrzkomórkowe przekazniki, które oddziałują z receptorami na powierzchni komórek i jako wewnątrzkomórkowe przekazniki pośredniczące w zdarzeniach wywołanych przez stymulację receptorów [31].

Cząsteczki przekazników mogą być uwalniane z lipidowych składników błon biologicznych przez enzymy (fosfolipazy, kinazy lipidów, acylazy) aktywowane przez sygnały docierające do komórki. Enzymy te są właściwie nieaktywne, ale w odpowiedzi na związanie receptora przez efektor (lub inną stymulację komórki) ulegają swoistej aktywacji skutkującej przekształceniem strukturalnego, lipidowego składnika błony w biologicznie aktywną cząsteczkę przekaznika.

Natura sygnałów aktywujących jest różna. Wśród stymulatorów aktywności PLD wymienia się: hormony, czynni-

ki wzrostu, neuroprzekazniki, cytokiny, antygeny, a także fizyczne stymulatory. Bardzo duży postęp w zrozumieniu fizjologicznej roli fosfolipaz przyniosły dane wykazujące, że stymulacja komórki wywołuje gwałtowną i dramatyczną aktywację PLD.

Fosfolipazy D są enzymami regulowanymi na wiele sposobów, dlatego nie można zdefiniować jednego ogólnego mechanizmu. W komórkach ssaków opisano dwie klasy aktywności fosfolipaz D:

- zależne od fosfatydyloinozytoli i
- fosfatydyloinozytoloniezależne.

Pierwsza klasa obejmuje dwa enzymy PLD1 i PLD2, które wymagają fosfatydyloinozytoli do aktywności *in vitro*. Są one hamowane przez wolne kwasy tłuszczowe, występują powszechnie, ale ich ilość w różnych typach komórek jest różna. Obie izoformy PLD reagują na sygnały z zewnątrz komórki i uczestniczą w przekazywaniu sygnałów, pełnią jednak różne funkcje w komórce. PLD1 i PLD2 charakteryzują się swoistym dla typu komórki umiejscowieniem, występując w błonie plazmatycznej lub w błonach organelli komórkowych. Głównym miejscem występowania PLD1 jest aparat Golgiego i siateczka śródplazmatyczna, zaś PLD2 – błona plazmatyczna.

Druga klasa fosfolipaz D jest niewrażliwa na fosfatydyloinozytol, ale do swojej aktywności wymaga obecności nienasyconych kwasów tłuszczowych np. oleinowego lub arachidonowego. Występują one w komórkach mózgu i w płucach [10,11,13,37]. Fosfolipazy D stymulowane kwasem oleinowym znaleziono w licznych tkankach szczura: w błonach komórkowych hepatocytów, w błonach synaptycznych, we frakcjach mikrosomalnych mózgu, a także w płucach i sercu świn chorych na cukrzycę. Wiedza o budowie, regulacji aktywności i funkcji fosfolipaz D stymulowanych wolnymi kwasami tłuszczowymi jest stosunkowo niewielka. Niedawno opisano PLD stymulowaną oleinaniem, którą wyizolowano z płuca świni. Enzym o masie cząsteczkowej 190 kDa wykazuje swoistość wobec fosfatydylocho-liny i jest niewrażliwy na małe GTP-azy [37].

W ostatnich latach wykryto wiele stymulatorów aktywności PLD ssaków, a ich rola fizjologiczna jest stale wyjaśniana [3,11,46]. Zaliczamy do nich: białka G z rodziny Rho i z rodziny ARF, fosforany fosfatydyloinozytoli, kinazę białkową C. Aktywność PLD może być również regulowana za pośrednictwem fosforylacji białka enzymatycznego w obrębie reszty tyrozyny z udziałem kinaz tyrozynowych.

WPLYW BIAŁKA G Z RODZINY ARF I RHO NA DZIAŁANIE PLD

Wykazano, że aktywność izoform PLD może być regulowana przez małe białka G – GTP-azy należące do nadrodziny Ras. Pierwszym zidentyfikowanym regulatorem aktywności fosfolipazy D był ARF (ADP-ribosylation factor) – białko G związane z ADP-rybozylacją, uczestniczące w powstawaniu pęcherzyków aparatu Golgiego i procesach tworzenia błon. Udział białek ARF wykazano przy aktywacji PLD pod wpływem tak różnych stymulatorów komórkowych jak: PDGF, EGF, insulina, estry forbolu, onkogen *H-Ras*, onkogen *Src*. Mechanizm aktywacji PLD pod wpływem sygnałów docierających do receptorów

i rola ARF są wyjaśniane, wiadomo jednak, że aktywację PLD poprzedza aktywacja i translokacja ARF do błon cytoplazmatycznych i następuje wymiana nukleotydu GTP na GDP w obrębie ARF.

