

BEATA HANUS-LORENZ, ANITA HRYNIEWICZ, MICHAŁ LORENZ i
ALEKSANDER F. SIKORSKI

*Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski
Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław
e-mail: afabc@ibmb.uni.woc.pl*

SPEKTRYNY — RÓŻNORODNOŚĆ FORM I FUNKCJI POWSZECHNIE WYSTĘPUJĄCYCH BIAŁEK CYTOSZKIELETOWYCH

Spektrynę, zidentyfikowaną po raz pierwszy jako białko błon plazmatycznych erytrocytów, ostatnio postrzega się jako białko biorące udział w wielu procesach istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki¹. Powszechne występowanie w komórkach w zasadzie wszystkich tkanek kręgowców i bezkręgowców sugeruje, że jest ona głównym składnikiem cytoszkieletu podbłonowego². Białko to oddziałuje z hydrofobowym zrębem błon i stanowi cytozolowy czynnik uczestniczący w budowie systemu filamentów, który w komórce odpowiada m. in. za kształt i zdolność jego zachowywania po odkształceniach, elastyczność oraz za rozmieszczenie receptorów na powierzchni komórek. Ze względu na występowanie w postaci wielu izoform, spektrynom przypisuje się udział w wielu

różnorodnych procesach. Odgrywają one istotną rolę m. in. w stabilizacji dwuwarstwy lipidowej błon plazmatycznych, organizacji domen białek integralnych, kontroli ruchliwości receptorów błonowych, adhezji komórek, przekazywaniu impulsów nerwowych, tworzeniu pęcherzyków wydzielniczych i ich transporcie pomiędzy organellami, a także w rozwoju i morfogenezie komórek zarodkowych. Ostatnie lata przyniosły wiele odkryć w biologii molekularnej spektryny, szczególnie ich nowych izoform. Zastosowanie techniki systemu dwuhybrydowego w komórkach drożdży oraz obserwacje zwierząt ze zmutowanymi genami tych białek (mutacje spontaniczne i organizmy transgeniczne) przybliżyło poznanie roli spektryny w komórkach.

