

PI(4,5)P₂, UNIKATOWY LIPID BŁONY KOMÓRKOWEJ: RÓŻNORODNOŚĆ FUNKCJI I MNOGOŚĆ BIAŁEK EFEKTOROWYCH

PI(4,5)P₂, A UNIQUE PLASMA MEMBRANE LIPID:
VARIOUS FUNCTIONS AND MULTIPLE EFFECTOR PROTEINS

Ewelina SZYMAŃSKA, Katarzyna KWIATKOWSKA

Pracownia Receptorów Błony Komórkowej,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

Streszczenie: Fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan [PI(4,5)P₂] jest lipidem występującym głównie w wewnętrznej warstwie błony komórkowej. Lipid ten kontroluje aktywność wybranych kanałów i pomp błonowych, a także moduluje działanie wielu białek podbłonowych, w tym białek cytoszkieletu aktynowego. W wyniku hydrolizy i fosforylacji PI(4,5)P₂ powstają trzy przekaźniki drugiego rzędu: IP₃, DAG i PI(3,4,5)P₃. Zarówno PI(4,5)P₂, jak i jego pochodne uczestniczą w transdukcji sygnałów i kontrolują takie procesy, jak: migracja komórek, egzo-, endo- i fagocytoza oraz transport jonów. Wielofunkcyjność PI(4,5)P₂ wskazuje na istnienie wielu odrębnych puli tego lipidu w błonie komórkowej, które powstają w wyniku lokalnej syntezy PI(4,5)P₂ i ograniczeń w dyfuzji lateralnej PI(4,5)P₂ wynikającej z wiązania lipidu przez białka podbłonowe, takie jak: MARCKS i GAP-43. Głównym źródłem PI(4,5)P₂ jest reakcja fosforylacji PI(4)P katalizowana przez PIP5-kinazy typu I. PIP5-kinaza Iα asocjuje z błoną komórkową wiążąc się do swojego substratu, PI(4)P oraz do produktu – PI(4,5)P₂. Szereg doniesień wskazuje, że zarówno PI(4,5)P₂, jak i PIP5-kinaza Iα zbierają się w błonie komórkowej w obrębie mikrodomen wzbogaconych w sfingolipidy i cholesterol. Interakcja PI(4,5)P₂ z białkami efektorowymi zachodzi drogą oddziaływań lipidu z sekwencjami białkowymi bogatymi w aminokwasy zasadowe lub z ustrukturyzowanymi domenami, wśród których szczególnie dużą specyficzność wobec PI(4,5)P₂ wykazuje domena plekstrynowa (PH) fosfolipazy Cδ1. Rekombinowane białka fuzyjne zawierające tę domenę stosowane są jako narzędzia w badaniach nad dynamiką PI(4,5)P₂ w komórce.

Słowa kluczowe: fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan, domena plekstrynowa, błona komórkowa.

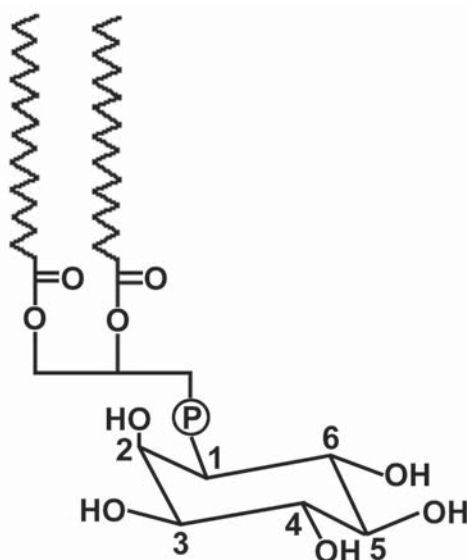
Summary: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P₂] is a lipid of the inner leaflet of the plasma membrane. This lipid controls activity of distinct ion channels and pumps of the plasma membrane and is bound by numerous submembraneous proteins, including proteins of the actin cytoskeleton. In addition, hydrolysis and phosphorylation of PI(4,5)P₂ generate three second messengers, IP₃, DAG and PI(3,4,5)P₃. For all these reasons, PI(4,5)P₂ participates in signal transduction and controls many other processes including cell migration, exo-, endo- and phagocytosis and ion transport. This wide array of PI(4,5)P₂ functions suggests that many distinct pools of the lipid co-exist in the plane of the plasma membrane.

They can be generated as a result of a local $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ synthesis and by a restricted lateral mobility of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in the membrane ensuing from sequestration of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ by submembrane proteins like MARKCS and GAP-43. $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ is synthesized mainly by phosphorylation of $\text{PI}(4)\text{P}$ catalyzed by PIP5-kinases of type I. PIP5-kinase $\text{I}\alpha$ associates with the plasma membrane due to binding to both the $\text{PI}(4)\text{P}$ substrate and the $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ product of its activity. A line of data suggest that $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ and PIP5-kinase $\text{I}\alpha$ are compartmentalized in plasma membrane microdomains enriched in sphingolipids and cholesterol, so-called rafts. Interactions of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ with effector proteins are mediated either by unfolded sequences enriched in basic amino acids or by globular domains among which pleckstrin homology (PH) domain of phospholipase $\text{C}\delta 1$ displays especially high specificity toward $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$. Recombinant proteins composed of the PH domain tagged with fluorescent proteins have been recently introduced as tools to study the dynamics of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ in cells.

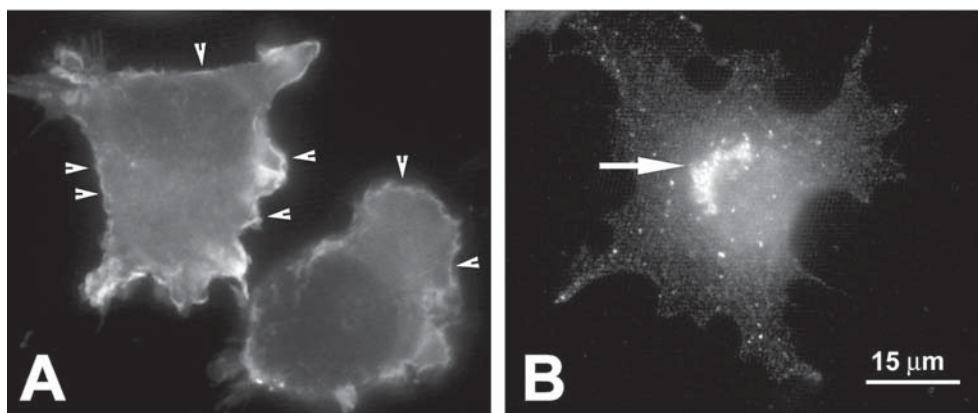
Key words: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, pleckstrin homology domain, plasma membrane.

WSTĘP

Fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan [$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$] jest lipidem wewnętrznej warstwy błony komórkowej i stanowi zaledwie 1% wszystkich fosfolipidów błony. Niemniej jednak, $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności błony komórkowej leżącej u podstaw takich procesów, jak: migracja i adhezja komórki, endo-, egzo- i fagocytoza oraz aktywacja kanałów jonowych [43, 74, 78, 96]. Regulatorowa rola $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ wynika z faktu, że jego metabolizm jest źródłem trzech wtórnych przekazników sygnału, a także jest rezultatem bezpośredniego oddziaływania tego lipidu z szeregiem białek efektorowych, w tym białek uczestniczących w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego. $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ jest jednym z pochodnych fosfatydyloinozytoli, których fosforylacja/defosforylacja wraz z hydrolizą $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ składają się na tzw. cykl fosfatydyloinozytolowy. Fosfatydyloinozytol (ryc. 1) syntetyzowany jest w retikulum endoplazmatycznym, skąd transportowany jest do innych błon komórki. Stanowi on około 8% wszystkich lipidów w komórce i około 10% wszystkich lipidów cytoplazmatycznej warstwy



RYCINA 1. Wzór strukturalny fosfatydyloinozytoli. Grupy fosforanowe mogą być przyłączane wiązaniem estrowym do atomów węgla w pozycji 3, 4 i 5
FIGURE 1. The structure of phosphatidylinositol. Phosphate groups can be attached via ester bonds at the 3, 4 and 5 positions of the inositol ring



