

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, Warszawa

E-mail: bandor@nencki.gov.pl

CZY ANEKSYNY BIORĄ UDZIAŁ W REGULACJI HOMEOSTAZY WAPNIA W KOMÓRCIE?

WPROWADZENIE

Aneksyny tworzą rodzinę białek charakteryzujących się obecnością w ich cząsteczkach rejonów o powtarzającej się sekwencji aminokwasowej. Rejony te, określane w anglojęzycznej literaturze przedmiotu terminem „annexin fold”, odpowiadają za wiązanie aneksyn z jonami wapnia i cząsteczkami kwaśnych fosfolipidów. Pod koniec lat siedemdziesiątych student odbywający praktykę wakacyjną w National Institute for Medical Research w Londynie, w pracowni Michaela J. Geisowa, przypadkiem odkrył aneksyny, niezależnie od Carla Creutza z Uniwersytetu Stanu Wirginia w USA. W 1990 roku Robert Hüber z Instytutu Maxa Plancka, na podstawie analizy krystalograficznej aneksyny V, jako pierwszy opisał strukturę tego białka, zaś w pięć lat później ostatecznie wyjaśniono, w jaki sposób funkcjonuje kanał wapniowy zależny od potencjału błonowego, utworzony przez aneksynę V. Ponad piętnaście lat dzielących te odkrycia to fascynująca historia interdyscyplinarnych badań nad aneksynami, białkami, których funkcja w komórce jest nadal przedmiotem naukowych sporów. Ważnym krokiem w badaniach nad aneksynami było ujednolicenie ich nazewnictwa, gdyż wiele grup badawczych nie zdawało sobie sprawy z przynależności białek pochodzących z różnych tkanek do tej samej rodziny (tab. 1). Nazwa „aneksyny” została nadana rodzinie białek w oparciu o ich podstawową cechę, jaką jest zdolność do łączenia ze sobą błon biologicznych. Do obecnej chwili oczyszczono i scharakteryzowano trzynaście aneksyn oraz wiele specyficznych gatunkowo i tkankowo izoform; dziesięć aneksyn występuje we wszystkich typach komórek ssaków (z wyjątkiem erytrocytów). Aneksyny zidentyfikowano w każdym z badanych pod tym względem organizmów, od ssaków, przez nicienie do śluzowców, pierwotniaków i

roślin. W komórkach ssaków aneksyny stanowią od 0,5% do 2% wszystkich białek (RAYNAL i POLLARD 1994, MOSS 1997). Niektóre z aneksyn opisano aż pod dziesięcioma nazwami (RAYNAL i POLLARD 1994). Nazwy te odzwierciedlały właściwości białek lub były związane z materiałem, z którego otrzymywano aneksyny. Białka, które w sposób zależny od stężenia jonów wapnia wiążą się z fosfolipidami i aktyną, nazwano kalpaktynami. Białka hamujące aktywność fosfolipazy A₂, indukowane przez hormony sterydowe, nazwano lipokortynami, białka wyizolowane z komórek chromochłonnych chromobindynami, zaś białka z zakończeń nerwowych organu elektrycznego drętwy *Torpedo marmorata* kalelektynami (BANDOROWICZ i PIKUŁA 1993, FLOWER i ROTHWELL 1994, CELIO i współred. 1996).

Typowa aneksyna jest monomerem o masie cząsteczkowej 30–40 kDa (aneksyny I, III–V i VIII–XII), 68 kDa (aneksyna VI) lub 45–57 kDa (aneksyna VII). Wyjątkiem jest aneksyna II, która występuje w komórce w dwóch formach: monomerycznej o masie cząsteczkowej 36 kDa i heterotetrameru (p36₂p11₂) o masie cząsteczkowej 85 kDa (CELIO i współred. 1996). Zdolność aneksyn do wiązania *in vitro* z błonami biologicznymi w sposób zależny od stężenia jonów wapnia skłoniła wielu badaczy do snucia przypuszczeń na temat roli, jaką pełnią te białka *in vivo*. Przypuszcza się, że aneksyny mogą brać udział w procesach egzo- i endocytozy, tworzyć kanały jonowe w błonach, być naturalnymi inhibitorami fosfolipazy A₂, hamować proces koagulacji krwinek, odgrywać rolę przekazników sygnału w procesach różnicowania i mitogenezy oraz czynników regulujących procesy adhezji komórek i mineralizacji tkanki łącznej (BANDOROWICZ i PIKUŁA 1993, FLOWER i ROTHWELL 1994, RAYNAL i POLLARD 1994, KAET-