Wiele różnych izoform białek ARF może aktywować PLD1 u ssaków. Aktywacja PLD1 z udziałem małych białek G uczestniczących w procesie ADP-rybozylacji (ARF1, ARF6) jest zależna od GTP i uczestniczy w niej część N-końcowa białka ARF oraz C-końcowa domena PLD1 [1]. Wszystkie GTP-azy z rodziny ARF aktywują PLD *in vitro*, ale dla izoformy ARF6 wykazano również udział w mitochondrialnej aktywności PLD [4].

Poznano trzy klasy GTP-az z rodziny ARF: klasa I to ARF1, ARF2, ARF3, klasa II to ARF4 i ARF5, a klasa III to ARF6 [36]. Klasie I białek ARF przypisuje się rolę w transporcie pęcherzyków w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego. Klasa II jest stosunkowo mało opisana, chociaż ostatnio wykazano udział ARF4 w aktywacji PLD2 w odpowiedzi na stymulację EGF [29]. Białko klasy III – ARF6 wykazuje wspólną lokalizację w komórce z PLD1 (głównie PLD1b) i przede wszystkim uczestniczy w reorganizacji cytoszkieletu i powstawaniu pęcherzyków sekrecyjnych. U szczura wykazano wpływ ARF6 także na aktywność PLD2 *in vivo* [18,19]. Postaci mirystylowane ARF wykazują większą aktywność. Najważniejsza fizjologiczna rola białek z rodziny ARF w kontroli aktywności PLD jest wiązana z transportem pęcherzyków w komórce i aktywacją podczas tego procesu PLD1.

Innym małym białkiem G silnie aktywującym PLD jest białko z rodziny Rho – RhoA, które – podobnie jak ARF – reguluje aktywność PLD1, ale w obrębie innych domen. RhoA oddziałuje z C-końcową domeną 363-aminokwasową PLD1 [61]. Inne białka z tej rodziny: Rac1, Cdc42Hs również aktywują PLD1, ale znacznie słabiej. Białko RhoA bardzo efektywnie wiąże się z C-końcem łańcucha peptydowego PLD1, lecz nie PLD2. Postaci geranylogeranylowane białek G z rodziny Rho są znacznie bardziej aktywne niż postaci niezmodyfikowane [19].

Mechanizm aktywacji PLD przez różne małe białka G (zarówno Rho A, ARF1, ARF6) może być związany z uczynianiem przez nie 5-kinazy-4-fosfo-fosfatydyloinozytolu, enzymu katalizującego powstawanie 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₂), związku niezbędnego do aktywności katalitycznej PLD.

FOSFATYDYLOINOZYTOLE A REGULACJA AKTYWNOŚCI PLD

Liczne dane literaturowe wskazują na udział fosfatydyloinozytoli, a zwłaszcza fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP₂) jako kofaktorów w regulacji aktywności PLD. Wiele pytań dotyczących roli i funkcji, jakie w aktywacji PLD odgrywa PIP₂ pozostaje bez odpowiedzi. Czy PIP₂ aktywuje PLD bezpośrednio czy poprzez białka, takie jak np. ARF, RhoA lub PKC? Czy uczestniczą w tym procesie także inne związki?

Wiadomo, że aktywność, zarówno PLD1, jak i PLD2 jest zależna w znacznym stopniu od 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₂). Również 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP₃) może aktywować te enzymy. Inne kwaśne

fosfolipidy, w tym inne fosfatydyloinozytole są nieefektywne, zaś 1,4,5-trifosforan inozytolu ani nie stymuluje aktywności PLD1 i PLD2, ani nie hamuje aktywacji tych enzymów wywołanej obecnością PIP₂ [14,46,52].

Jak wspomniano wcześniej, aktywność PLD1 może być stymulowana przez liczne białka wiążące GTP, a także przez kinazy białkowe, głównie PKC [40]. Aktywacja PLD1 pod wpływem fosfatydyloinozytoli jest niezależna od tych regulatorów [52].

Fizjologiczna rola aktywacji PLD z udziałem fosfatydyloinozytoli pozostaje niewyjaśniona [52]. Wiadomo, że odgrywają one ważną rolę w zakotwiczeniu w błonie licznych białek. Wiele danych wskazuje na udział kinaz tyrozynowych w procesach pobierania małych białek G do błony komórkowej, a także na rolę w syntezie PIP₂ i w fosforylacji reszt tyrozynowych w PLD1 i PLD2. Nie wiadomo jednak, jak fosforylacja reszt tyrozynowych w PLD wpływa na aktywność enzymu w komórkach [11,27,46].