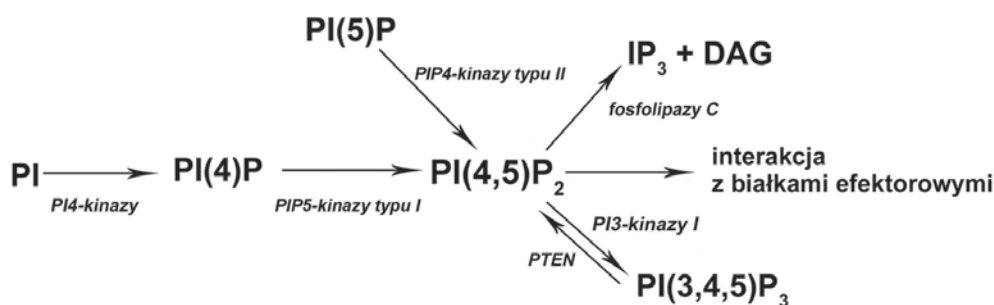
RYCINA 2. Heterogenne rozmieszczenie fosfatydyloinozytoli w komórce. Błona komórkowa jest głównym miejscem występowania PI(4,5)P₂ (A, grotty strzałek), podczas gdy PI(4)P znajduje się głównie w aparacie Golgiego (B, strzałka). Fosfatydyloinozytyle uwidoczniiono w chemicznych fibroblastach przy użyciu sond białkowych – rekombinowanych białek zawierających domenę PH fosfolipazy Cδ1 (A) i domenę PH białka Fapp1 (B), połączonych z fluorescencyjnym białkiem GFP

FIGURE 2. Heterogeneous distribution of phosphoinositides in cells. The plasma membrane is the main location of PI(4,5)P₂ (A, arrowheads) whereas PI(4)P is localized predominantly in the Golgi apparatus (B, arrow). Phosphoinositides are visualized in hamster fibroblasts using recombinant proteins composed of PH domain of phospholipase Cδ1 (A) and PH domain of Fapp1 protein (B) both fused with fluorescent protein GFP

błony komórkowej [87]. W wyniku fosforylacji pierścienia inozytoli przy poszczególnych atomach węgla z fosfatydyloinozytoli powstają: fosfatydyloinozytolo-3-fosforan [PI(3)P], fosfatydyloinozytolo-4-fosforan [PI(4)P] oraz fosfatydyloinozytolo-5-fosforan [PI(5)P], które z kolei są prekursorami dla: fosfatydyloinozytolo-3,4-bisfosforanu [PI(3,4)P₂], fosfatydyloinozytolo-3,5-bisfosforanu [PI(3,5)P₂], PI(4,5)P₂ i fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforanu [PI(3,4,5)P₃]. Spośród wszystkich fosfatydyloinozytoli w komórce, PI(4)P oraz PI(4,5)P₂ występują w największej ilości stanowiąc ponad 99% wszystkich fosfatydyloinozytoli [81]. Każdy z fosfatydyloinozytoli wykazuje odmienną dystrybucję i koncentrację w komórce. Badania nad tym zagadnieniem ułatwiło w ostatnich latach zastosowanie sond – rekombinowanych białek fuzyjnych zbudowanych z domeny białkowej rozpoznającej specyficznym określony fosfatydyloinozytoli i z białka fluorescencyjnego, np. GFP. Wykazano w ten sposób, że w komórkach spoczynkowych PI(4)P gromadzi się w aparacie Golgiego, PI(3)P i PI(3,5)P₂ występują przede wszystkim w błonie endosomów, natomiast PI(4,5)P₂ znajduje się głównie w błonie komórkowej [4, 18]. Lokalizację PI(4,5)P₂ i PI(4)P w komórkach fibroblastów przy użyciu specyficznych sond białkowych ilustruje rycina 2. Uważa się, że akumulacja PI(4,5)P₂ w błonie komórkowej jest wynikiem aktywności asocjujących z tą błoną kinaz, które syntetyzują PI(4,5)P₂.

SYNTEZA PI(4,5)P₂

PI(4,5)P₂ może powstawać w wyniku dwóch niezależnych reakcji fosforylacji: katalizowanej przez PIP5-kinazy typu I (PIP5-kinazy I) fosforylacji PI(4)P w pozycji

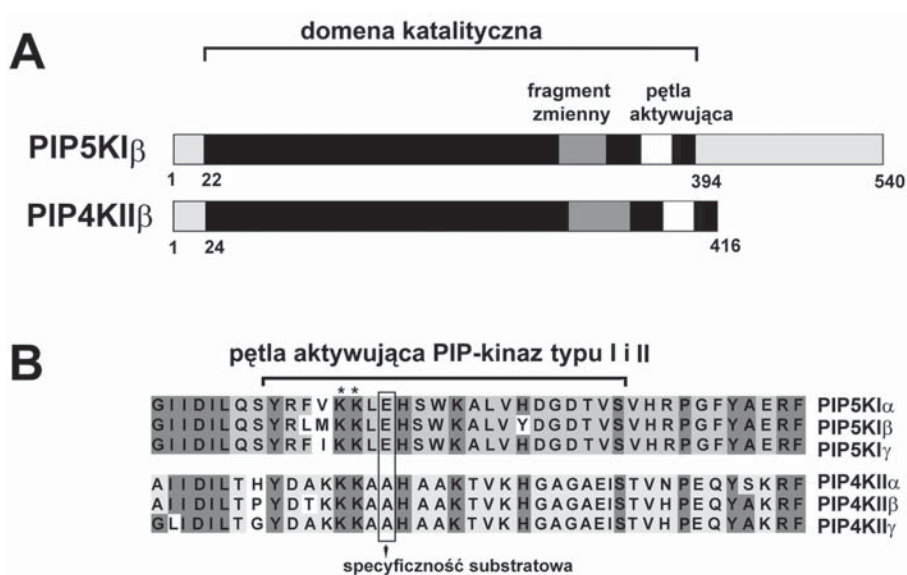


RYCINA 3. Synteza i aktywność PI(4,5)P₂ błony komórkowej. Głównym źródłem PI(4,5)P₂ jest fosforylacja PI(4)P katalizowana przez PIP5-kinazy typu I, a w mniejszym stopniu fosforylacja PI(5)P przez PIP4-kinazy typu II. PI(4,5)P₂ moduluje aktywność wielu białek efektorowych, wśród których dominują białka cytoszkieletu aktynowego. Ponadto, PI(4,5)P₂ jest też hydrolizowany przez fosfolipazy C i ulega fosforylacji katalizowanej przez PI3-kinazy I, stając się źródłem IP₃, DAG i PI(3,4,5)P₃.

FIGURE 3. The synthesis and activity of PI(4,5)P₂ in the plasma membrane. PI(4,5)P₂ is generated mainly by phosphorylation of PI(4)P catalyzed by the type I PIP5-kinases, and to less extent by phosphorylation of PI(5)P by the type II PIP4-kinases. PI(4,5)P₂ modulates activity of many effector proteins among which proteins of the actin cytoskeleton prevail. Moreover, PI(4,5)P₂ is hydrolyzed by phospholipases C and undergoes phosphorylation by PI3-kinases giving rise to IP₃, DAG and PI(3,4,5)P₃.

C5 pierścienia inozytoli lub w wyniku fosforylacji PI(5)P w pozycji C4 pierścienia inozytoli z udziałem PIP4-kinaz typu II (PIP4-kinaza II; ryc. 3). PIP5-kinazy I mogą także uczestniczyć w alternatywnej syntezie PI(4,5)P₂ fosforylując fosfatydyloinozytol do PI(5)P, który jest substratem PIP4-kinaz typu II. Ponadto PI(4,5)P₂ może także powstawać w wyniku defosforylacji PI(3,4,5)P₃ przez fosfatazę PTEN. Reakcja ta służy zakończeniu procesów z udziałem PI(3,4,5)P₃, nie ustalono, w jakiej mierze PI(3,4,5)P₃ jest źródłem PI(4,5)P₂ [62].

Zarówno PIP5-kinazy typu I, jak i PIP4-kinazy typu II występują w trzech izoformach (α , β , γ), zidentyfikowano też liczne warianty transkrypcyjne tych enzymów. Analiza sekwencji aminokwasowych wykazała wzajemne podobieństwo kinaz obu typów, szczególnie w obrębie domeny katalitycznej, i jednocześnie brak homologii sekwencji do innych kinaz lipidowych i białkowych (ryc. 4A). Wyjątkiem jest wspólna dla wszystkich enzymów przestrzenna organizacja fragmentów domeny katalitycznej tworzących miejsca wiązania ATP i Mg²⁺ [19]. Pomimo podobieństwa, kinazy PIP5 i PIP4 mają odmienną funkcję i lokalizację w komórce. PIP5-kinazy typu I wiążą się do błony komórkowej i cytoszkieletu aktynowego, występują także w jądrze i aparacie Golgiego i uczestniczą w takich procesach komórkowych, jak: migracja, sekrecja, fagocytoza i regulacja aktywności kanałów jonowych [14, 19, 42, 54]. W przeciwieństwie do kinaz typu I, PIP4-kinazy II nie uczestniczą w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego i nie asocjują z błoną komórkową. Zlokalizowane są przede wszystkim w jądrze, cytoplazmie i retikulum endoplazmatycznym, a ich fizjologiczna funkcja jest słabo poznana. Kinazy te zaangażowane są w szlaki sygnałowe receptora TNF p55, a te izoformy PIP4-kinazy II, które zlokalizowane