Tabela 1. Nazewnictwo i podstawowe właściwości aneksyn

Anek- syna	Inne nazwy	M. cz. (kDa)	pI	Liczba domen	Długość rejonu N-końcowego*	Organizmy, z których poznano sekwencję aminokwasową aneksyny
I	lipokortyna I, kalpaktyna II, p35, chromobindyna 9/6, GIF, lipomodulina, cp35, cp37	35–40	6,5–6,8	4	40	człowiek, krowa, świnia, szczur, mysz, świnka morska, gołąb, żaba szponiasta, gąbka, lucerna siewna
II	lipokortyna II, kalpaktyna I, p33, p36, chromobindyna 8, białko I, PAP-IV	33–39	7,2–7,9	4	31	człowiek, wół, świnia, szczur, mysz, kura, żaba szponiasta
III	lipokortyna III, 35- α kalcymedyna, kalfobindyna III, PAP-III	35–36	5,8–6,2	4	16	człowiek, szczur
IV	lipokortyna IV, endoneksyna I, PAP-II, PP4-X, białko II, p28, 32,5K kalelektryna, chromobindyna 4, 35- β kalcymedyna	28–36	5,4–5,8	4	12	człowiek, krowa, świnia, pies, królik, dżętwa
V	lipokortyna V, VAC - α , PAP-I, PP4, 35K kalelektryna, endoneksyna II, IBC, chromobindyna 5/7, 35 - γ kalcymedyna, kalfobindyna I, CaBP33, anchoryna CII, CaBP37	33–36	4,5–5,6	4	13	człowiek, krowa, szczur, kura
VI	lipokortyna VI, 67K kalelektryna, p68, białko III, synhibina, chromobindyna 20, 67K kalcymedyna, p70, kalfobindyna II, 73K	67–70	5,7–6,4	8	18	człowiek, krowa, mysz, kura
VII	lipokortyna VII, chromobindyna 11, syneksyna I, II	45–56	5,7–7,0	4	159–161	człowiek, mysz, śluzowiec
VIII	lipokortyna VIII, VAC - β	33–37	5,2–5,8	4	19	człowiek
IX	–	32,9	–	4	1	muszka owocowa
X	–	35,6	–	4	13	muszka owocowa
XI	CAP-50	50	–	4	196–198	człowiek, krowa, królik
XII	–	35	–	4	11	<i>Hydra vulgaris</i>
XIII	ISA	35,5	–	4	12	człowiek, pies

PAP — antykoagulacyjne białko z łożyska, PP — białko z łożyska, GIF — czynnik hamujący glikozylację, IBC — inhibitor koagulacji krwi, VAC — czynnik antykoagulacyjny z naczyń krwionośnych, CaBP — białko wiążące jony wapnia, ISA — aneksyna specyficzna dla jelita, CAP-50 — aneksyna zasocjowana z kalcykliną, M. cz. — masa cząsteczkowa, pI — punkt izoelektryczny. * liczba reszt aminokwasowych

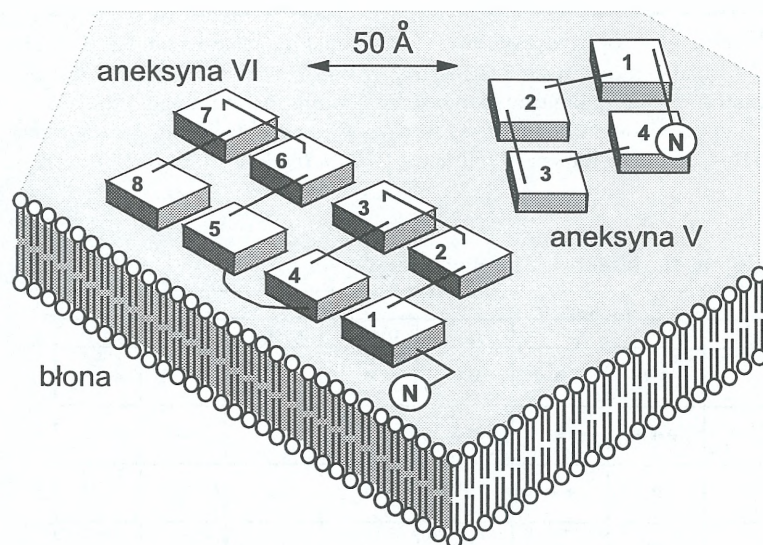
ZEL i DEDMAN 1995, BANDOROWICZ-PIKUŁA 1996, CAO HUY i współaut. 1996, KIRSCH i współaut. 1997, MOSS 1995, 1997). Aneksyny są makrocząsteczkami o właściwościach stawiających je pomiędzy białkami regulatorowymi (np. kalmodulina), które wiążą Ca^{2+} z wysokim powinowactwem i modulują aktywność białek efekto-

rowych, a buforującymi (kalretikulina, kalsekwestryna), które wiążą Ca^{2+} z niskim powinowactwem i z dużą wydajnością (NAKAYAMA i KRETSINGER 1994, CELIO i współred. 1996). Powinowactwo do Ca^{2+} zbliża aneksyny do białek buforujących, zaś różnorodność funkcjonalna do białek regulatorowych.

WŁAŚCIWOŚCI ANEKSYN I ICH ROZMIESZCZENIE W KOMÓRKACH I TKANKACH

Aneksyny charakteryzuje podobna budowa (DEMANGE i współaut. 1994, SWAIRJO i SEATON, 1994, LIEMANN i LEWIT-BENTLEY 1995, LUECKE i współaut. 1995) (rys. 1); ich cząsteczki

drofobowe białka ulegają wyeksponowaniu, co ułatwia jego oddziaływanie z błoną. Aneksyna wiąże się z polarnymi główkami fosfolipidów błony. Wiązanie to wywołuje lokalne zmiany w



Rys. 1. Domenowa budowa cząsteczek aneksyn.