ROLA KINAZY BIAŁKOWEJ C W REGULACJI AKTYWNOŚCI PLD

Kinaza białkowa C jest głównym fizjologicznym regulatorem aktywności PLD w komórkach ssaków. Wzajemne relacje między obu enzymami – fosfolipazą D i kinazą białkową C są złożone. Z jednej strony PLD jest celem działania dla PKC, ale z drugiej PLD jest potencjalnym źródłem lipidowych efektorów dla licznych izoenzymów PKC. Produkty działania PLD, tj. kwas fosfatydowy i inne metabolity na szlaku tworzenia 1,2-diacylglicerolu (DAG) są znanymi regulatorami aktywności PKC [3].

Regulacja aktywności PLD z udziałem PKC jest bardzo złożona. Aktywacja PLD przez PKC w komórce wymaga inicjującej hydrolizy fosfatydyloinozytoli i wytworzenia 1,2-diacylglicerolu (DAG). Pojawienie się DAG prawdopodobnie powoduje przemieszczenie się PKC na wewnętrzną powierzchnię błony plazmatycznej. To prowadzi do bezpośredniej interakcji PKC z PLD (proces może być zależny od ATP, lub niezależny od ATP), a także do wielu innych (pośrednich) działań będących skutkiem fosforylacji innych substratów. W czasie aktywacji PLD i PKC asocjują ze sobą. Dotyczy to przede wszystkim izoenzymów – PKCα i PKCβ, które są zależne od obecności DAG i jonów wapnia. Ponieważ PKC jest enzymem o aktywności kinazy, wydaje się, że najważniejszym mechanizmem regulacji aktywności PLD powinna być fosforylacja zależna od ATP. Jednakże uzyskane wyniki wskazują na funkcjonowanie dwóch mechanizmów: zależnego od ATP i niezależnego od ATP [3,5,23].

Na podstawie danych doświadczalnych zaproponowano dwa modele regulacji aktywności PLD pod wpływem kinazy białkowej C uczynnionej np. estrami forbolu (np. 12-mirystylo-13-octanem forbolu (PMA), który jest analogiem naturalnego aktywatora PKC – 1,2-diacylglicerolu).

Jednym z mechanizmów jest fosforylacja PLD z udziałem PKCα i ATP. Wykazano, że fosforylacja PLD1 powoduje zahamowanie aktywności tego enzymu [3].

Drugi to unikalny mechanizm – oddziaływanie typu białko-białko, niezależny od fosforylacji, dzięki któremu izo-

enzymy – PKC α i PKC β (u ssaków opisano już 11 izoenzymów PKC) mogą aktywować PLD1, w nieobecności ATP. W tym mechanizmie uczestniczy PKC α , która moduluje aktywność PLD1 poprzez fizyczne oddziaływanie, a nie w wyniku fosforylacji. Z badań z zastosowaniem metod proteolitycznych (*in vitro* i *in vivo*) wynika, że w oddziaływaniu bierze udział domena regulatorowa i katalityczna PKC α (swoista reszta uczestnicząca w wiązaniu to Fen663) oraz N- i C-koniec łańcucha polipeptydowego PLD1. Zaobserwowano silne oddziaływanie PKC α z obszarem 1-318 na N-końcu łańcucha polipeptydowego PLD1, a ponadto słabe wiązanie z C-końcem PLD1 w obszarze 841–1036. Wiązanie PKC α z PLD1 jest wzmocnione przez obecność domen PH i PX [3,23,25,30].

ROLA KINAZ TYROZYNOWYCH W REGULACJI DZIAŁANIA PLD

Fosforylacja tyrozyny w białkach komórkowych jest ważnym elementem mechanizmu regulacyjnego w szlakach przekazywania sygnałów, zwłaszcza w wyniku oddziaływań białko-białko. Receptory kinaz tyrozynowych np. EGF (epidermal growth factor) czy PDGF (platelet-derived growth factor) stymulują aktywność PLD w wielu typach komórek, co wskazuje na możliwość udziału fosforylacji tyrozyny w modulowaniu aktywności PLD. W wyniku stymulacji receptorów komórek ssaków czynnikami wzrostu np. EGF, czy PDGF zaobserwowano aktywację PLD1 przez uczynione kinazy tyrozynowe. Wzrostowi aktywności PLD towarzyszył wzrost fosforylacji PLD1. Stwierdzono dwa miejsca fosforylacji w łańcuchu polipeptydowym – Tyr 295 w domenie PH i/lub Tyr 815. Sugeruje się, że fosforylacja Tyr 295 może zmieniać wrażliwość PLD1 w stosunku do PIP₂ albo innych kofaktorów. Ponadto obserwowano wzrost poziomu PIP₂ zależny od obecności aktywnej kinazy tyrozynowej [41].