RYCINA 4. Porównanie budowy ludzkich PIP-kinaz typu I i II. (A) Schemat budowy ludzkiej PIP5-kinazy I β i PIP4-kinazy II β . Na schemacie zaznaczono domeny katalityczne PIP-kinaz o sekwencji zachowanej w ewolucji (kolor czarny), wstawki w obrębie domen katalitycznych o zmiennej sekwencji (kolor ciemnoszary) oraz pozycję tzw. pętli aktywującej (kolor biały). (B) Porównanie sekwencji aminokwasowej pętli aktywujących ludzkich izoform α , β i γ PIP-kinaz I i II. Na ciemnym tle znajdują się aminokwasy zachowane w ewolucji w obrębie wszystkich PIP-kinaz, jasnym tłem wyróżniono aminokwasy, które są zachowane w obrębie kinaz typu I oraz w obrębie kinaz typu II. Ramką zaznaczono pozycję aminokwasów odpowiedzialnych za specyficzność substratową kinaz, a gwiazdkami dwie reszty lizyny uczestniczące w wiązaniu PIP5-kinaz typu I do błony komórkowej

FIGURE 4. The comparison of the structure of the type I and type II PIP-kinases. (A) The structure of human PIP5-kinase I and PIP4-kinase II. Marked are evolutionarily conserved catalytic domains of PIP-kinases (black), nonconserved inserts in the catalytic domains (dark grey) and activation loops (white). (B) The alignment of amino acid sequences of the activation loops of human isoforms α , β , and γ of PIP-kinases I and II. Dark grey shading indicates amino acids evolutionarily conserved in all PIP-kinases, light grey shading shows amino acids conserved among each PIP-kinase type. Amino acids responsible for the substrate specificity are outlined by a box while asterisks point to two lysine residues which participate in binding of the type I PIP5-kinases to the plasma membrane

są w jądrze, podobnie jak jądrowe kinazy typu I, uczestniczą w ekspresji genów, dojrzewaniu i transporcie mRNA do cytoplazmy [57, 95]. Z uwagi na duże stężenie PI(4)P, a niskie PI(5)P w komórkach (ten ostatni stanowi około 2% wszystkich fosfatydyloinozytolo-monofosforanów) [69], wydaje się, że PI(4,5)P₂ powstaje głównie w wyniku aktywności PIP5-kinaz typu I.

Trzy izoformy PIP5-kinazy typu I są produktami odrębnych genów. Ludzka i mysia PIP5-kinaza I α i I β zostały sklonowane w jednym czasie przez dwa zespoły i zyskały przeciwstawne nazwy; ludzka izoforma α jest mysią izoformą β i odwrotnie [35, 51]. W niniejszej pracy stosowana jest terminologia zaproponowana przez zespół Andersona dla ludzkich kinaz fosfatydyloinozytoli. PIP5-kinaza I α i I β występują w kilku wariantach transkrypcyjnych i są białkami o masie cząsteczkowej około 68 kDa. PIP5-kinaza I γ również ma warianty transkrypcyjne, które kodują białka o

masie cząsteczkowej 87, 90 i 93 kDa [35]. Wszystkie izoformy PIP5-kinaz typu I wykazują wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej w obrębie domeny katalitycznej, złożonej z 330–380 aminokwasów. W obrębie końca C domeny katalitycznej PIP5-kinaz typu I zidentyfikowana została 25-aminokwasowa sekwencja o kluczowym znaczeniu dla rozpoznawania PI(4)P jako substratu tych enzymów, jak również dla ich asocjacji z błoną komórkową [44, 45]. Podobny motyw został też zidentyfikowany w PIP4-kinazach typu II (ryc. 4A), a szczegółowa analiza tej sekwencji wykazała, że topologicznie nawiązuje ona do pętli aktywującej kinaz białkowych [70]. Badania prowadzone nad pętlą aktywującą PIP5-kinazy I β wykazały, że dwie sąsiadujące reszty lizyny zlokalizowane w jej obrębie pełnią istotną rolę w interakcji kinazy z błoną komórkową (ryc. 4B). Aminokwasy te przypuszczalnie oddziałują elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi fosfolipidami błony. Stwierdzono bowiem, że zamiana wspomnianych dwóch reszt lizyny w pętli aktywującej PIP5-kinazy I β na reszty asparaginy, ale nie na reszty zasadowej argininy, sprawiła, że PIP5-kinaza I β traciła zdolność do wiązania się z błoną komórkową [44]. Omawiany motyw dwulizynowy jest jednak wspólny dla wszystkich PIP-kinaz [70] (ryc. 4B, gwiazdki) i dlatego jego wyłączny udział nie tłumaczy wybiórczej interakcji PIP5-kinaz klasy I z błoną komórkową.

Częściową odpowiedź na pytanie o mechanizm takiej wybiórczości dała dalsza analiza mutantów pętli aktywującej PIP5-kinazy I β i PIP4-kinazy II β . Wymiana całej pętli pomiędzy obu kinazami prowadziła do jednoczesnej zmiany specyficzności substratowej i lokalizacji kinaz-chimer w komórce: PIP5-kinaza I β z pętlą kinazy PIP4-II β fosforylowała PI(5)P, a nie PI(4)P, i stawała się białkiem cytoplazmatycznym. Właściwości przeciwstawne zyskiwała PIP4-kinaza II β z pętlą aktywującą kinazy PIP5 I β [44]. Podobną zmianę specyficzności substratowej obu kinaz osiągnięto w wyniku lustrzanej mutacji pojedynczego aminokwasu, to jest wymiany reszty kwasu glutaminowego na resztę alaniny w pozycji 362 (E362A) w PIP-5 kinazie I β oraz wymiany reszty alaniny w pozycji 381 na resztę kwasu glutaminowego (A381E) w PIP4-kinazie II β (ryc. 4B, aminokwasy oznaczone ramką). Ponadto, E362A mutant PIP5-kinazy I β , który preferował PI(5)P jako substrat, w niewielkim stopniu wiązał się do błony komórkowej i występował głównie w cytoplazmie [45]. Te dane mogły sugerować, że wiązanie PI(4)P obecnego w błonie komórkowej przez PIP5-kinazy I determinuje zarówno specyficzność substratową PIP5-kinaz typu I, jak i ich interakcję z błoną komórkową. Tezę tę podważył jednak fakt, że opisany wyżej A381E mutant PIP4-kinazy II β , pomimo efektywnego wiązania PI(4)P i jego fosforylacji do PI(4,5)P₂ *in vitro*, nie asocjował z błoną komórkową [45]. Wydaje się więc, że interakcja enzymu z PI(4)P jest co prawda wymagana, ale niewystarczająca, aby umożliwić wiązanie PIP5-kinaz klasy I z błoną komórkową. Interesujących danych na temat mechanizmów asocjacji PIP5-kinaz typu I α z błoną komórkową dostarczają najnowsze wyniki, w świetle których czynnikiem współodpowiedzialnym za wiązanie PIP5-kinazy I α do błony jest produkt jej aktywności – PI(4,5)P₂. Wykazano, że rekombinowana PIP5-kinaza I α z metką GST wiąże zarówno PI(4)P i PI(4,5)P₂ *in vitro* [38, 80]. Wychwycenie PI(4,5)P₂ w komórkach przez nadprodukowaną, egzogenną domenę PH fosfolipazy C (białko



RYCINA 5. Synteza PI(4,5)P₂ z udziałem PIP5-kinaz typu I. PIP5-kinazy I wiążą się do miejsc docelowych w komórce m.in. dzięki oddziaływaniom z PI(4)P i PI(4,5)P₂. Aktywność enzymatyczna PIP5-kinaz I kontrolowana jest przez monomeryczne GTPazy, kwas fosfatydowy oraz fosforylację reszt serynowych. Produkt aktywności PIP5-kinaz I, PI(4,5)P₂, wiąże się z różnorodnymi białkami efektorowymi i jest źródłem wtórnych przekazników, uczestnicząc w szerokim spektrum procesów komórkowych

FIGURE 5. The synthesis of PI(4,5)P₂ by the type I PIP5-kinases. PIP5-kinases I localize to distinct sites in cells, among others due to binding to PI(4)P and PI(4,5)P₂. The enzymatic activity of PIP5-kinases I is regulated by small G proteins, phosphatidic acid and phosphorylation of kinase serine residues. The product of PIP5-kinases activity, PI(4,5)P₂, binds to various effector proteins and gives rise to secondary messengers participating in a wide array of cellular functions

scharakteryzowane w dalszej części pracy) powoduje wyparcie PIP5-kinazy I α z błony komórkowej i obniżenie poziomu PI(4,5)P₂ w komórkach [80]. Przepuszczalnie, za wiązanie PIP5-kinazy I α do PI(4,5)P₂ może być odpowiedzialny C-końcowy fragment domeny katalitycznej enzymu, zawierający wspomnianą wyżej pętlę aktywującą. Wykazano, że fragment ten otrzymany jako rekombinowane białko C₃₇₄₋₄₄₀-GST, wiąże PI(4,5)P₂ trzykrotnie razy silniej niż PI(4)P [79].