Organizacja domen w cząsteczkach aneksyny V i aneksyny VI związanych z błoną. Cyframi arabskimi oznaczono domeny, w obrębie których znajdują się miejsca wiązania jonów wapnia i cząsteczek fosfolipidów. Litera N oznacza aminowy koniec cząsteczki białka.

składają się z segmentu rdzeniowego i N-końcowego o różnej długości. Segment rdzeniowy jest zbudowany z czterech lub ośmiu powtarzających się domen, składających się z 72 reszt aminokwasowych, w obrębie których znajdują się sekwencje zawierające 17 reszt aminokwasowych (annexin fold) — miejsca wiązania fosfolipidów i Ca^{2+} . Segment C-końcowy białka jest krótki, natomiast N-końcowy ma różną długość i zróżnicowaną sekwencję, jest wrażliwy na proteolizę i zawiera reszty aminokwasowe ulegające fosforylacji (tab. 2). Wydaje się, że jest on odpowiedzialny za specyficzne funkcje aneksyn w komórce i odgrywa rolę regulatorową (RAYNAL i POLLARD 1994, CELIO i współred. 1996, MOSS 1997). Wiązanie aneksyn z błonami wymaga mikromolowych stężeń Ca^{2+} . Powstanie kompleksu aneksyna-jony wapnia-cząsteczki fosfolipidów zależy od współdziałania wszystkich składników (BANDOROWICZ-PIKUŁA 1995, SWAIRJO i współaut. 1995). Po związaniu Ca^{2+} w cząsteczce aneksyny dochodzi do zmian konformacyjnych, w wyniku których zamaskowane powierzchnie hy-

upakowaniu łańcuchów acylowych fosfolipidów w zewnętrznym listku dwuwarstwy, dzięki którym aneksyna zagłębia się w hydrofobowy rejon błony (LUECKE i współaut. 1995, SWAIRJO i współaut. 1995, GERKE i MOSS 1997).

W odróżnieniu od białek regulatorowych powinowactwo aneksyn do Ca^{2+} jest stosunkowo niskie ($K_d 10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$), z wyjątkiem aneksyny VI ($K_d 10^6 \text{ M}^{-1}$) (RAYNAL i POLLARD 1994). Powinowactwo aneksyn do Ca^{2+} wzrasta nawet tysiącrotnie w obecności fosfolipidów [RAYNAL i POLLARD 1994]. W obecności Ca^{2+} aneksyny wiążą się z anionowymi fosfolipidami ($K_d 10^9 \text{ M}^{-1}$ dla aneksyny V), przede wszystkim z cząsteczkami kwasu fosfatydowego, fosfatydyloseryny i fosfatydyloinozytolu (tab. 2). Niektóre z aneksyn wiążą się z fosfatydyloetanoliną (RAYNAL i POLLARD 1994). Wiązanie aneksyn z białkami, jak fodryna, kalspektyna, aktyna lub P120^{GAP} , także zależy od stężenia Ca^{2+} , wymaga jednak znacznie wyższych stężeń kationu niż wiązanie z fosfolipidami (RAYNAL i POLLARD 1994, DAVIS i współaut. 1996). Aneksyny odznaczają się również zdolnością do asocjacji w obecności

Tabela 2. Fosfolipidy i białka, z którymi oddziałują niektóre aneksyny

Anek-syna	Wiązane fosfolipidy	Białka, z którymi wiążą się aneksyny	Kinazy białkowe fosforylujące aneksyny
I	PA, PS, PE, PI, CL	F-aktyna, fodryna, kolagen, S100C	EGFR, InsR, PKA, pp60 ^{c-src} , pp50 ^{v-abl} , fps, PTK, PKC
II	PA, PS, PE, PI, CL	F-aktyna, fodryna, kolagen, p11, kalcyklina	pp60 ^{v-src} , InsR, fps, PKA, CamK, PKC
III	PA, PS, PI, PE	?	PKC
IV	PA, PI, PE, PS	F-aktyna, kolagen, Ca ²⁺ -ATPaza	PKC
V	PA, PI, PE, PS	kolagen, prolaktyna	EGFR, InsR, pp60 ^{c-src} , PKC
VI	PA, PS, PI, CL, PE	F-aktyna, kalcyklina, RyR1, kalspektyna, kolagen, kaldesmon, P120 ^{GAP}	EGFR, PKC
VII, VIII		PS, PI	?
XI	PS, PE, PI, PA	kalcyklina	?

PA — kwas fosfatydowy, PE — fosfatydyloetanolamina, PI — fosfatydyloseryna, RyR1 — fosfatydyloinozytol, PS — receptor rianodynowy z mięśni szkieletowych, P120^{GAP} — białko aktywujące Ras GTPazę, EGFR — białkowa kinaza tyrozynowa receptora nabłonkowego czynnika wzrostu, InsR — białkowa kinaza tyrozynowa receptora insulinowego, PKA — białkowa kinaza zależna od cAMP, pp60^{c-src}, pp60^{v-src}, pp50^{v-abl} — białkowe kinazy tyrozynowe kodowane przez genom retro-wirusów, fps — białkowa kinaza tyrozynowa, PTK — białkowa kinaza treoninowa, PKC — białkowa kinaza C, CamK — białkowa kinaza zależna od kalmoduliny.