Wykazano również, że PLD2 ulega fosforylacji np. w wyniku stymulacji komórek myszy lub szczurów z udziałem EGF. Miejscem fosforylacji jest Tyr 11.

Dotychczas nie wyjaśniono, jakie kinazy tyrozynowe uczestniczą w aktywacji PLD oraz jaka jest relacja między fosforylacją reszt tyrozyny w łańcuchu polipeptydowym fosfolipazy D, a jej aktywnością. W piśmiennictwie dane są niejednoznaczne. Fosforylacja tyrozyny w białku enzymatycznym może sprzyjać wzrostowi aktywności PLD, ale może też pozostawać bez wpływu na aktywność enzymu [11,62]. Biologiczne znaczenie fosforylacji tyrozyny w PLD jest ustalane.

Pojawiły się również doniesienia o wzroście aktywności PLD na skutek kolejnych fosforylacji tego enzymu przez różne kinazy białkowe: kinazy serynowo-treoninowe (inne niż PKC), kinazy białkowe zależnych od jonów wapnia i kalmoduliny, czy wreszcie przez kinazę białkową A. Fizjologiczne znaczenie tych fosforylacji pozostaje niewyjaśnione [42,52].

INHIBITORY PLD

Opisano wiele białek hamujących aktywność fosfolipaz D. Należą do nich np. synukleina (postać α i β), synaptojanina, fodryna oraz białko grupujące klatrynę – AP-3. Mechanizm ich działania jest wciąż nie do końca wyjaś-

niony [14,21]. Synaptojanina i fodryna nie są bezpośrednimi inhibitorami aktywności PLD.

Synaptojanina jest 5-fosfatazą fosfatydyloinozytolu, która hamuje aktywność PLD hydrolizując PIP₂. Fodryna obniża poziom PIP₂ w komórce, nie wiadomo jednak w jaki sposób. Hamujący wpływ białka AP-3 na aktywność PLD jest wynikiem wiązania przez to białko enzymu. Synukleina (postać α i β), termostabilne czynniki białkowe obniżają aktywność PLD2 za pomocą nieznanego jeszcze mechanizmu.

Kolejnymi związkami wykazującymi hamujący wpływ na aktywność PLD są nienasycone kwasy tłuszczowe (np. kwas arachidonowy i oleinowy) oraz sfingolipid – ceramid. W ostatnich latach, szczególną uwagę zwrócono na sfingolipid jako potencjalny lipidowy drugi przekaźnik, pośredniczący w licznych procesach komórkowych, takich jak np. różnicowanie czy apoptoza [42,43,44,45]. Ceramid w komórce powstaje w wyniku hydrolizy sfingomieliny z udziałem sfingomielinazy lub jest syntetyzowany z udziałem syntazy ceramidu. Wykazano, że antyproliferacyjne działanie ceramidu odbywa się poprzez regulację aktywności PLD [44]. Mechanizm wpływu ceramidu na aktywność PLD wciąż pozostaje niewyjaśniony. Ceramid może hamować aktywność PLD na wiele sposobów:

- (i) może działać na aktywatory PLD, takie jak: izoenzymy PKC α i β (np. hamując ich aktywność lub zmieniając ich umiejscowienie w komórce) czy małe białka G – ARF i RhoA,
- (ii) może wpływać bezpośrednio na PLD zmieniając jej umiejscowienie w komórce,
- (iii) ceramid może też zaburzać interakcję PLD z jej aktywatorami: PKC czy PIP₂ (ceramid współzawodnicząc z PIP₂ hamuje aktywność PLD) [15,28,36,54].

Swoiste mechanizmy funkcjonujące *in vivo* z udziałem ceramidu wymagają dalszych badań, mimo istnienia licznych danych literaturowych potwierdzających hamujący wpływ ceramidu na aktywność PLD w układach modelowych *in vitro*.

FUNKCJONALNE ZNACZENIE FOSFOLIPAZ D

Aktywność PLD odgrywa bardzo ważną rolę w funkcjonowaniu komórek. Wykazano, że PLD uczestniczy w tak różnych procesach, jak przemieszczanie się transportera glukozy GLUT4 do powierzchni błony komórkowej w adipocytach czy komórkach jajnika chomika chińskiego pod wpływem insuliny [8,16], powstawaniu wątrobowych VLDL, uwalnianiu pęcherzyków sekrecyjnych z aparatu Golgiego, powstawaniu cytoszkieletu z udziałem aktywny w komórkach endotelialnych i fibroblastach [22]. PLD pełni rolę we fragmentacji i reasocjacji aparatu Golgiego w komórkach wątroby szczura, a z błonami aparatu Golgiego jest zasocjowana stała pula PLD1 [46].