Poza podobieństwem w strukturze domen katalitycznych, końce N i C trzech izoform PIP5-kinazy typu I nie wykazują homologii sekwencji i przypuszczalnie (oddziałując z innymi białkami?) zaangażowane są w regulację aktywności enzymatycznej oraz indywidualnej dla każdej z izoform funkcji w komórce [40]. Izofорма α PIP5-kinazy I wiąże się z błoną komórkową w odpowiedzi na stymulację receptorów i zaangażowana jest w szereg procesów z udziałem cytoszkieletu aktynowego, takich jak: migracja komórki, fagocytoza oraz tzw. *ruffling* błony komórkowej [14, 20, 42]. Wykazano też jej obecność w jądrze komórkowym [56]. PIP5-kinaza I β uczestniczy w procesach endocytozy oraz gromadzi się w pęcherzykach cytoplazmatycznych w pobliżu jądra [64]. Wśród trzech izoform PIP5-kinazy I γ , PIP5-kinaza I γ 87 jest elementem ścieżek sygnałowych receptorów sprzężonych z trimerycznymi białkami G. Natomiast PIP5-kinaza I γ 90 akumuluje się w miejscach adhezji komórek do substratu oraz synapsach komórek nerwowych, a PIP5-kinaza I γ 93 jest zaangażowana w formowanie wypustek komórek nerwowych [17, 24, 58, 88].

Jak przedstawiono na rycinie 5, aktywność PIP5-kinaz typu I jest kontrolowana przez wiele czynników, wśród których zidentyfikowano monomeryczne GTPazy z rodziny Rho i Arf6. GTPazy te mogą też brać udział w wiązaniu PIP5-kinaz I z błoną komórkową

[1, 20, 63]. Regulatorem aktywności PIP5-kinaz I jest też kwas fosfatydowy (PA). PA powstaje w wyniku fosforylacji diacyloglicerolu (DAG), dlatego też kinaza DAG (izoforma ξ) jest jednym z enzymów stymulujących aktywność PIP5-kinazy I α [52]. Ponadto, PA jest też produktem hydrolizy fosfatydylocholiny przez fosfolipazę D (PLD). Fosfolipazy D są aktywowane przez PI(4,5)P₂, ponadto PLD1 jest aktywowana przez GTPazy Rho i Arf6. Ta wzajemna stymulacja PIP5-kinaz I i PLD oraz regulacja aktywności obu tych enzymów przez monomeryczne GTPazy wskazuje na istnienie złożonego mechanizmu szybkiej i lokalnej syntezy PI(4,5)P₂ w komórce opartej na aktywującej pętli zwrotnej [62]. Ponadto, autofosforylacja lub fosforylacja PIP-kinazy I z udziałem kinazy białkowej A zachodząca na reszcie seryny zlokalizowanej w miejscu wiązania substratu obniża aktywność katalityczną tej kinazy [36, 65, 91].

ROZMIESZCZENIE PI(4,5)P₂ W BŁONIE KOMÓRKOWEJ I JEGO FUNKCJE

Czasowa i przestrzenna regulacja syntezy PI(4,5)P₂ może sprzyjać powstawaniu mikroskopień PI(4,5)P₂ w płaszczyźnie błony komórkowej. Wyodrębnianie się mikroskopień PI(4,5)P₂ jest też prawdopodobnie wspomagane poprzez ograniczoną dyfuzję lateralną tego lipidu w płaszczyźnie błony wymuszoną poprzez oddziaływania elektrostatyczne PI(4,5)P₂ z wybranymi białkami cytoszkieletu podbłonowego, bliżej scharakteryzowanymi w następnym rozdziale. Obecność wielu odrębnych puli PI(4,5)P₂ w błonie komórkowej może być czynnikiem ułatwiającym wielofunkcyjność tego lipidu [31, 37]. Obserwacje mikroskopowe dostarczają jednak sprzecznych danych na temat rozmieszczenia PI(4,5)P₂ w błonie komórkowej. Analiza ultrastrukturalna oraz badania prowadzone techniką przeniesienia energii fluorescencji FRET z zastosowaniem sondy białkowej swoistej wobec PI(4,5)P₂ połączonej z białkami fluorescencyjnymi CFP i YFP przeczą istnieniu mikroskopień tego lipidu w błonie [46, 85, 89]. Z drugiej strony, szereg innych doniesień wskazuje na obecność mikroskopień PI(4,5)P₂ w błonie komórkowej zarówno komórek spoczynkowych, jak i aktywowanych i asocjacje tych skupisk z tzw. tratwami lipidowymi (ang. *rafts*), czyli mikrodomenami błony komórkowej wzbogaconymi w sfingolipidy i cholesterol [26, 34, 47, 66]. Za obecnością PI(4,5)P₂ w obrębie wspomnianych mikrodomen przemawiają takie dowody, jak: współwystępowanie skupisk PI(4,5)P₂ z glikolipidem GM1, składnikiem tratw lipidowych, ich wrażliwość na ekstrakcję cholesterolu, a także fakt, że występujące w dużym stężeniu w komórkach acylowane białka MARCKS i GAP-43 wiążą PI(4,5)P₂ i mogą uczestniczyć w asocjacji PI(4,5)P₂ z mikrodomenami [47, 66, 83]. Postuluje się, że mikrodomeny sfingolipidowo-cholesterolowe funkcjonują w komórce jako miejsca transdukcji sygnału wybranych receptorów, do których należą immunoreceptor Fc γ IIA, receptory antygenowe limfocytów T i B (TCR i BCR) oraz receptor ligandu Fas inicjujący apoptozę [9, 23, 27, 33].

Na obecność PI(4,5)P₂ w obrębie mikrodomen sfingolipidowo-cholesterolowych wskazują też wyniki badań biochemicznych, w których analizowano skład lipidowy frakcji komórkowych otrzymywanych w wyniku ultrawierwienia detergentowych lizatów komórek. Ze uwagi na nierozpuszczalność w detergentach niejonowych, takich jak Triton

X-100, i wysoką zawartość lipidów, sfingolipidowo-cholesterolowe mikrodomeny błony komórkowej izolowane są w trakcie ultrawierowania jako frakcje o niskiej gęstości właściwej, tzw. frakcje DRM (ang. *Detergent Resistant Membrane*). Stwierdzono, że PI(4,5)P₂ wzbogacony był we frakcjach DRM izolowanych z płytek krwi, ludzkich monocytów linii U937, komórek neuroblastomy linii Neuro2 i komórek nabłonkowych linii MDCK [7, 68, 79]. We frakcji DRM komórek nabłonkowych linii A431 wykazano też wzbogacenie fosfatydyloinozytoli i PI(4)P oraz PI4-kinazy, sugerując, że mikrodomeny mogą być centrum syntezy różnych fosfatydyloinozytoli w błonie komórkowej [72, 90]. Za tą tezę przemawiają dane wskazujące na istnienie puli PIP5-kinazy I w obrębie frakcji DRM izolowanej z monocytów linii U937 [79]. Wykazano też, że aktywacji receptora FcγRIIIa w komórkach linii BHK ze stabilną ekspresją tego receptora towarzyszy rekrutacja PIP5-kinazy I do błony komórkowej, której pulę zidentyfikowano razem z aktywowanym receptorem FcγIIa we frakcji DRM. Proces ten był skorelowany ze wzrostem poziomu PI(4,5)P₂ w obrębie frakcji DRM, który monitorowano za pomocą specyficznej sondy białkowej (PLC-PH-GFP) [79], omówionej poniżej. Badania ultrastrukturalne nad lokalizacją PI(4,5)P₂ w czasie aktywacji receptora FcγIIa, przeprowadzone na fragmentach natywnych błon komórkowych wykazały, że PI(4,5)P₂ obecny jest na obrzeżach struktur elektronowo-gęstych, obrazujących przypuszczalnie konglomeraty mikrodomen powstające w czasie aktywacji receptora [76, 79, 92].