Tabela 3. Występowanie aneksyn w komórkach, tkankach i organach ssaków

Tkanka	Aneksyna									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	XI	XIII
Mózg ¹	•	•		••	•	••	•			
Mózdzek ¹	•	•		•••	•	••			•	
Soczewka oka ²	•	•		•	••					
Gruzoł mleczny ⁵		••		•	•	••				
Mięsień sercowy ^{1, 3}	•			•	••	••	•		••	
Mięsień szkieletowy ⁴	•				•	••	•		•	
Mięsień gładki ⁴	•		•	•	•	•				
Aorta ²		•			•	•			••	
Nerki ⁵	••		•	•	••	•		•		
Nadnercza ²	•	•		••	•	•	••		••	
Fibroblasty ⁵	••	••		•••		•••	•			
Limfocyty ⁵		••		•		•••				
Płuca ²	•••	•••	•	•	•	•	•	•	••	
Wątroba ¹		•		••		•••				
Śledziona ⁵	••	••		••	••	••			•	
Jelito ¹	•	•••		•••	•	•			•	•••
Łożysko ⁵	••	•	••	•	•••	•		••	•	

Rozmieszczenie tkankowe aneksyn w organizmach: ¹świni, ²krowy, ³szczura, ⁴królika i ⁵człowieka.

Ca^{2+} (KAETZEL i DEDMAN 1995). Badania krystalograficzne wykazały, że aneksyny mogą tworzyć regularną siatkę na powierzchni dwuwarstwy lipidowej. *In vivo* takie oddziaływania aneksyn z błoną mogłyby zmieniać na przykład płynność błon (KAETZEL i DEDMAN 1995).

W występowaniu aneksyn w organizmie jest obserwowana specyficzność tkankowa (tab. 3). Komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy zawierają duże ilości aneksyn IV i VII, natomiast w komórkach wątroby występują głównie aneksyny IV i VI, a w komórkach śródbłonkowych jelita aneksyny II i IV. Bogatym źródłem aneksyn I i V jest łożysko, a I i II

— płuca. W fibroblastach i w limfocytach występuje przede wszystkim aneksyna VI. Wewnątrz komórek aneksyny są odnajdywane w formie związanej z błonami organelli, które biorą udział w magazynowaniu jonów wapnia — retikulum endoplazmatycznego (ER), mitochondriów i kalciosomów. Aneksyny występują również na cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej, mogą być zasocjowane z cytoszkieletem oraz z błoną endosomów, pęcherzyków synaptycznych i granul wydzielniczych (RAYNAL i POLLARD 1994, BANDOROWICZ-PIKUŁA 1996, CELIO i współred. 1996, GERKE i MOSS 1997).

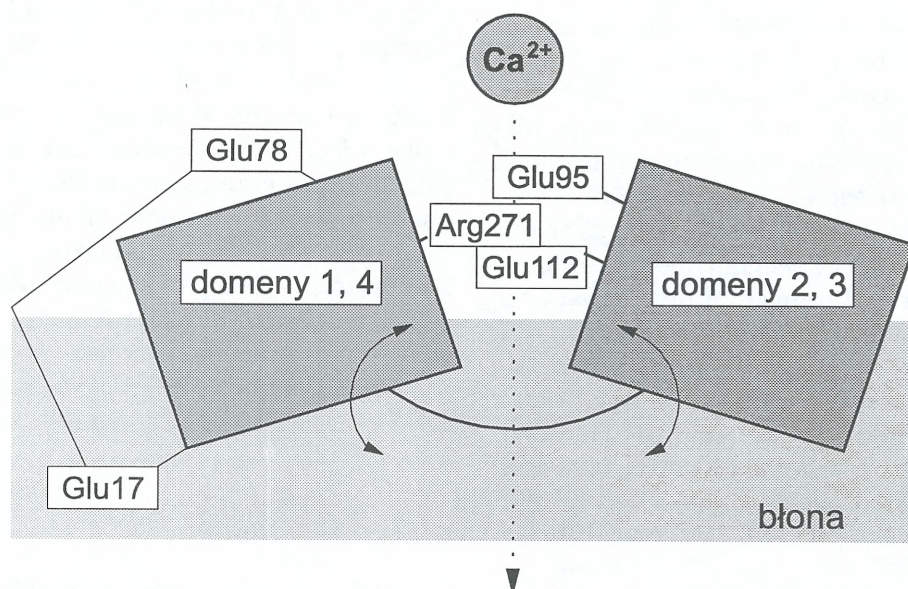
UDZIAŁ ANEKSYN W HOMEOSTAZIE WAPNIA

Kontrola stężenia Ca^{2+} w cytosolu jest ważna dla przeżycia komórki i regulacji jej podstawowych funkcji. W homeostazie wapnia biorą udział różne grupy białek transportujących i wiążących kationy, które wzajemnie wpływają na siebie. W komórkach niebudliwych (erytrocyty hepatocyty, komórki nabłonkowe) są obecne między innymi białka transportujące Ca^{2+} zależne od inozytolotrisfosforanu. W komórkach pobudliwych (neurony, komórki mięśniowe) występują dodatkowo zależne od potencjału błonowego kanały wapniowe. Jony wapnia napływające przez te kanały mogą bezpośrednio aktywować kanały uwalniające Ca^{2+} z błon retikulum sarkoplazmatycznego (SR) (GUNTER i GUNTER 1994, POZZAN i współaut. 1994, CARAFOLI i współaut. 1996). Pewne obserwacje wskazują, że aneksyny mogą brać udział w regulacji homeostazy Ca^{2+} w komórce. Obserwacje te zostaną omówione w dalszej części artykułu.