Wykazano wysoką, będącą na stałym poziomie ekspresję PLD w cholinergicznym neuronach, co pozwala na efektywne dostarczanie wolnej cholinej potrzebnej do syntezy acetylcholinej [32].

W komórkach ssaków opisano różnorodne funkcje kwasu fosfatydowego jako zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe-

go przekaźnika. Wśród licznych funkcji PA wymienia się regulację kinaz białkowych i lipidowych, regulację receptorów adhezji komórek, czy wpływ na białka uczestniczące w wymianie nukleotydów guaninowych. Kwas fosfatydowy aktywuje 5-kinazę fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu, biorącą udział w syntezie PIP_2 w komórkach stymulowanych czynnikiem wzrostu [9]. PA może ulegać defosforylacji i tworzyć 1,2 - diacyloglicerol (DAG) aktywujący izoenzymy kinazy białkowej C, może też ulegać deacylacji z udziałem fosfolipazy A_2 i tworzyć kwas lizofosfatydowy (LPA), który jest aktywny wobec receptorów na powierzchni komórki [48]. Kwas fosfatydowy, bezpośredni produkt działania PLD, uczestniczy w wielu różnych fizjologicznych funkcjach komórek, takich jak: egzocytoza, endocytoza, różnicowanie się komórek, apoptoza, proces starzenia. Akumulacja PA w komórce stymuluje sekrecję ziarnistości oraz polimeryzację aktyny w neutrofilach. Ważną rolę PA przypisuje się także w powstawaniu pęcherzyków i w transporcie aparatu Golgiego [13,39].

W fizjologicznej funkcji pełnionej przez PLD uczestniczą, oprócz kwasu fosfatydowego, powstające z niego: 1,2 - diacyloglicerol (DAG) i kwas lizofosfatydowy (LPA).

DAG jest powszechnie znanym aktywatorem kinazy białkowej C [3], współdziała z PA w aktywacji układu oksydazy NADPH [13].

Działanie LPA indukuje wiele różnych odpowiedzi biologicznych w zależności od typu komórki. Jego działanie jest bardzo swoiste i uzależnione od receptora. Najlepiej poznane efekty działania LPA to np. proliferacja komórek naskórka, różnicowanie keratynocytów, agregacja płytek krwi itp. [21,39].

Kwas lizofosfatydowy aktywuje PLD bardzo szybko i przejściowo (20–60 s), kiedy nie stwierdza się żadnej innej aktywacji fosfolipazy D, np. z udziałem fosfolipazy C – zależnej od fosfatydyloinozytolu (PI), fosfolipazy A_2 , 3-kinazy fosfoinozytoloowej czy kaskady kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK) [39,48].

Skoordynowana aktywacja szlaków metabolicznych zależnych od fosfolipaz D wskazuje na pleiotropowe działanie tych enzymów i ich istotną rolę w regulacji wielu procesów komórkowych [10,11].

Mimo że fosfolipaza D jest wiązana głównie z wieloma fizjologicznymi procesami komórkowymi, coraz więcej wiemy także o udziale tego enzymu w procesach patologicznych. Aktywność PLD wyraźnie wzrasta w licznych nowotworach i transformowanych komórkach, co wskazuje na możliwość zaangażowania fosfolipazy D w przekaźnictwie sygnałów podczas proliferacji komórek i w czasie procesu kancerogenezy [12].

W ostatnich latach wykazano wzrost aktywności PLD (zarówno PLD1, jak i PLD2) w licznych nowotworach u ludzi np. w raku sutka, płuc, żołądka, nerek czy jelita grubego [41,57,58,63]. Obserwuje się również zwiększoną ekspresję i wzrost aktywności PLD w komórkach transformowanych różnymi onkogenami np. *v-Src*, *v-Ras*, *v-Fps*, *v-Raf*, a także w komórkach poddanych działaniu mitogenów, takich jak np. PDGF, EGF czy insulina [12,20,26,48]. Czy PLD

indukuje transformację komórek i która z izoform bierze w tym procesie udział pozostaje niewyjaśnione, choć coraz więcej danych doświadczalnych przynosi potwierdzenie tej hipotezy, np. obserwacja, że mysie fibroblasty NIH 3T3 ze zwiększoną ekspresją PLD1 lub PLD2 po iniekcji do szczepu nagich myszy (nude mice) indukują w nich transformację nowotworową objawiającą się rozwojem niezróżnicowanego mięsaka, czemu towarzyszyły zaburzenia w przebiegu cyklu komórkowego. Zwiększona ekspresja PLD może nie dopuścić do zatrzymania cyklu komórkowego i w konsekwencji powstrzymać komórki przed wejściem na szlak prowadzący do apoptozy [26,42]. Duża aktywność PLD1 i PLD2 może również sprzyjać apoptozie, co zaobserwowano m.in. w fibroblastach zdrowych szczurów [64]. Wiele białek regulujących aktywność PLD, takie jak RalA, PKC α , białka z rodziny Rho czy z rodziny ARF (głównie ARF4 i ARF6) jest także zaangażowanych w regulację przebiegu cyklu komórkowego.