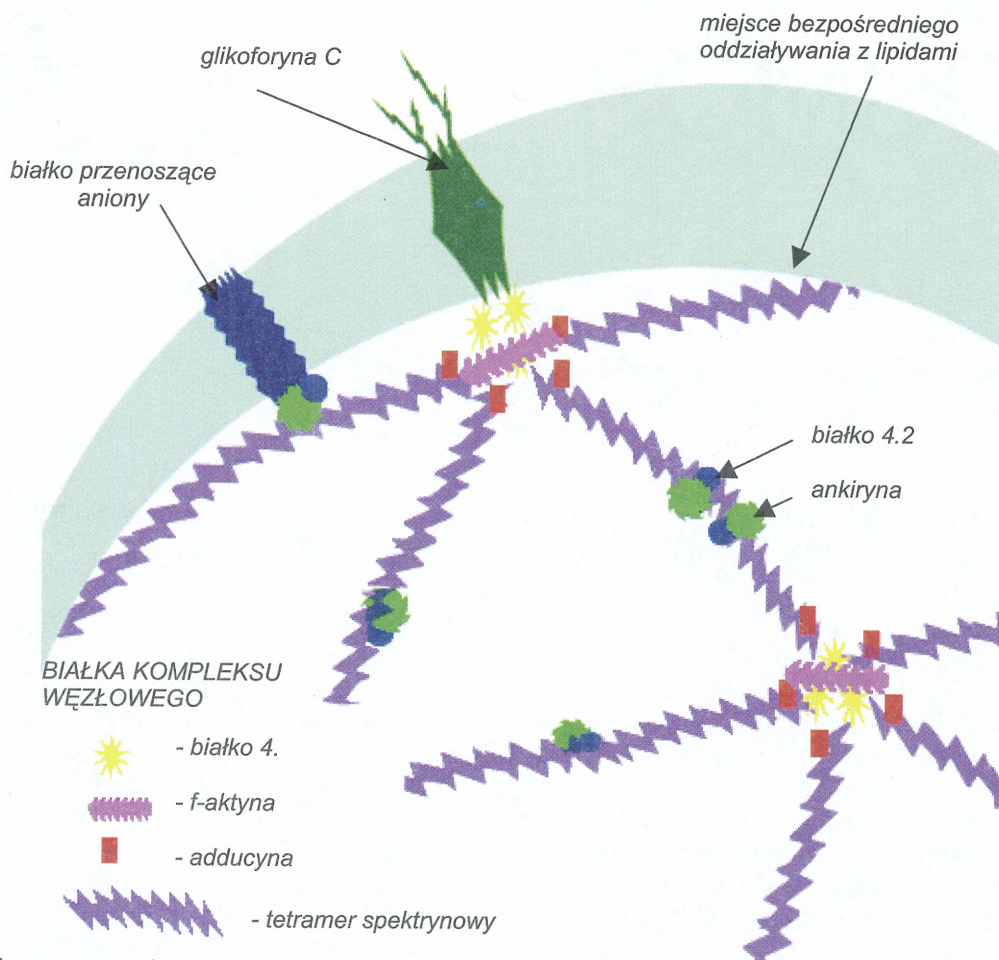
CYTOSZKIELET PODBŁONOWY

Cytoszkielet podbłonowy jest dwuwymiarową strukturą oddziałujących ze sobą białek peryferyjnych, zlokalizowaną po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej (BENNET i GILLIGAN 1993). Jego dominującym składnikiem jest spektryna, która dzięki zdolności wiązania filamentów aktynowych tworzy połączenia z cytoszkieletem, a poprzez oddziaływania z białkami integralnymi błony i bezpośrednio oddziaływania z fosfolipidami wiąże białka cytoszkieletu ze zrębem hydrofobowym błony komórkowej (Ryc. 1). Na obserwowanych w mikroskopie elektronowym preparatach sieci cytoszkieletu podbłonowego widoczne są heksagonalne układy filamentów, których boki tworzą cząsteczki

tetramerycznej spektryny. Ich końce zbiegają się w kompleksach węzłowych, których osią są pojedyncze protofilamenty zbudowane z 12-13 monomerów aktyny. Kompleksy węzłowe zawierają także białko 4.1, adducynę, tropomiozynę, tropomodulinę oraz białko 4.9 (GILLIGAN i BENNETT 1993). Adducyna aktywuje powstawanie oddziaływań między tetramerami spektrynowymi i aktyną. W połączeniach tych stabilizującą rolę odgrywają tropomiozyna i tropomodulina. Rola białka 4.9 w erytrocytach nie została w pełni wyjaśniona; *in vitro* wykazuje ono zdolność tworzenia wiązek aktynowych. Białko 4.1 oddziałuje z aminowym końcem podjednostki beta spektryny i z białkiem integralnym błony

¹Homologi spektryny występujące w komórkach nieerytrocytarnych bywają również nazywane fodryną.

²Struktura ta jest także nazywana szkieletem błony (ang. membrane skeleton).



Ryc. 1. Schemat cytoszkieletu podbłonowego erythrocytu.

Dzięki swoistym oddziaływaniom, zachodzącymi pomiędzy białkami błonowymi charakteryzującymi się wysokim powinowactwem, powstaje dynamiczna sieć zwana cytoszkieletem podbłonowym. Najlepiej poznano cytoszkielet błony erythrocytu.

— glikoforyną C — tworząc kompleks o umiarkowanym powinowactwie, natomiast obserwowana stała dysocjacji jest znacznie niższa, gdy w tworzeniu kompleksu uczestniczy tzw. białko p55 (HEMMING i współaut. 1995). Dzięki tym oddziaływaniom, białka kompleksów węzłowych zakotwiczą cytoszkielet podbłonowy w błonę plazmatyczną. Białko 4.1 aktywuje wiązanie spektryny i aktyny, a jego aktywność reguluje fosforylacja przez kinazę białkową C lub kinazę zależną od cAMP. Głównym miejscem oddziaływania cytoszkieletu z hydrofobowym zrębem błony jest miejsce wiązania tetramerów spektrynowych z białkiem przenoszącym aniony (BPA, białko 3) za pośrednictwem ankiryny. Kompleks spektryna-ankiryna-białko przenoszące aniony jest stabilizowany przy udziale białka 4.2 (KORSGRÉN i COHEN 1988). Struktura cytoszkieletu podbłonowego komórek nieerythrocytarnych odpowiada, jak się wydaje, schematowi przedstawionemu dla błon erythrocytów (DEVARAJAN i MORROW 1996). W komórkach innych niż erythrocyty, błonowym receptorem ankiryny jest m. in. Na^+/K^+ -ATPa-