ANEKSYNY TWORZĄ KANAŁY WAPNIOWE ZALEŻNE OD POTENCJAŁU BŁONOWEGO

Analiza kryształów aneksyny V (BERENDES i współaut. 1993, CONCHA i współaut. 1993) pozwoliła na stwierdzenie, że aneksyna ta ma prawie w całości strukturę α -helikalną. Każda z czterech domen białka jest zbudowana z pięciu α -heliksów zwiniętych w jeden superheliks. Domeny pierwsza z drugą oraz trzecia z czwartą są połączone krótkimi odcinkami łańcucha peptydowego. Pomiędzy drugą a trzecią domeną występuje dłuższy segment łączący. Druga i trzecia oraz pierwsza i czwarta domena tworzą symetryczne moduły (rys. 2). Pomiędzy nimi, w centrum cząsteczki aneksyny, znajduje się hydrofilowa pora, która mogłaby pełnić rolę kanału transportującego kationy. Cząstecz-

ka aneksyny V jest płaska, o lekko zakrzywionym kształcie i dwóch powierzchniach, wklęsłej i wypukłej. Na powierzchni wypukłej zlokalizowano pięć miejsc wiążących Ca^{2+} , a na powierzchni wklęsłej N-końcowy segment białka (BERENDES i współaut. 1993, CONCHA i współaut. 1993, DEMANGE i współaut. 1994). Aneksyna V jest prawdopodobnie kanałem wapniowym zależnym od potencjału błonowego. Zidentyfikowano w jej cząsteczce, z zastosowaniem metody mutacji punktowych, reszty aminokwasowe, które są istotne dla funkcji białka tworzącego kanał (rys. 2). Reszta kwasu glutaminowego 95 stanowi składnik hydrofilowej pory i filtr selektywności w stosunku do jonów. Reszta kwasu glutaminowego 112 jest czujnikiem potencjału, a więc odpowiada za mechanizm otwierania i zamykania kanału. Reszty kwasu glutaminowego 17 i 78, kontrolując kąt nachylenia poszczególnych domen w stosunku do siebie, regulują przepływ kationów przez hydrofilową porę w cząsteczce aneksyny. W miarę posuwania się w głąb tej pory wzrasta liczba ładunków ujemnych, co świadczy, że mogłaby brać udział w translokacji Ca^{2+} . Aneksyna V, wiążąc się z błoną, nie penetruje w pełni dwuwarstwy lipidowej. Nie ulega też zmianie kształt cząsteczki ani organizacja domen. Rodzi się zatem pytanie, w jaki sposób aneksyna może tworzyć kanał wapniowy w błonie? Aneksyna V po związaniu Ca^{2+} wytwarza silne pole elektrostatyczne, stąd przypuszcza się, że cząsteczka białka mogłaby działać jak miniatury elektroporator. Zmiana przepuszczalności błony dla Ca^{2+} byłaby zatem wynikiem właściwości elektroporacyjnych aneksyny oraz oddziaływań pomiędzy miejscami wiążącymi Ca^{2+} w cząsteczce białka a polarnymi główkami fosfolipidów (BERENDES i współ-



Rys. 2. Aneksyna V jako kanał wapniowy zależny od potencjału błonowego.

Glu — reszty kwasu glutaminowego, Arg — reszta argininy.

aut. 1993, CONCHA i współaut. 1993, DEMANGE i współaut. 1994, MOSS 1995, SWAIRJO i współaut. 1995, BANDOROWICZ-PIKUŁA 1995, 1996).