Ostatnio w fibroblastach szczura (linia 3Y1 wykazująca zwiększoną ekspresję onkogeny *c-Src*) wykazano zatrzymanie apoptozy indukowanej uszkodzonym DNA, w którym to procesie uczestniczy białko p53. Zaobserwowano, że zwiększona aktywność PLD w tych komórkach (głównie izoformy PLD1) hamuje stabilizację p53 w wyniku zahamowania jego ekspresji i zwiększonej degradacji tego białka. Zdolność do supresji stabilizacji p53 można wyjaśnić, przynajmniej częściowo, zdolnością PLD do zatrzymania procesu apoptozy [24]. Pro- lub antyapoptotyczna rola PLD wydaje się zależeć od typu komórki i rodzaju zewnątrzkomórkowego stymulatora wywołującego zmianę aktywności enzymu [12,26,42,64,65]. Aktywność PLD współdziała z wysoką ekspresją kinazy tyrozynowej w badanych komórkach, tak się dzieje m.in. w transformowanych fibroblastach szczura. Sugeruje się, że zdolność PLD do supresji apoptozy w komórkach mających zwiększoną aktywność kinazy tyrozynowej wskazuje na związek PLD z kinazą tyrozynową w transformacji nowotworowej komórek. Potwierdzeniem tej tezy jest zwiększona aktywność kinazy tyrozynowej obserwowana w nowotworach sutka, żołądka, nerek czy jelita, której towarzyszy wzrost ekspresji i aktywności PLD [26,57,58]. Bardzo ciekawym spostrzeżeniem jest wysoka korelacja między zwiększoną aktywnością PLD, a utratą receptorów estrogenów w badanych komórkach [47].

W literaturze pojawiają się również liczne doniesienia o udziale PLD w inwazji nowotworów i w powstawaniu przerzutów [53,56].

PODSUMOWANIE

Fosfolipaza D jest ważnym elementem odpowiedzi komórki na przekazywane sygnały zewnątrzkomórkowe, zwłaszcza w procesach wzrostu i różnicowania.

Działanie fosfolipazy D może być zarówno pro- jak i antyapoptotyczne, czy też zwiększające przeżywalność komórki. Specyficzna rola PLD w procesach wywołanych zewnątrzkomórkowymi sygnałami zależy od typu komórki, ale także od rodzaju zewnątrzkomórkowego stymulatora. Zaburzenie tych biologicznych procesów może prowadzić do rozwoju nowotworów. Zaobserwowano wzrost ekspresji i aktywności PLD w różnych nowotworach u ludzi np. w raku sutka, płuc, żołądka, nerek czy jelita [42,57,58,64].

Mimo ciągle jeszcze niedostatecznej wiedzy o sposobie, w jaki PLD uczestniczy w transformacji i progresji nowotworów, to zebrane dotychczas dane wskazują na istotną rolę

PLD w wielu aspektach procesu proliferacji, przeżywalności komórek nowotworowych oraz ich przerzutowania i mogą zostać wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej [56].