za, która oddziałuje z domeną aminowego końca tego białka (STEINER i BENNETT 1988), a także białka pełniące rolę kanałów sodowych, Ca^{2+} -ATPaza, receptor acetylocholino i wiele innych białek błonowych (DEMATTEIS i MORROW 2000). Możliwe jest także bezpośrednie wiązanie struktury szkieletu błonowego z błoną plazmatyczną poprzez interakcję spektryny erythrocytarnej i nieerythrocytarnej z fosfolipidami błony (SIKORSKI 1988, ISENBERG 1991). Oddziaływanie to jest zależne od ankiryny, której obecność częściowo hamuje wiązanie spektryny z błonami fosfolipidowymi w badaniach *in vitro* (BIAŁKOWSKA i współaut. 1994). Świadczy to o współzawodnictwie lipidów i ankiryny o miejsce wiązania w cząsteczce spektryny. Należy dodać, że oprócz wspomnianych powyżej miejsc oddziaływania spektryny z dwuwarstwą lipidową, obserwuje się bezpośrednie interakcje z lipidami, które są niezależne od ankiryny (BIAŁKOWSKA 1995, SIKORSKI i współaut. 2000b).

Obecność izoform białek cytoszkieletu (białko 4.1, ankiryny i spektryny) w lizosomach i aparacie Golgiego zapewnia podtrzymywanie

struktur tych organelli, reguluje funkcje wielu białek transbłonowych, szczególnie kanałów jonowych, i aktywność enzymów związanych z błonami (GASCARD i MOHANDAS 2000).

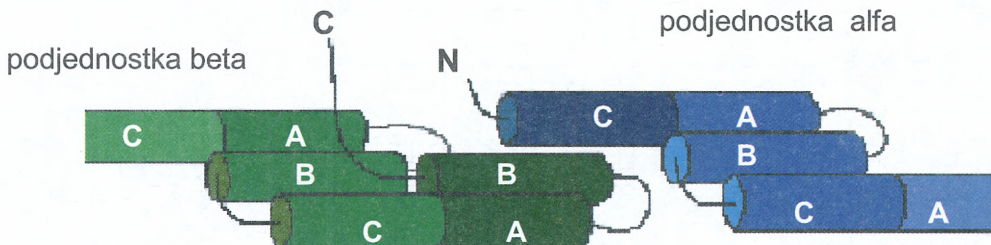
Zmiany w strukturze pierwszorzędowej, których przyczyną są mutacje genetyczne, powodują uszkodzenia lub nieobecność białek szkieletu błonowego, co upośledza oddziaływanie cytoszkieletu z lipidową dwuwarstwą błony

plazmatycznej. Zaburzenia te mogą powodować deformacje kształtu, niezdolność do odkształceń, utratę elastyczności oraz zmniejszenie powierzchni komórek. Poznane dotychczas zmiany mutacyjne białek cytoszkieletu błony dotyczą białek błon erytrocytów i są przyczyną dziedzicznych anemii hemolitycznych (DELAUNAY 1995; patrz art. B. HANUS-LORENZ i współaut. w tym numerze KOSMOSU).

STRUKTURA CZĄSTECZKI SPEKTRYNY

Spektryna wyekstrahowana z erytrocytów w temperaturze 37°C jest heterodimerem złożonym z połączonych niekowalencyjnie podjednostek alfa i beta, kodowanych przez odrębne geny. Łańcuchy obu podjednostek są ułożone przeciwrównolegle względem siebie i nawinięte wokół wspólnej osi (BYERS i BRANTON 1985). Tetramer spektrynowy o długości ok. 200 nm, powstający w wyniku asocjacji dimer-dimer typu „głowa-głowa”, jest funkcjonalną jednostką spektryny. Za takie ułożenie odpowiedzialne jest miejsce położone na aminowym końcu podjednostki alfa i domena końca karboksylowego w podjednostce beta (DESILVA i współaut. 1992, SPEICHER i współaut. 1992) (Ryc. 2). Spektryna

technikami dichroizmu kołowego, które określiły udział helisy α na 60–70% (patrz: HARTWIG 1994). Badania krystalograficzne 14 segmentu podjednostki alfa spektryny *Drosophila melanogaster* (YAN i współaut. 1993) i badania spektroskopii NMR spektryny II kury (PASCUAL i współaut. 1997a, b) wykazały, że strukturę przestrzenną segmentu kształtują trzy odcinki α -helikalne. Odcinki A i B są położone przeciwrównolegle względem siebie pod kątem 20° i w odległości 1,23 nm. Położony w przestrzeni pomiędzy nimi odcinek C oddalony jest od nich o 1,1 nm. Odcinek C jest w zasadzie równoległy względem odcinka A, tworząc z nim kąt 15°; za oddziaływanie pomiędzy tymi odcinkami odpo-



Ryc. 2. Połączenia podjednostek w tetramerze i struktura trzyczłonowa segmentu w spektrynie.