ANEKSYNY REGULUJĄ UWALNIANIE JONÓW WAPNIA Z MAGAZYNÓW WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

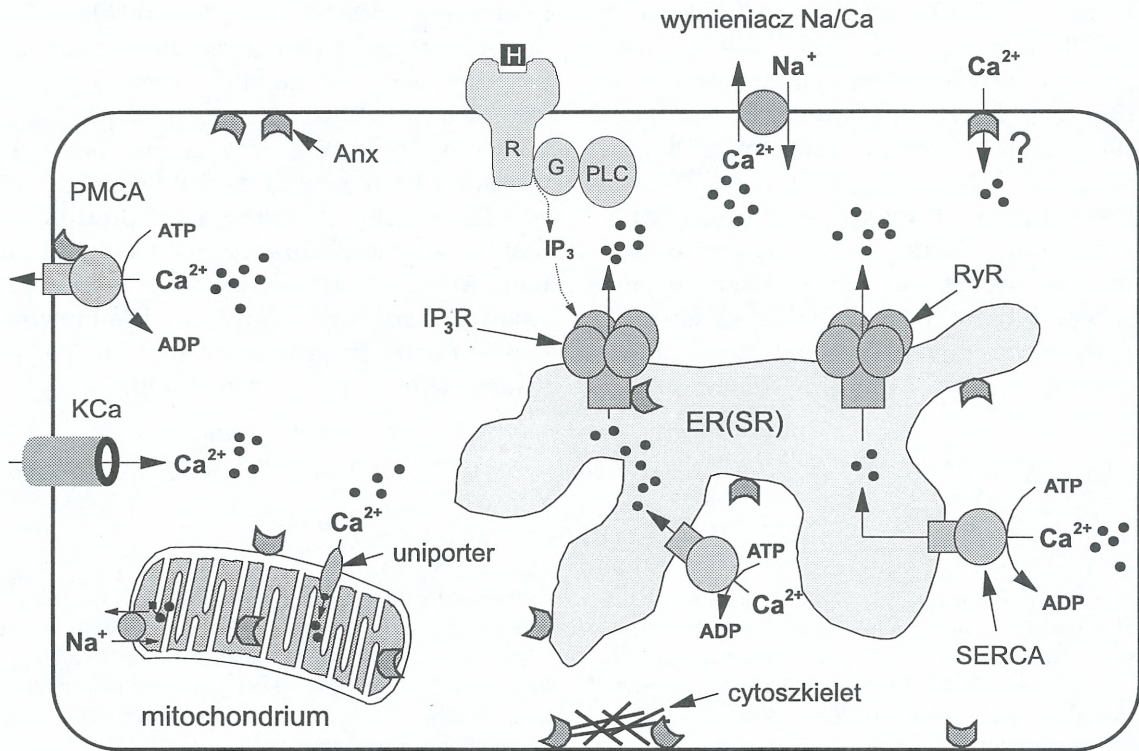
Zdolność do tworzenia przez aneksynę V *in vitro* kanałów wapniowych jest tylko jedną z możliwości wpływania przez aneksyny na homeostazę Ca^{2+} w komórce. Dodatkowo zaobserwowano, że aneksyna VI modyfikuje aktywność kanałów uwalniających Ca^{2+} z błon SR (rys. 3) (DÍAZ-MUÑOZ i współaut. 1990, POZZAN i współaut. 1994). Aby wyjaśnić mechanizm uwalniania jonów wapnia z błon SR postulowano, że proces ten jest chemicznie indukowany przez takie czynniki, jak alkalizacja cytoplazmy, utlenienie grup -SH lub wzrost stężenia inozytolotrisfosforanu. Sądzone także, że istnieje bezpośredni związek pomiędzy czujnikiem potencjału w błonie kanalików T a kanałem uwalniającym Ca^{2+} z błon SR. Po rekonstytucji fragmentów błon SR do liposomów aneksyna VI w stężeniach nanomolowych wywoływała trzykrotny wzrost prawdopodobieństwa otwarcia kanału i osiemdziesięciokrotny wzrost czasu otwarcia kanału. Zmiany wywoływane przez aneksynę były wrażliwe na dodatek rianodyny, alkaloidu wiążącego się z białkiem tworzącym kanał (DÍAZ-MUNOZ i współaut. 1990).

Aneksynę VI zlokalizowano również we wnętrzu mitochondriów, zasocjowaną z błonami grzebieni mitochondrialnych. W związku ze

zdolnością aneksyn do tworzenia kanałów zależnych od potencjału błonowego, wysunięto przypuszczenie, że białka te mogłyby pełnić rolę kanałów wapniowych w tych organellach (BANDOROWICZ-PIKUŁA 1996). W stanach patologicznych, w których stężenie Ca^{2+} w cytosolu wzrasta powyżej wartości fizjologicznych, mitochondria stanowią dodatkowy magazyn do przechowywania nadmiaru tego kationu i dodatkowe źródło Ca^{2+} , dzięki któremu ulegają aktywacji inne systemy transportu w komórce. W warunkach fizjologicznych mitochondria nie pełnią ważnej roli w regulacji gospodarki wapniowej w komórce, lecz zmiany stężenia Ca^{2+} w matriksie regulują ich metabolizm. Jony wapnia dostają się do mitochondriów w wyniku działania uniportera, który jest odpowiedzialny za elektrogenny napływ Ca^{2+} . Stwierdzono, że niektóre dehydrogenazy mitochondrialne, białka biorące udział w transporcie elektronów, ATPaza F_0F_1 i translokaza nukleotydów, są wrażliwe na zmiany stężenia Ca^{2+} (GUNTER i GUNTER 1994, BANDOROWICZ-PIKUŁA i PIKUŁA 1997).

ANEKSYNA IV STYMULUJE AKTYWNOŚCI Ca^{2+} -ATPazy Z BŁONY PLAZMATYCZNEJ

Zaobserwowano inną możliwość regulacji homeostazy Ca^{2+} w komórce przez aneksyny, a mianowicie, że aneksyna IV stymuluje aktywność ATPazy transportującej Ca^{2+} z błony erytrocytów (dane nie opublikowane). ATPaza ta należy do ATPaz typu P i jest jedynym białkiem transportującym w błonach plazma-



Rys. 3. Udział aneksyn w homeostazie Ca^{2+} w komórce.