PIŚMIENICTWO

- [1] Ahn B.H., Kim S.Y., Kim E.H., Choi K.S., Kwon T.K., Lee Y.H., Chang J.S., Kim M.S., Jo Y.H., Min D.S.: Transmodulation between phospholipase D and *c-Src* enhances cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 3103–3115
- [2] Banno Y., Ohguchi K., Matsumoto N., Koda M., Ueda M., Hara A., Dikic I., Nozawa Y.: Implication of phospholipase D2 in oxidant-induced phosphoinositide 3-kinase signaling via Pyk2 activation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 16319–16324
- [3] 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
- [4] Buchanan F.G., McReynolds M., Couvillon A., Kam Y., Holla V.R., Dubois R.N., Exton J.H.: Requirement of phospholipase D1 activity in *H-Ras* v12-induced transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 1638–1642
- [5] Chen J.S., Exton J.H.: Regulation of phospholipase D2 activity by protein kinase C α . *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 22076–22083
- [6] Cockcroft S.: Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001; 58: 1674–1687
- [7] Du G., Altshuller Y.M., Vitale N., Huang P., Chasserot-Golaz S., Morris A.J., Bader M.F., Frohman M.A.: Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J. Cell. Biol.*, 2003; 162: 305–315
- [8] Emoto M., Klarlund J.K., Waters S.B., Hu V., Buxton J.M., Chawla A., Czech M.P.: A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 7144–7151
- [9] English D., Cui Y., Siddiqui R.A.: Messenger functions of phosphatidic acid. *Chem. Phys. Lipids*, 1996; 80: 117–132
- [10] Exton J.H.: Phospholipase D – structure, regulation and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2002; 144: 1–94
- [11] Exton J.H.: Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett.*, 2002; 531: 58–61
- [12] Foster D.A., Xu L.: Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2003; 1: 789–800
- [13] Freyberg Z., Sweeney D., Siddhanta A., Bourgoin S., Frohman M., Shields D.: Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, 2001; 12: 943–955
- [14] Frohman M.A., Sung T.C., Morris A.J.: Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1439: 175–186
- [15] Gidwani A., Brown H.A., Holowka D., Baird B.: Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by ϵ -PKC. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 3177–3187
- [16] Gillooly D.J., Melendez A.J., Hockaday A.R., Harnett M.M., Allen J.M.: Endocytosis and vesicular trafficking of immune complexes and activation of phospholipase D by the human high-affinity IgG receptor requires distinct phosphoinositide 3-kinase activities. *Biochem. J.*, 1999; 344: 605–611
- [17] Hanahan D.J., Chaikoff I.L.: The phosphorus – containing lipids of the carrot. *J. Biol. Chem.*, 1947; 168: 233–240
- [18] Hiroyama M., Exton J.H.: Studies of the role of ADP-ribosylation factors and phospholipase D in phorbol ester-induced membrane ruffling. *J. Cell Physiol.*, 2005; 202: 608–622
- [19] Hiroyama M., Exton J.H.: Localization and regulation of phospholipase D2 by ARF6. *J. Cell. Biochem.*, 2005; 95: 149–164
- [20] Ho W.T., Xie Z., Zhao Z.J., Exton J.H.: Tyrosine phosphorylation of phospholipase D1 by *v-Src* does not per se result in activation. *Cell Signal.*, 2005; 17: 691–699
- [21] Houle M.G., Bourgoin S.: Regulation of phospholipase D by phosphorylation-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1439: 135–149
- [22] Huang P., Altshuller Y.M., Hou J.C., Pessin J.E., Frohman M.A.: Insulin-stimulated plasma membrane fusion of GLUT4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol. Biol. Cell*, 2005; 16: 2614–2623
- [23] Hu T., Exton J.H.: Protein kinase C α translocates to the perinuclear region to activate phospholipase D1. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 35702–35708
- [24] Hui L., Abbas T., Pielak R.M., Joseph T., Bargonetti J., Foster D.A.: Phospholipase D elevates the level of MDM2 and suppresses DNA damage-induced increases in p53. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 5677–5686
- [25] Jenkins G.M., Frohman M.A.: Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 2305–2316
- [26] Joseph T., Bryant A., Frankel P., Wooden R., Kerkhoff E., Rapp U.R., Foster D.A.: Phospholipase D overcomes cell cycle arrest induced by high-intensity Raf signaling. *Oncogene*, 2002; 21: 3651–3658
- [27] Kassisi J., Lauffenburger D.A., Turner T., Wells A.: Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin. Cancer Biol.*, 2001; 11: 105–117
- [28] Kim K.O., Lee K.H., Kim Y.H., Park S.K., Han J.S.: Anti-apoptotic role of phospholipase D isozymes in the glutamate-induced cell death. *Exper. Mol. Med.*, 2003; 35: 38–45
- [29] Kim S.W., Hayashi M., Lo J.F., Yang Y., Yoo J.S., Lee J.D.: ADP-ribosylation factor 4 small GTPase mediates epidermal growth factor receptor-dependent phospholipase D2 activation. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 2661–2668
- [30] Kook S., Exton J.H.: Identification of interaction sites of protein kinase C α on phospholipase D1. *Cell Signal.*, 2005; 17: 1423–1432
- [31] Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G., Lavie Y., Tang X.: Localization and possible functions of phospholipase D isozymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1439: 245–263
- [32] Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G., Tang X.: Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.*, 2000; 345: 401–415
- [33] Lopez I., Arnold R.S., Lambeth J.D.: Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 12846–12852
- [34] Lukowski S., Mira J.P., Zachowski A., Geny B.: Fodrin inhibits phospholipases A2, C and D by decreasing polyphosphoinositide cell content. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 248: 278–284
- [35] Manifava M., Sugars J., Ktistakis N.T.: Modification of catalytically active phospholipase D1 with fatty acid *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 1072–1077
- [36] Mansfield P.J., Carey S.S., Hinkovska-Galcheva V., Shayman J.A., Boxer L.A.: Ceramide inhibition of phospholipase D and its relationship to RhoA and ARF1 translocation in GTP gamma S-stimulated polymorphonuclear leucocytes. *Blood*, 2004; 103: 2363–2368
- [37] McDermott M., Wakelam M.J., Morris A.J.: Phospholipase D. *Biochem. Cell. Biol.*, 2004; 82: 225–253
- [38] Meier K.E., Gibbs T.C., Knoepf S.M., Ella K.M.: Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1439: 199–213
- [39] Moolenaar W.H.: Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 12949–12952
- [40] Natarajan V.E.: Phospholipase D and signal transduction in mammalian cells. *Chem. Phys. Lipids*, 1996; 80: 1–2
- [41] Noh D., Ahn S., Lee R., Park I., Kim J., Suh P.G., Ryu S.H., Lee K., Han J.: Overexpression of phospholipase D1 in human breast cancer tissues. *Cancer Lett.*, 2000; 161: 207–214
- [42] Nozawa Y.: Role of phospholipase D in apoptosis and pro-survival. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1585: 77–86
- [43] Obeid L.M., Hannun Y.A.: Ceramide, stress and a 'LAG' in aging. *Sci. Aging Knowledge Environ.*, 2003; 2003: PE27
- [44] Ogretmen B., Hannun Y.A.: Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Can.*, 2004; 4: 604–616
- [45] Pettus B.J., Chalfant C.E., Hannun Y.A.: Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1585: 114–125
- [46] Powney D.J., Wakelam M.J.: The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases. *FEBS Lett.*, 2002; 531: 62–64