Strukturę powtarzającego się segmentu spektrynowego tworzą trzy odcinki α -helikalne, A, B i C, ułożone przeciwrównolegle względem siebie. Dwa dimery złożone z podjednostek alfa i beta oddziałują „głowa-głowa”, tworząc tetramer. Rycina przedstawia połączenie podjednostki alfa jednego z dimerów z podjednostką beta drugiego z dimerów.

nieerytrocytarna nie dysocjuje do dimerów. Formy oligomeryczne wyższego rzędu, niż tetramery, można zaobserwować przy wysokim stężeniu spektryny w warunkach *in vitro* (MORROW i współaut. 1981, SHAHBAKHTI i GRATZER 1986).

Wydłużony kształt cząsteczki spektryny (długość 200–260 nm i średnica 3–6 nm) jest zdeterminowany poprzez występowanie powtarzających się segmentów (SPEICHER i MARCHESI 1984). Model zakładający istnienie krótkich odcinków α -helikalnych przedzielonych odcinkami niehelikalnymi potwierdzono w badaniach

wiedzialne są części końców aminowych obu helis, natomiast odcinek B jest ułożony pod kątem 10° względem odcinka A — za to oddziaływanie odpowiada część jego końca karboksylowego. Połączenie pomiędzy sąsiadującymi segmentami zapewniają odcinki helisy C jednego segmentu i helisy A następnego. Za stabilizację odpowiadają oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy helisami oraz oddziaływania hydrofobowe pomiędzy resztami aminokwasów skierowanych do wnętrza przestrzeni międzyhelikalnych (GRUM i współaut. 1999).

SPEKTRYNY CZŁOWIEKA, INNYCH ZWIERZĄT ORAZ PIERWOTNIAKÓW

Dotychczas poznano sekwencje nukleotydowe dwóch genów kodujących podjednostki alfa spektryny człowieka: αI (erytrocytarna) i αII (nieerytrocytarna) oraz pięciu genów kodujących podjednostki beta: βI , βII , βIII , βIV i βV (Tabela 1). Funkcjonalna spektryna erytrocytów ludzkich zbudowana jest z dwóch nieidentycznych, ale homologicznych względem siebie podjednostek: α i β . Jest to jedyna forma ulegająca ekspresji w tych komórkach. Ponieważ była to pierwsza znana spektryna, jej podjednostki zwykło się oznaczać αI i βI lub, bardziej szczegółowo, $\alpha I\Sigma 1$ i $\beta I\Sigma 1$ (WINKELMANN i FORGET 1993), uwzględniając wariant powstający wskutek alternatywnego składania eksonów. Główną formą spektryny w komórkach nieerytrocytarnych jest podobny kompleks, zbudowany z podjednostek $\alpha II\Sigma^*$ i $\beta II\Sigma^*$. Forma III spektryny β jest związana ze strukturami subkomórkowymi, takimi jak błony aparatów Golgiego (STANKEWICH

i współaut. 1998). Obecność podjednostek βIV i βV wykazano w wielu komórkach innych niż erytrocytarne (BERGHS i współaut. 2000, STABACH i MORROW 2000). Jak widać, w komórkach innych niż erytrocytarne zachodzi ekspresja jednocześnie kilku form spektryny, w tym również form kodowanych przez geny, których ekspresja jest charakterystyczna dla erytrocytów. Zagadnienie to przedstawiono szczegółowo poniżej.

PODJDENOSTKI ALFA SPEKTRYNY: $\alpha I\Sigma 1$, $\alpha II\Sigma 1$

Poznano dwie główne izoformy spektryny alfa występujące w organizmie człowieka: $\alpha I\Sigma 1$ — erytrocytarna, posiadająca odpowiedniki u ssaków, *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*, oraz $\alpha II\Sigma 1$ — nieerytrocytarna, występująca we wszystkich komórkach ludzkich i pozostałych kręgowców. W komórkach

Tabela 1. Poznane dotychczas izoformy spektryny występujące w organizmie ludzkim.