Jak wspomniano, rola PI(4,5)P₂ jako lipidu sygnałowego wynika z faktu, że jego metabolizm związany jest z generacją trzech przekaźników drugiego rzędu (ryc. 3). Hydroliza PI(4,5)P₂ katalizowana przez fosfolipazę C (PLC) prowadzi do powstania inozytolo-1,4,5-trisfosforanu (IP₃) i DAG, które indukują odpowiednio, wewnątrzkomórkowy wyrzut jonów Ca²⁺ z retikulum endoplazmatycznego oraz aktywację enzymów asocjujących z DAG w błonie komórkowej, np. kinazy białkowej C. Dalsza fosforylacja DAG przez kinazę diacyloglicerolu prowadzi do powstania PA, który ze względu na swoje właściwości (mała polarna głowa oraz długie reszty kwasów tłuszczowych) przypuszczalnie uczestniczy w zakrzywianiu błony komórkowej, co jest istotne np. podczas wysuwania pseudopodiów oraz tworzenia fagosomu w czasie fagocytozy. PA jest także aktywatorem licznych enzymów m.in. PIP5-kinazy I, stymulując lokalną syntezę PI(4,5)P₂ w drodze pozytywnego sprzężenia zwrotnego [15, 93]. W wyniku fosforylacji PI(4,5)P₂ katalizowanej przez PI3-kinazę powstaje PI(3,4,5)P₃. W komórkach spoczynkowych lipid ten występuje w śladowych ilościach, natomiast jego nagła synteza jest obserwowana między innymi w czasie migracji komórek i fagocytozy [28, 93]. Temat roli wtórnych przekaźników sygnału jest podejmowany w licznych artykułach przeglądowych [11, 41, 59, 82], także polskojęzycznych [5, 6, 77] i nie będzie szczegółowo omawiany w niniejszej pracy.

Według hipotezy Cantleya [10], synteza wtórnych przekaźników z udziałem PI(4,5)P₂ jest jednak stosunkowo młodą ewolucyjnie adaptacją Eukaryota w stosunku do wyjściowej roli PI(4,5)P₂ jako lipidowej „kotwicy” uczestniczącej w wiązaniu licznych białek błonowych i cytoplazmatycznych (ryc. 3). Wiązanie białek do PI(4,5)P₂ wywołuje zmianę ich konformacji i aktywności, wpływając ostatecznie na procesy zachodzące z udziałem tych białek. Wśród białek, których aktywność zależy od PI(4,5)P₂, są integralne białka błony komórkowej o charakterze pomp lub kanałów.

Zależność tę wykazano dla ponad 20 białek transportowych, a wśród nich kanałów dla jonów potasu zależnych od ATP (K_{ATP}), pompy Na^+/Ca^{2+} (NCX1) i pompy Na^+/H^+ (NHE1-4) [28, 62]. Ponadto, $PI(4,5)P_2$ ułatwia asocjację z błoną komórkową szeregu białek cytoplazmatycznych, takich jak np. PL δ oraz białka AP2 i dynaminy, które uczestniczą w endocytozie.

Najliczniejszą i najlepiej poznaną grupą białek, których lokalizacja i aktywność zależą od $PI(4,5)P_2$, są białka cytoszkieletu aktynowego. Modulując ich aktywność $PI(4,5)P_2$ kontroluje wszystkie aspekty organizacji cytoszkieletu aktynowego. Wśród nich są białka z rodziny WASP/NWASP, będące białkami efektorowymi monomerycznych GTPaz: Rac i Cdc42. Oddziałując z domeną WH1 (ang. *WASP homology 1 domain*) białka WASP, $PI(4,5)P_2$ powoduje zmianę konformacyjną tego białka, co prowadzi do odsłonięcia C-terminalnego fragmentu WASP wiążącego z kolei białka Arp2/3. Powstały kompleks białkowy WASP-Arp2/3 ułatwia polimeryzację aktyny *de novo*. $PI(4,5)P_2$ uczestniczy także w procesie wydłużania istniejących filamentów aktynowych poprzez regulację aktywności żelzolini i białka CapG. Po związaniu $PI(4,5)P_2$ białka te oddysocjują od filamentów aktynowych, odsłaniając ich koniec „+” (koniec filamentu, z którym asocjują monomery aktyny), umożliwiając wydłużanie mikrofilamentów. Inne białko, profilina, pod wpływem $PI(4,5)P_2$ uwalniania sekwestrowane przez nią monomery aktyny. Ponadto $PI(4,5)P_2$ kontroluje też aktywność α -aktywniny, białka sieciującego filamety aktynowe. Poza tym wpływa na asocjację mikrofilamentów z błoną komórkową poprzez modulację aktywności takich białek, jak: winkulina, talina i białka z rodziny ERM [75, 81, 94]. Ta ostatnia z funkcji $PI(4,5)P_2$ została potwierdzona przez zespół Rauchera [71], który obserwował, że w wyniku obniżenia poziomu $PI(4,5)P_2$ w komórkach dochodzi do osłabienia oddziaływania pomiędzy błoną komórkową a cytoszkieletem, a w rezultacie do zmiany kształtu komórek i ich odrywania od podłoża.

Ostatnie doniesienia wskazują także, że regulacyjna rola $PI(4,5)P_2$ nie ogranicza się do cytoszkieletu aktynowego. Stwierdzono, że w krawędzi wiodącej migrującej komórki $PI(4,5)P_2$ uczestniczy w stabilizacji końca „+” mikrotubul, stojąc na przecięciu ścieżek kontrolujących udział mikrotubul i filamentów aktynowych w migracji komórek [26]. Ponadto, szereg prac wskazuje na istnienie jądrowej puli $PI(4,5)P_2$ uczestniczącej w obróbce posttranskrypcyjnej RNA [39, 57, 61].

DOMENY BIAŁKOWE WIĄŻĄCE $PI(4,5)P_2$

Wiązanie białek do fosfatydyloinozytoli jest wynikiem oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy ujemnym ładunkiem reszt fosforanowych pierścienia inozytoli lipidów a dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi białek. Powierzchnia białka, która oddziałuje z fosfatydyloinozytolami, może zawierać odcinek bogaty w aminokwasy zasadowe bądź stanowić globularny moduł białkowy, którego struktura trzeciorzędowa decyduje o stereospecyficznej interakcji z polarną główką fosfatydyloinozytoli. Liczba odkrytych ustrukturyzowanych domen białkowych wiążących

fosfatydyloinozytyle stale rośnie i obecnie obejmuje m.in. domeny: FYVE (ang. *Fab1*, *YGLO23*, *Vps27*, *EEA1*), PX (ang. *Phox Homology domain*), PH (ang. *Pleckstrin Homology domain*), ANTH (ang. *AP-180 N-Terminal Homology domain*) ENTH (ang. *Epsin N-Terminal Homology domain*), Tubby i FERM (z ang. *4.1-ezrin/radixin/moesin*) [3, 48]. Większość zidentyfikowanych do tej pory motywów preferencyjnie wiąże fosfatydyloinozytyle ufosforylowane w pozycji 3 pierścienia inozytolu, takich jak: PI(3,4)P₂ i PI(3,4,5)P₂ [94]. Do domen wiążących PI(4,5)P₂ należą domeny PH, FERM oraz ANTH i ENTH [29,32].

Domena PH została po raz pierwszy zidentyfikowana w plekstrynie, białku płytek krwi [30]. Obecnie wykryto szereg homologicznych domen w ponad 100 białkach sygnałowych, takich jak: kinazy białkowe, czynniki wymiany nukleotydów (GEF) małych GTPaz (np. białko Vav), fosfolipazy Cδ, β, γ i η oraz w wielu białkach cytoszkieletalnych [3, 13, 28]. Domena PH to moduł białkowy zbudowany z około 120 aminokwasów o dość niskiej homologii sekwencji, ale zachowanej ewolucyjnie strukturze trzeciorzędowej. Budowa domeny PH przypomina kieszeń, w której łańcuchy boczne argininy i lizyny wiążą grupy fosforanowe przyłączone do pierścienia inozytolowego fosfatydyloinozytoli. Większość domen PH zidentyfikowanych do tej pory wykazuje małe powinowactwo do PI(4,5)P₂ ($K_D \approx 10 \mu\text{M}$) i może też tworzyć wiązania z innymi fosfatydyloinozytolami [21, 49, 60]. Niejednokrotnie siła tworzonych wiązań jest zbyt niska, by stabilnie zakotwiczyć białko przy błonie. Nie jest wykluczone, że w takich sytuacjach inkorporacja części hydrofobowej domeny PH w dwuwarstwę błony i/lub oligomeryzacja białka wzmacnia jego wiązanie z fosfatydyloinozytolami. Tak jest w przypadku zaangażowanego w proces endocytozy białka dynaminy, które wiąże PI(4,5)P₂ oligomeryzując u podstawy tworzonego pęcherzyka, a także spektryny wiążącej PI(4,5)P₂ w aparacie Golgiego [60]. Unikatowa pod tym względem domena PH fosfolipazy Cδ1 wykazuje wysokie powinowactwo do PI(4,5)P₂ ($K_D = 1,2 \mu\text{M}$) [56] i wybiórczo rozpoznaje tylko ten fosfatydyloinozytol oraz jego deacylowaną, cytoplazmatyczną pochodną IP₃ [12, 50]. Natomiast domeny PH białek Fapp1 oraz Grp1 wiążą specyficznie PI(4)P oraz PI(3,4,5)P₃ [21]. Obie te domeny znalazły zastosowanie w badaniach nad rolą fosfatydyloinozytoli w procesach komórkowych [25, 28, 93].