- [47] Prall O.W., Rogan E.M., Sutherland R.L.: Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1998; 65: 169–174
- [48] Rizzo M., Romero G.: Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol. Ther.*, 2002; 94: 35–50
- [49] Rizzo M.A., Shome K., Vasudevan C., Stoltz D.B., Sung T.C., Frohman M.A., Watkins S.C., Romero G.: Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent Raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 1131–1139
- [50] Sadurska B., Szumiło M.: Fosfolipazy A w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 116–123
- [51] Saqib K.M., Wakelam M.J.: Differential expression of human phospholipase D genes. *Biochem. Soc. Trans.*, 1997; 25: S586
- [52] Sciorra V.A., Rudge S.A., Wang J., McLaughlin S., Engebrecht J., Morris A.J.: Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes. *J. Cell. Biol.*, 2002; 159: 1039–1049
- [53] Shen Y., Zheng Y., Foster D.A.: Phospholipase D2 stimulates cell protrusion in *v-Src*-transformed cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 293: 201–206
- [54] Singh I.N., Stromberg L.M., Bourgoin S.G., Sciorra V.A., Morris A.J., Brindley D.N.: Ceramide inhibition of mammalian phospholipase D1 and D2 activities is antagonized by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry*, 2001; 40: 11227–11233
- [55] Stahelin R.V., Ananthanarayanan B., Blatner N.R., Singh S., Bruzik K.S., Murray D., Cho W.: Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 54918–54926
- [56] Steed P.M., Chow A.H.: Intracellular signaling by phospholipase D as a therapeutic target. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2001; 2: 241–256
- [57] Uchida N., Okamura S., Kuwano H.: Phospholipase in human gastric carcinoma. *Anticancer Res.*, 1999; 19: 671–675
- [58] Uchida N., Okamura S., Nagamachi Y., Yamashita S.: Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1997; 123: 280–285
- [59] Waite M.: The PLD superfamily: insights into catalysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1439: 187–197
- [60] Waksman M., Eli Y., Liscovitch M., Gerst J.E.: Identification and characterization of a gene encoding phospholipase D activity in yeast. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 2361–2364
- [61] Yamazaki M., Zhang Y., Watanabe H., Yokozeki T., Ohno S., Kaibuchi K., Shibata H., Mukai H., Ono Y., Frohman M.A., Kanaho Y.: Interaction of the small G protein RhoA with the C terminus of human phospholipase D1. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 6035–6038
- [62] Zhang Z., Baron R., Horne W.C.: Integrin engagement, the actin cytoskeleton, and *c-Src* are required for the calcitonin-induced tyrosine phosphorylation of paxillin and HEF1, but not for calcitonin-induced Erk1/2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 37219–37223
- [63] Zhao Y., Ehara H., Akao Y., Shamoto M., Nakagawa Y., Banno Y., Deguchi T., Ohishi N., Yagi K., Nozawa Y.: Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 278: 140–143
- [64] Zhong M., Joseph T., Jackson D., Beychenok S., Foster D. A.: Elevated phospholipase D induced apoptosis in normal rat fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 298: 474–477
- [65] Zhong M., Shen Y., Zheng Y., Joseph T., Jackson D., Foster D.A.: Phospholipase D prevents apoptosis in *v-Src*-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 302: 615–619