Anx — aneksyna, ER(SR) — retikulum endo(sarko)plazmatyczne, G — białko G, H — hormon, IP_3 — inozytolotrisfosforan, IP_3R — receptor IP_3 , KCa — kanał transportujący Ca^{2+} , PLC — fosfolipaza C; PMCA — Ca^{2+} -ATPaza z błony komórkowej, R — receptor, RyR — receptor rianodynowy, SERCA — Ca^{2+} -ATPaza z błon ER/SR.

tycznych o wysokim powinowactwie do jonów wapnia i biorącym udział w ich usuwaniu z cytoplazmy. Enzym jest zbudowany z dziesięciu transmembranowych heliksów (część z nich tworzy kanał wapniowy w błonie), domeny hydrofilowej zawierającej centrum aktywne enzymu oraz domeny regulatorowej. W domenie regulatorowej znajduje się miejsce wiązania kalmoduliny oraz miejsce fosforylacji przez kinazę białkową C. Kalmodulina jest fizjologicznym aktywatorem ATPazy. W wyniku związania z enzymem podwyższa jego powinowactwo w stosunku do Ca^{2+} (CARAFOLI i

współaut. 1996). W podobny sposób działa aneksyna IV, ale w stukrotnie wyższych stężeniach niż kalmodulina. Wpływ aneksyny na aktywność ATPazy można tłumaczyć albo bezpośrednim oddziaływaniem obu białek, analogicznie do sposobu, w jaki ATPaza oddziałuje z kalmoduliną lub, że aneksyna zmienia lokalnie strukturę błony, powodując agregację cząsteczek fosfatydyloseryny, co wywołuje aktywację enzymu; Ca^{2+} -ATPaza jest bowiem stymulowana również przez anionowe fosfolipidy (PIKUŁA i współprac. dane nieopublikowane).

UWAGI KOŃCOWE

Niektóre izoformy aneksyn pozostają związane z błonami, nawet jeśli stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie spadnie do poziomu spoczynkowego, co świadczy, że nie tylko wiązanie kationów, ale także innych ligandów prowadzi do zmiany charakteru oddziaływań aneksyn z błoną. Takimi ligandami mogłyby być nukleotydy. Na korzyść tej hipotezy przemawiają następujące obserwacje. ATP w stężeniach milimolowych moduluje wiązanie aneksyny VI z błonami i F-aktyną (BANDOROWICZ-PIKUŁA i AWASTHI 1997, BANDOROWICZ-PIKUŁA i PIKUŁA

1997). ATP i cAMP wiążą się *in vitro* z aneksyną I, co wpływa na zdolność tego białka do agregacji liposomów i pęcherzyków sekrecyjnych oraz do tworzenia kanałów wapniowych (COHEN i współaut. 1995). Wykazano również, że aneksynę VI można oczyścić do homogenności, stosując chromatografię powinowactwa na ATP-agarozie (BANDOROWICZ-PIKUŁA i AWASTHI 1997). Aneksyny są zaangażowane w procesie przetwarzania sygnału wapniowego w komórce. Jakkolwiek różnią się one od białek, które są zdolne do odpowiedzi na zmiany stę-

żenia Ca^{2+} w zakresie od 0,1–1 μM , takich jak kalmodulina, kinaza białkowa C lub kalpainy. Jest bardzo prawdopodobne, że nukleotydy są właśnie tymi ligandami, które oprócz jonów wapnia regulują funkcje aneksyn w komórkach.

W związku ze zdolnością aneksyn do wpływu na funkcję białek transportujących jony wapnia oraz tworzenia w błonie kanałów jonowych, jest bardzo prawdopodobne, że biorą one udział w regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia. Za tą hipotezą przemawia

następująca obserwacja. W makrofagach podanych stresowi oksydacyjnemu dochodzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, które nie pochodzą z błon ER. Wzrost stężenia Ca^{2+} w cytosolu następuje w wyniku zahamowania aktywności Ca^{2+} -ATPazy z błony plazmatycznej przez produkty utleniania cząsteczek lipidów oraz dzięki aneksynom, które na skutek obniżenia stężenia ATP i zmiany struktury błony, oddysocjują od dwuwarstwy, uwalniając duże ilości jonów wapnia (HOYAL i współaut. 1996).

DO ANNEXINS PLAY A REGULATORY ROLE IN CELLULAR CALCIUM HOMEOSTASIS?

S u m m a r y

Annexins comprise a family of multifunctional, Ca^{2+} — and phospholipid-binding proteins which are able to interact in a calcium-dependent manner with biological membranes. It is postulated that such an interaction may be of particular importance in modulation of membrane permeability to calcium ions and that annexins may participate in regulation of cellular calcium homeostasis. The latter is

confirmed by the intracellular localization of annexins, since these proteins were found to be associated with membranes of calcium-sequestering organelles. In addition, annexins were found to form voltage-gated channels in artificial membranes and to modulate *in vitro* the functioning of calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum membranes and activities of other Ca^{2+} -transport proteins.