Wykorzystując duże powinowactwo i specyficzność wiązania domeny PH fosfolipazy Cδ1 do PI(4,5)P₂ skonstruowano białko fuzyjne zbudowane z tej domeny połączonej z GFP (PLC-PH-GFP). Powstała sonda użyta była do przyżyciowych badań mikroskopowych nad lokalizacją PI(4,5)P₂ w komórce (ryc. 2A) i procesami zachodzącymi z udziałem PI(4,5)P₂, takimi jak endocytoza receptorowa i fagocytoza zależna od receptorów Fcγ [8, 86]. W badaniach nad fagocytozą zastosowanie sondy PLC-PH-GFP w przyżyciowej mikroskopii konfokalnej pozwoliło wykryć dynamikę zmian poziomu PI(4,5)P₂ towarzyszących internalizacji cząstki. Wykazano, że PI(4,5)P₂ gromadzi się przejściowo w wysuwających się pseudopodiach kubka fagocytarnego obejmującego cząstkę. Wraz z postępującą internalizacją cząstki, lipid ten ulega przemianom, o czym świadczy stopniowy zanik znakowania błony przez białko PLC-PH-GFP u podstawy tworzonego kubka fagocytarnego. Zmniejszenie ilości PI(4,5)P₂ w błonach fagosomu

może być związane z jego hydrolizą przez PLC γ , co potwierdzono, dokonując jednoczesnej ekspresji domeny PH sprzężonej z CFP, niebieskim białkiem fluorescencyjnym (PLC-PH-CFP) oraz innego białka wiążącego DAG, skonstruowanego przy wykorzystaniu domeny C1 kinazy białkowej C sprzężonej z YFP, żółtym białkiem fluorescencyjnym (PKC-C₁-YFP). Wykazano w ten sposób, że dysocjacja PLC-PH-CFP od błon formowanego fagosomu jest skorelowana z postępującą i przejściową asocjacją sondy PKC-C₁-YFP odzwierciedlającą syntezę DAG [8, 74]. Ponieważ hydroliza PI(4,5)P₂ nie jest jedyną drogą przemian tego lipidu, analizowano również dynamikę asocjacji sond wiążących PI(3,4,5)P₃ z błoną komórkową w miejscu fagocytozy. Wykazano, że białka wiążące PI(3,4,5)P₃, takie jak Akt-PH-GFP i Gab1-PH-GFP, akumulują się pod błoną komórkową w miejscu fagocytozy już w pierwszej minucie od jej zapoczątkowania i oddysocjują przed utworzeniem fagosomu [53]. Wyniki te potwierdzają wykazany wcześniej udział PI3-kinazy w wysuwaniu pseudopodiów, tj. we wczesnych etapach fagocytozy [2, 16].

Domene FERM wiążącą PI(4,5)P₂ zidentyfikowano w rodzinie białek ERM (ezryna/radyksyna/moezyna) pośredniczących w interakcji cytoszkieletu aktynowego z błoną komórkową. Domena ta składa się z około 300 aminokwasów zorganizowanych w trzy motywy A-C, z których ostatni, C, przypomina budową domenę PH. Analiza krystalograficzna radyksyny, jednego z białek ERM, wykazała, że PI(4,5)P₂ wnika w kieszeń bogatą w aminokwasy zasadowe utworzoną przez motyw C oraz A [29]. Związanie PI(4,5)P₂ znosi wewnątrzcząsteczkowe auto-hamujące oddziaływanie motywu C domeny FERM z C-terminalnym końcem białka, umożliwiając z jednej strony jego wiązanie do filamentów aktynowych, a z drugiej interakcję z białkami integralnymi i PI(4,5)P₂ błony komórkowej [3]. Podobnie, zmiana struktury wywołana wiązaniem PI(4,5)P₂ niezbędna jest do aktywacji białek z rodziny WASP. W wiązaniu PI(4,5)P₂ uczestniczy domena WH1, zbliżona w budowie do domeny PH, oraz sekwencja bogata w aminokwasy zasadowe białka WASP [56]. Do zdefiniowanych motywów białkowych wiążących PI(4,5)P₂ należą także domeny ANTH i ENTH, które zostały zidentyfikowane w białkach uczestniczących w tworzeniu pęcherzyków oplaszczonych klatryną, takich jak: białko AP180, CALM i epsyna.

Liczne białka uczestniczące w reorganizacji cytoszkieletu, jak profilina i żelzolina wiążą PI(4,5)P₂, za pomocą krótkich (10–20 aminokwasów) sekwencji bogatych w aminokwasy zasadowe i hydrofobowe. W przypadku żelzolino zidentyfikowane zostały dwie takie sekwencje, jednak każda z nich oddzielnie wykazywała jedynie słabe wiązanie do PI(4,5)P₂, w przeciwieństwie do całego białka, co wskazuje, że obie sekwencje niezbędne są do wiązania tego fosfolipidu [84]. Podobne krótkie sekwencje bogate w aminokwasy zasadowe występują także w rodzinie białek podbłonowych, do której należą: GAP-43 (ang. *Growth Associated Protein*), CAP-23 (ang. *Cytoskeleton-Associated Protein*) i MARCKS (ang. *Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate*). Białka tej grupy mają N-końcową modyfikację lipidową w postaci reszty kwasu mirystynowego bądź palmitynowego, która umożliwia ich zakotwiczenie w błonie. W bezpośrednim sąsiedztwie reszty acylowej zlokalizowana jest tzw. domena efektorowa wiążąca fosfolipidy, kalmodulinę i filamenty aktynowe. W obrębie tej domeny znajduje się też miejsce fosforylacji przez kinazę białkową C. Jak wykazały badania biofizyczne, jedna

cząsteczka białka MARCKS wiążąc trzy cząsteczki PI(4,5)P₂ wymusza formowanie mikroskopień tego lipidu w błonie [22]. GAP-43 jako białko zlokalizowane w obrębie mikrodomen sfingolipidowo-cholesterolowych może dodatkowo ułatwiać akumulację PI(4,5)P₂ w ich obrębie [83]. Uważa się, że białka typu MARCKS i GAP-43 sekwestrują PI(4,5)P₂ w komórkach spoczynkowych, i odsłaniają ten lipid w czasie aktywacji komórki oddysocjując od błony komórkowej w wyniku fosforylacji i związania Ca²⁺/kaldmoduliny. Uwolniony PI(4,5)P₂ może być wiązany przez inne białka lub stawać się substratem dla PLC [55, 73].

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawiony powyżej przegląd najnowszych doniesień na temat PI(4,5)P₂ potwierdza tezę o kluczowej roli tego lipidu w modulowaniu aktywności szeregu białek błony komórkowej i cytoszkieletu podbłonowego. Badania te poszerzyły nasze spojrzenie na komórkowe funkcje PI(4,5)P₂, zdominowane często przez pogląd, że lipid ten jest przede wszystkim źródłem przekazników drugiego rzędu generowanych w wyniku aktywacji szerokiego spektrum receptorów obecnych w błonie komórkowej. Wydaje się, że „wszechstronność” PI(4,5)P₂ możliwa jest dzięki istnieniu lokalnych skupień tego lipidu i interakcji PI(4,5)P₂ z białkami podbłonowymi. Jednym ze sposobów zapewnienia heterogennego rozmieszczenia PI(4,5)P₂ w obrębie błony komórkowej może być skupianie się tego lipidu, a także PIP5-kinaz typu I syntetyzujących PI(4,5)P₂, w obrębie sfingolipidowo-cholesterolowych mikrodomen błony komórkowej. Taki scenariusz otwiera pytania o mechanizmy regulujące aktywność i lokalizację PIP5-kinaz typu I w komórce, które znamy tylko fragmentarycznie. Nowe perspektywy w badaniach nad funkcjami PI(4,5)P₂ (i innych lipidów) w komórce otworzyło wykrycie ustrukturyzowanych domen białkowych oddziałujących specyficznie z lipidami. Rekombinowane białka powstałe z połączenia takich domen i białek fluorescencyjnych stały się wyrafinowanym narzędziem badawczym stosowanym coraz częściej w przyżyciowej mikroskopii konfokalnej.

LITERATURA

- [1] AIKAWA Y, MARTIN TF. ADP-ribosylation factor 6 regulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate synthesis, endocytosis, and exocytosis. *Methods Enzymol* 2005; **404**: 422–431.
- [2] ARAKI N, JOHNSON MT, SWANSON JA. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell* 1996; **135**: 1249–1260.
- [3] BALLA T. Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci* 2005; **118**: 2093–2104.
- [4] BALLA T, VARNAI P. Visualizing cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-modules. *Sci STKE* 2002; **125**: 1–16.
- [5] BARAŃSKA J. Udział pochodnych inozytoli w przekazywaniu informacji. Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. Liliana Konarska (red.) Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1995: 138–153.