Podjednostka	Nazwa i lokalizacja genu	Transkrypt	Izoforma/masa (kDa)	Typ
Spektryna α	SPTA1 Chromosom 1	transkrypt 1	$\alpha I\Sigma 1$ 280	erytrocytarna
	SPTAN1 Chromosom 9	transkrypt 1	$\alpha II\Sigma 1$ 286	nieerytrocytarna (fodryna α)
		transkrypt 2	$\alpha II\Sigma 2$	
		transkrypt 3	$\alpha II\Sigma 3$	
		transkrypt 4	$\alpha II\Sigma 4$	
Spektryna β	SPTB Chromosom 14	transkrypt 1	$\beta I\Sigma 1$ 246	erytrocytarna
		transkrypt 2	$\beta I\Sigma 2$ 270	erytrocytarna mięśniowa
	SPTBN1 Chromosom 2	transkrypt 1	$\beta II\Sigma 1$ 270	nieerytrocytarna (fodryna β)
		transkrypt 2	$\beta II\Sigma 2$	
		transkrypt 3	$\beta II\Sigma 3$	
	SPTBN2 Chromosom 11	transkrypt 1	$\beta III\Sigma 1$ 246	mięśniowa
	Chromosom 19	transkrypt 1	$\beta IV\Sigma 1$ 250	nieerytrocytarna
		transkrypt 2	$\beta IV\Sigma 2$	
		transkrypt 3	$\beta IV\Sigma 3$	
		transkrypt 4	$\beta IV\Sigma 4$	
BSPECV chromosom 15		βV 416	nieerytrocytarna podobna do β_H <i>D. melanogaster</i>	

mózgu człowieka zaobserwowano cztery izoformy spektryny α II Σ^* powstające w wyniku alternatywnego składowania eksonów (α II Σ 1-4) (CIANCI i współaut. 1999). Różnią się one obecnością lub brakiem sekwencji polipeptydowych w segmentach 10, 15 i 21, a autorzy nie wykluczają występowania większej liczby izoform (α II Σ 5-8) (CIANCI i współaut. 1996). Poznano pełną strukturę genu *SPTA1* kodującego podjednostkę alfa ludzkiej spektryny erytrocytarnej α II Σ 1. Zlokalizowany w chromosomie 1 (HUEBNER i współaut. 1985) gen o wielkości około 80 kb zawiera 52 eksony o długości od 18 do 684 bp (KOTULA i współaut. 1991). Transkrypt mRNA ma wielkość około 8 kb i ulega ekspresji wyłącznie w komórkach prekursorowych erytrocytów.

Podjednostkę alfa ludzkiej spektryny nieerytrocytarnej α II koduje gen *SPTAN1*, zlokalizowany w chromosomie 9 (MCMAHON i współaut. 1987, UPENDER i współaut. 1994). Produkt tego genu (mRNA o wielkości 7,8 kb) jako α II Σ 1 występuje w wielu komórkach wchodzących w skład niemal wszystkich tkanek, tworząc heterodimery zarówno z izoformą podjednostki beta β II Σ 2, jak i β II Σ 1*. Stwierdzono, że występująca w mózgu izoforma spektryny α II nie jest taka sama jak izoforma występująca w fibroblastach płuc ludzkich. Różni je obecność wstawki pięciu reszt aminokwasowych w 15 segmencie (CIANCI i współaut. 1996), będąca wynikiem alternatywnego składowania eksonów. Kombinacje obecności wstawek w segmentach 10, 15 i 21 tworzą możliwość istnienia aż ośmiu izoform. Dotychczas poznano sekwencje oraz zlokalizowano w różnych tkankach cztery izoformy α II Σ 1-4: izoformę Σ 1 w mózgu i mięśniach, Σ 2 w większości badanych tkanek narządów myszy, takich jak serce, płuca, wątroba, nerki, grasica i in., Σ 3 w mięśniach i tkankach zarodkowych, a Σ 4 w gonadach osobników dorosłych i tkankach zarodkowych (CIANCI i współaut. 1996). Wstawka w segmencie 10 znajduje się w pobliżu domeny SH3 i, zmieniając strukturę trzeciorzędową tego regionu, zmienia miejsce zaleźnego od jonów wapnia wiązania kalmoduliny, co może mieć wpływ na wiązanie kalpainy i kaspazy 3. Należy wspomnieć, że spektryny typu nierytrocytarnej (α II Σ^*) posiadają miejsce zaleźnego od jonów Ca^{2+} wiązania kalmoduliny (odcinek o długości 24 reszt aminokwasowych) w segmencie 11, a w jego bezpośrednim sąsiedztwie znajduje się miejsce wrażliwe na proteazy, rozpoznawane przede wszystkim przez kalpainy, wewnątrzkomórkowe proteazy zależne od jonów Ca^{2+} . Spektryna alfa *Drosophila* posiada także miejsce wiązania kalmoduliny, ale położone w segmencie 14. Natomiast spektryna erytrocytarna ssaków posiada miejsce wiązania