LITERATURA

- BANDOROWICZ-PIKUŁA J., 1995. *Domeny w błonach i ich biologiczna funkcja*. Post. Biochem. 41, 247–257.
- BANDOROWICZ-PIKUŁA J., 1996. *Rola aneksyn, białek wiążących Ca^{2+} i fosfolipidów w komórce — od fuzji błon biologicznych do przekazywania informacji*. Post. Biol. Kom. 23, 151–167.
- BANDOROWICZ-PIKUŁA J., AWASTHI Y. C., 1997. *Interaction of annexins IV and VI with ATP. An alternative mechanism by which a cellular function of these calcium- and membrane-binding proteins is regulated*. FEBS Lett. 409, 300–306.
- BANDOROWICZ J., PIKUŁA S., 1993. *Annexins - multifunctional, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins*. Acta Biochim. Polon. 40, 281–293.
- BANDOROWICZ-PIKUŁA J., PIKUŁA S., 1997. *Wewnątrzkomórkowe białka wiążące ATP*. Post. Biochem. 43, 111–119.
- BERENDES R., VOGES D., DEMANGE P., HUBER R., BURGER A., 1993. *Structure-function analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V*. Science 262, 427–430.
- CAOHUY H., SRIVASTAVA M., POLLARD H. B., 1996. *Membrane fusion protein synexin (annexin VII) as a Ca^{2+} /GTP sensor in exocytotic secretion*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10797–10802.
- CARAFOLI E., GARCIA-MARTIN E., GUERINI D., 1996. *The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives*. Experientia 52, 1091–1100.
- CELIO, M. R., PAULS, T., SCHWALLER, B., (red), 1996. *Guide to the calcium-binding proteins*. A Sambrook and To-
oze Publication at Oxford University Press, Oxford.
- COHEN B. E., LEE G., ARISPE N., POLLARD H. B., 1995. *Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate binds to annexin I and regulates calcium-dependent membrane aggregation and ion channel activity*. FEBS Lett. 377, 444–450.
- CONCHA N. O., HEAD J. F., KAETZEL M. A., DEDMAN J. R., SEATON B. A., 1993. *Rat annexin V crystal structure: Ca^{2+} -induced conformational changes*. Science 261, 1321–1324.
- DAVIS A. J., BUTT J. T., WALKER J. H., MOSS S. E., GAWLER D. J., 1996. *The Ca^{2+} -dependent lipid binding domain of p120GAP mediates protein-protein interactions with Ca^{2+} -dependent membrane-binding proteins. Evidence for a direct interaction between annexin VI and p120GAP*. J. Biol. Chem. 271, 24333–24336.
- DEMANGE P., VOGES D., BENZ J., LIEMANN S., GOTTIG P., BERENDES R., BURGER A., HUBER R., 1994. *Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage regulation?* Trends Biochem. Sci. 19, 272–276.
- DIAZ-MUÑOZ M., HAMILTON S. L., KAETZEL M. A., HAZARIKA P., DEDMAN J. R., 1990. *Modulation of Ca^{2+} -release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedin)*. J. Biol. Chem. 265, 15894–15899.
- FLOWER R. J., ROTHWELL N. J., 1994. *Lipocortin 1: cellular mechanisms and clinical relevance*. Trends Pharmacol. Sci. 15, 71–73.
- GERKE V., MOSS S. E., 1997. *Annexins and membrane dynamics*. Biochim. Biophys. Acta 1357, 129–154.
- GUNTER K. K., GUNTER T. E., 1994. *Transport of calcium by mitochondria*. J. Bioenerg. Biomembr. 26, 471–485.
- HOYAL C. R., THOMAS A. P., FORMAN H. J., 1996. *Hydroperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*. J. Biol. Chem. 271, 29205–29210.
- KAETZEL M. A., DEDMAN J. R., 1995. *Annexins: novel Ca^{2+} -*

- dependent regulators of membrane function.* News Physiol. Sci. 10, 171–176.
- KIRSCH T., NAH H. D., DEMUTH D. R., HARRISON G., GOLUB E. E., ADAMS S. L., PACIFICI M., 1997. *Annexin V - mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization.* Biochemistry 36, 3359–3367.
- LIEMANN S., LEWIT-BENTLEY A., 1995. *Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function.* Structure 3, 233–238.
- LUECKE H., CHANG B. T., HAILLIARD W. S., SCHLAEPFER D. D., HAIGLER H. T., 1995. *Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion.* Nature (London) 378, 512–515.
- MOSS S. E., 1995. *Ion channels. Annexin taken to task.* Nature (London) 378, 446–447.
- MOSS S. E., 1997. *Annexins.* Trends Cell Biol. 7, 87–89.
- NAKAYAMA S., KRETSINGER R. H., 1994. *Evolution of the EF-hand family of proteins.* Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23, 473–507.
- POZZAN T., RIZZUTO R., VOLPE P., MELDOLESI J., 1994. *Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores.* Physiol. Rev. 74, 595–636.
- RAYNAL P. R., POLLARD H. B., 1994. *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins.* Biochim. Biophys. Acta 1197, 63–93.
- SWAIRJO M. A., CONCHA N. O., KAETZEL M. A., DEDMAN J. R., SEATON B. A., 1995. *Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V.* Nature-Struct. Biol. 11, 968–974.
- SWAIRJO M. A., SEATON B. A., 1994. *Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective.* Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23, 193–213.