- [6] BARAŃSKA J, CZAJKOWSKI R, CZARNY M, SABAŁA P, WIKTOREK M. Przekazywanie informacji w komórce. Fosfolipidy jako cząsteczki sygnałowe. *Post Biochem* 1996; **42**: 140–145.
- [7] BODIN S, GIURIATO S, RAGAB J, HUMBEL BM, VIALA C, VIEU C, CHAP H, PAYRASTRE B. Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochem* 2001; **40**: 15290–15299.
- [8] BOTELHO RJ, TERUEL M, DIERCKMAN R, ANDERSON RGW, WELLS A, ZORK JD, MEYER T, GRINSTEIN S. Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 2000; **151**: 1353–1367.
- [9] CABALLERO A, KATKERE B, WEN XY, DRAKE L, NASHAR TO, DRAKE JR. Functional and structural requirements for the internalization of distinct BGR-ligand complexes. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 3131–3145.
- [10] CANTLEY LC. Transcription. Translocating tubby. *Science* 2001; **292**: 2019–2021.
- [11] CHALHOUB N, BAKER SJ. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol* 2008; **4**: 127–150.
- [12] CIFUENTES ME, DELANEY T, REBECCHI MJ. D-myo-inositol -1,4,5-trisphosphate inhibits binding of phospholipase C- δ 1 to bilayer membranes. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1945–1948.
- [13] COCKCROFT S. The latest phospholipase C, PLC ζ , is implicated in neuronal function. *Trends Biochem Sci* 2006; **31**: 4–7.
- [14] COPPOLINO MG, DIERCKMAN R, LOIJENS J, COLLINS RF, POULADI M, JONGSTRA-BILEN J, SCHREIBERAD, TRIMBLE WS, ANDERSON R, GRINSTEIN S. Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase α impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 43849–43857.
- [15] CORROTTE M, CHASSEROT-GOLAZ S, HUANG P, DU G, KTISTAKIS NT, FROHMAN MA, VITALE N, BADER MF, GRANT NJ. Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic* 2006; **7**: 365–377.
- [16] COXD, BERG JS, CAMMER M, CHINEGWUNDOH JO, DALE BM, CHENEY RE, GREENBERG S. Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 469–477.
- [17] DI PAOLO G, PELLEGRINI L, LETINIC K, CESTRA G, ZONCU R, VORONOV S, CHANG S. Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type γ by the FERM domain of talin. *Nature* 2002; **420**: 85–89.
- [18] DI PAOLO G, DE CAMMILI P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature Rev* 2006; **10**: 651–657.
- [19] DOUGHMAN RL, FIRESTONE RL, ANDERSON RA. Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI(4,5)P $_2$ in its place. *J Membr Biol* 2003; **194**: 77–89.
- [20] DOUGHMAN RL, FIRESTONE AJ, WOJTASIAK ML, BUNCE MW, ANDERSON RA. Membrane ruffling requires coordination between type I phosphatidylinositol phosphate kinase and Rac signaling. *J Biol Chem* 2003; **278**: 23036–23045.
- [21] DOWLER S, CURRIE RA, CAMPBELL DG, DEAK M, KULAR G, DOWNES CP, ALESSI DR. Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem J* 2000; **351**: 19–31.
- [22] GAMBHIR A, HANGYAS-MIHALYNE G, ZAITSEVA I, CAFISO DS, WANG J, MURRAY D, PENTY-ALA SN, SMITH SO, MCLAUGHLIN S. Electrostatic sequestration of PIP $_2$ on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys J* 2004; **86**: 2188–207.
- [23] GARCIA-GARCIA E, BROWN EJ, ROSALES C. Transmembrane mutations to Fc γ RIIA alter its association with lipid rafts: implications for receptor signaling. *J Immunol* 2007; **178**: 3048–3058.
- [24] GIUDICI ML, EMSON PC, IRVINE RF. A novel neuronal-specific splice variant of Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoform γ . *Biochem J* 2004; **379**: 489–496.
- [25] GODI A, DI CAMPLI A, KONSTANTAKOPOULOS A, DI TULLIO G, ALESSI DR, KULAR GS, DANIELE T, MARRA P, LUCOCQ JM, DE MATTEIS MA. FAPPs control Golgi -to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 393–404.
- [26] GOLUB T, CARONI P. PI(4,5)P $_2$ -dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J Cell Biol* 2005; **169**: 151–165.
- [27] GRASMME H, JEKLE A, RIEHLE A, SCHWARTZ A, BERGER J, SANDHOFF K, KOLESNIK R, GULBINS. CD95 signaling via ceramide rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2001; **276**: 20589–20596.
- [28] HALET G. Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biol Cell* 2005; **97**: 501–518.

- [29] HAMADA K, SHIMIZU T, MATSUIT T, TSUKITA S, HAKOSHIMA T. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanism of the radixin FERM domain. *EMBO J* 2000; **19**: 4449–4462.
- [30] HARLAN JE, HAJDUK PJ, YOON HS, FESIK SW. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 1994; **371**: 168–170.
- [31] HINCHLIFFE KA, CIRUELAA, IRVINE RF. PIPkins I, their substrates and their products: new functions for old enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1436**: 87–104.
- [32] HOM RA, VORA M, REGNER M, SUBACH OM, CHO W, VERHUSHA VV, STAHELIN RV, KUTATE-LADZE TG. PH-depending binding of the Epsin ENTH domain and the AP 180 ANTH domain to PI(4,5)P₂-containing bilayers. *J Mol Biol* 2007; **373**: 412–423.
- [33] HOREJSI V. The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev* 2003; **191**: 148–164.
- [34] HUANG S, LIFSCHITZ L, PATKI-KAMATH V, TUFT R, FOGARTY K, CZECH MP. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-rich plasma membrane patches organize active zones of endocytosis and ruffling in cultured adipocytes. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 9102–9123.
- [35] ISHIHARA H, SHIBASAKI Y, KIZUKI N, WADA T, YAZAKI Y, ASANO T, OKA Y. Type I Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8741–8748.
- [36] ITOH T, ISHIHARA H, SHIBASAKI Y, OKA Y, TAKENAWA T. Autophosphorylation of type I phosphatidylinositol phosphate kinase regulates its lipid kinase activity. *J Biol Chem* 2000; **275**: 19398–19394.
- [37] JANMEY PA, LINDBERG U. Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 658–666.
- [38] JARQUIN-PARDO M, FITZPATRICK A, GALIANO FJ, FIRST EA, DAVIS JN. Phosphatidic acid regulates the affinity of the murine phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase- β for phosphatidylinositol-4-phosphate. *J Cell Biochem* 2007; **100**: 112–128.
- [39] JONES DR, BULTSMA Y, KEUNE WJ, DIVECHA N. Methods for the determination of the mass of nuclear PtdIns4P, PtdIns5P, and PtdIns(4,5)P₂. *Methods Mol Biol* 2009 **462**: 75–88.
- [40] KANAHO Y, KOBAYASHI-NAKANO A, YOKOZEKI T. The phosphoinositide kinase PIP5K that produces the versatile signaling phospholipid PI(4,5)P₂. *Biol Pharm Bull* 2007; **30**: 1605–1609.
- [41] KASHIWADA M, ROTHMAN PB. PIP₃ pathway in regulatory T cells and autoimmunity. *Immunol Res* 2007; **39**: 194–224.
- [42] KISSELEVA M, FENG Y, WARD M, SONG C, ANDERSON RA, LONGMORE GD. The LIM protein *Ajuba* regulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels in migrating cells through an interaction with and activation of PIPK1 α . *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 3956–3966.
- [43] KLEIN RM, UFRET-VINCENTY CA, HUA L, GORDON SE. Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂) is the endogenous lipid regulating TRPV1. *J Biol Chem* 2008; **283**: 26208–26216.
- [44] KUNZ J, WILSON MP, KISSELEVA M, HURLEY JH, MAJERUS PW, ANDERSON RA. The activation loop of phosphatidylinositol phosphate kinases determines signaling specificity. *Mol Cell* 2000; **5**: 1–11.
- [45] KUNZ J, FUELLING A, KOLBE L, ANDERSON RA. Stereo-specific substrate recognition by phosphatidylinositol phosphate kinases is swapped by changing a single amino acid residue. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5611–5619.
- [46] KWIK J, BOYLE S, FOOKSMAN D, MARGOLIS L, SHEETZ MP, EDIDIN M. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13964–13969.
- [47] LAUX T, FUKAMI K, THELEN M, GOLUB T, FREY D, CARONI P. GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P₂ at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol* 2000; **149**: 1455–1471.
- [48] LEMMON MA. Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 2003; **4**: 201–213.
- [49] LEMMON MA, FERGUSON KM. Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* 2001; **29**: 377–384.
- [50] LEMMON MA, FERGUSON R, O'BRIEN R, SIGLER PB, SCHLESSINGER J. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 10472–10476.
- [51] LOIJENS JC, ANDERSON RA. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* 1996; **271**: 32937–32943.
- [52] LUO B, PRESCOTT S, TOPHAM M. Diacylglycerol kinase ξ regulates phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α by a novel mechanism. *Cell Signal* 2004; **16**: 891–897.

- [53] MARSCHALL , BOOTH JW, STAMBOLIC V, MAK T, BALLA T, SCHREIBER AD, MEYER T, GRINSTEIN S. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc γ receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1369–1380.
- [54] MAO YS, YAMAGA M, ZHU X, WEI Y, SUN HQ, WANG J, YUN M, WANG Y, DI PAOLO G, BENNETT M, MELLMAN I, ABRAMS CS, DE CAMILLI P, LU CY, YIN HL. Essential and unique roles of PIP5K γ and α in Fc γ receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol* 2009; **184**: 281–296.
- [55] MCLAUGHLIN S, MURRAY D. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 2005; **43**: 605–611.
- [56] MCLAUGHLIN S, WANG J, GAMBHIR A, MURRAY D. PIP₂ and proteins: interaction, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002; **31**: 151–175.
- [57] MELLMAN DL, GONZALES ML, SONG C, BARLOW CA, WANG P, KENDZIORSKI C, ANDERSON RA. A PtdIns(4,5)P₂-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select m RNAs. *Nature* 2008; **451**: 1013–1017.
- [58] NAKANO-KOBAYASHI A, YAMAZAKIM, UNOKIT, HONGUT, MURATA C, TAGUCHI, KATADAT. Role of activation of PIP5K γ 661 by AP-2 complex in synaptic vesicle endocytosis. *EMBO J* 2007; **26**: 1105–1116.
- [59] NEWTON AC. Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res* 2008; Nov 24.
- [60] NIGGLI V. Structural properties of lipid-binding sites in cytoskeletal proteins. *Trends Biochem Sci* 2001; **26**: 604–611.
- [61] OSBORNE SL, THOMAS CL, GSCHMEISSNER S, SCHIAVO G. Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J Cell Sci* 2001; **114**: 2501–2511.
- [62] OUDE WEERNINK PA, SCHMIDT M, JAKOBS KH. Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. *Eur Pharmacol* 2004; **500**: 87–99.
- [63] OUDE WEERNINK PA, MELETIADIS K, HOMMELTENBERG S, HINZ M, ISHIHARA H, SCHMIDT M, JAKOBS KH. Activation of Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem* 2004; **279**: 7840–7849.
- [64] PADRON D, WANG YJ, YAMAMOTO M, YIN H, ROTH MG. Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase β recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of constitutive endocytosis. *J Biol Chem* 2003; **162**: 693–701.
- [65] PARK SJ, ITOH T, TAKENAWA T. Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase type I is regulated through phosphorylation response by extracellular stimuli. *J Biol Chem* 2001; **276**: 4781–4787.
- [66] PARMRYD I, ADLER J, PATEL R, MAGEE AI. Imaging metabolism of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in T-cell GM1-enriched domains containing Ras proteins. *Exp Cell Res* 2003; **285**: 27–38.
- [67] PIKE LJ, CASEY L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26453–26456.
- [68] PIKE LJ, MILLER JM. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 1998; **273**: 22298–22304.
- [69] RAMEH LE, TOLIAS KF, DUCKWORTH BC, CANTLEY LC. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 1997; **390**: 192–196.
- [70] RAO VD, MISRA S, BORONENKOV IV, ANDERSON RA, HURLEY JH. Structure of type II β phosphatidylinositol phosphate kinase: a protein kinase fold flattened for interfacial phosphorylation. *Cell* 1998; **94**: 829–939.
- [71] RAUCHER D, STAUFFER T, CHEN W, SCHEN K, GUO S, YORK JD, SHEETZ MP, MEYER T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* 2000; **100**: 221–228.
- [72] SAITO K, TOLIAS KF, SACI A, KOON HB, HUMPHRIES LA, SCHARENBERG A, RAWLINGS DJ, KINET JP, CARPENTER CL. BTK regulates PtdIns-4,5-P₂ synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity* 2003; **19**: 669–678.
- [73] SCHEETZ MP, SABLE JE, DOBEREINER HG. Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2006; **35**: 417–438.
- [74] SCOTT CC, DOBSON W, BOTELHO RJ, COADY-OSBERG N, CHAVRIER P, KNECHT DA, HEATH C, STAHL P, GRINSTEIN S. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol* 2005; **11**: 139–149.
- [75] SECHI AS, WEHLAND J. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P₂ influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* 2000; **21**: 3685–3695.
- [76] STROSZNAJDER J, JEŚKO H, STROSZNAJDER RP. Fosfolipidy inozytolowe w procesie przekazywania sygnału. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. J.Z. Nowak, J.B. Zawilska (red.) Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2004: 90–104.

- [77] STRZELECKA-KILISZEK A, KORZENIOWSKI M, KWIATKOWSKA K, MROZIŃSKA K, SOBOTA A. Activated FcγRII and signalling molecules revealed in rafts by ultrastructural observations of plasma-membrane sheets. *Mol Membr Biol* 2004; **21**: 101–108.
- [78] SUN Y, LING K, WAGONER MP, ANDERSON RA. Type Iγ phosphatidylinositol phosphate kinase is required for EGF-stimulated directional cell migration. *J Cell Biol* 2007; **178**: 297–308.
- [79] SZYMAŃSKA E, KORZENIOWSKI M, RAYNAL P, SOBOTA A, KWIATKOWSKA K. Contribution of PIP-5 kinase Iα to raft-based FcγRIIA signaling. *Exp Cell Res* 2009; **315**: 981–995.
- [80] SZYMAŃSKA E, SOBOTA E, CZURYŁO E, KWIATKOWSKA K. Expression of PI(4,5)P₂-binding proteins lowers the PI(4,5)P₂ level and inhibits FcγRIIA-mediated cell spreading and phagocytosis. *Eur J Immunol* 2008; **38**: 260–272.
- [81] TAKENAWA T, ITOH T. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1553**: 190–206.
- [82] TOKER A. Phosphoinositides and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 2002; **59**: 761–779.
- [83] TONG J, NGUYEN L, VIDALA, SIMON SA, SKENE JH, MCINTOSH TJ. Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to raft bilayers. *Biophys J* 2008; **94**: 125–133.
- [84] TUOMINEN EK, HOLOPAINEN JM, CHEN J, PRESTWICH GD, BACHILLER PR, KINNUNEN PK, JANMEY PA. Fluorescent phosphoinositide derivatives reveal specific binding of gelsolin and other actin regulatory proteins to mixed lipid bilayers. *Eur J Biochem* 1999; **263**: 85–92.
- [85] VAN RHEENEN J, ACHAME EM, JANSSEN H, CALAFAT J, JALINK K. PIP₂ signaling in lipid domains: a critical re-evaluation. *EMBO J* 2005; **24**: 1664–1673.
- [86] VARNAI P, THYAGARAJAN B, ROHACST, BALLA T. Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol* 2006; **175**: 377–382.
- [87] VERKLEIJ AJ, POST JA. Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction. *J Membr Biol* 2000; **178**: 1–10.
- [88] WANG YJ, LI WH, WANG J, XU K, DONG P, LUO X, YIN HL. Critical role of PIP5Kγ87 in InsP3-mediated Ca²⁺ signaling. *J Cell Biol* 2004; **167**: 1005–1010.
- [89] WATT SA, KULAR G, FLEMING IN, DOWNES CP, LUCOCQ JM. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase Cδ1. *Biochem J* 2002; **363**: 657–666.
- [90] WAUGH MG, LAWSON D, TAN SK, HSUAN JJ. Phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis in immunisolated caveolae-like vesicles and low buoyant density non-caveolar membranes. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17115–17121.
- [91] WENK MR, PELLEGRINI L, KLENCHIN VA, DI PAOLO G, CHANG S, DIANIPELL L, ARIOKA M, MARTIN TF, DE CAMILLI P. PI(4,5)P kinase Iγ is the major PI(4,5)P₂ synthesizing enzyme at the synapse. *Neuron* 2001; **32**: 79–88.
- [92] WILSON BS, PFEIFFER JR, OLIVER JM. Observing FcεRI signaling from the inside of the mast cell membrane. *J Cell Biol* 2000; **149**: 1131–1142.
- [93] YEUNG T, GRINSTEIN S. Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol Rev* 2007; **219**: 17–36.
- [94] YIN HL, JANMEY PA. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* 2003; **65**: 761–789.
- [95] YORK JD, ODOM AR, MURPHY R, IVES EB, WENTE SR. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 1999; **285**: 96–100.
- [96] ZONCU R, PERERA RM, SEBASTIAN R, NAKATSU F, CHEN H, BALLA T, AYALA G, TOOMRE D, DE CAMILLI PV. Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 3793–3798.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 15.04. 2009 r.

Przyjęto: 19.05. 2009 r.

Doc. dr hab. Katarzyna Kwiatkowska

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

e-mail: k.kwiatkowska@nencki.gov.pl