kalmoduliny charakteryzujące się niskim powinowactwem, które znajduje się w pobliżu aminowego końca tego polipeptydu (patrz: SIKORSKI i współaut. 1993a).

Poznane izoformy spektryny α II Σ^* mogą tworzyć funkcjonalne heterodimery z różnymi znanymi produktami genów kodujących podjednostki beta spektryny.

PODJDENOSTKI BETA SPEKTRYNY: β II Σ 1, β II Σ 2, β II, β III, β IV, β V

Formy erytrocytarne I1 i nieerytrocytarne β II Σ 2 są produktami tego samego genu, *SPTB*, położonego w chromosomie 14 w regionie q24.1-q24.2, powstającymi w procesie swoistej tkankowo alternatywnej obróbki pierwotnego transkryptu (WINKELMANN i współaut. 1990). β II Σ 2 jest izoformą typu erytroidalnego, ale nie występuje w erytrocytach. Posiada ona dodatkowy odcinek o wielkości 21,4 kDa na końcu karboksylowym, zawierający region homologiczny do plekstryny, tzw. domenę PH (ang. pleckstrin homology) (MACIAS i współaut. 1994). Spektryna β II Σ 2 w obserwacjach histochemicznych lokalizuje się w ciałach komórek nerwowych i w dendrytach komórek Purkiniego, podczas gdy izoforma I1 występuje wyłącznie w krwinkach czerwonych.

Gen *SPTBN1*, zlokalizowany w ludzkim chromosomie 2, koduje izoformę β II, charakterystyczną dla substancji białej mózgu, bowiem tetramery z udziałem izoformy podjednostki alfa α II Σ 1 występują w ciele komórki nerwowej, aksonach i zakończeniach presynaptycznych. Transkryptem tego genu jest mRNA o długości 7651 bp, kodujący białko o łańcuchu złożonym z 2364 reszt aminokwasowych (HU i współaut. 1992).

Gen *SPTBN2* w regionie q13 ludzkiego chromosomu 11 oraz gen *Spnb3* w mysim chromosomie 19 kodują III izoformę spektryny β . Jej ekspresję obserwuje się w około pięćdziesięciu rodzajach komórek ludzkich. Wysoki poziom ekspresji występuje w mózgu i komórkach pełniących rolę wydzielniczą (np. nerek, wątroby i trzustki). Białko to jest składnikiem zarówno cytoszkieletu podbłonowego, jak również występuje w cytoplazmie w postaci związanej z błonami aparatu Golgiego (STANKEWICH i współaut. 1998). Formę β III odkryto w trakcie prac nad sekwencjonowaniem genomu człowieka i poszukiwań dużych białek (składających się z ponad 1000 reszt aminokwasowych) i ich genów. Wielkość transkryptu genu *SPTBN2* wynosi 7864 bp, a łańcuch białkowy liczy 2390 reszt aminokwasowych. Regulacja ekspresji genu kodującego β III odbywa się nie tylko na poziomie transkrypcji, ale także na następnych eta-

pach biosyntezy, co może stanowić wyjaśnienie różnic pomiędzy oczekiwaną dla mRNA wielkością transkryptu, a wielkością białka (OHARA i współaut. 1998).

Cztery izoformy spektryny $\beta IV\Sigma^*$ kodowane są przez gen występujący w chromosomie 19 w regionie q13.13 (BERGHS i współaut. 2000). Najdłuższa izoforma, $\beta IV\Sigma 1$, o masie 250 kDa, składa się z domeny wiążącej aktyne, 17 powtarzających się segmentów spektrynowych, specyficznej domeny, w której czterokrotnie powtarza się motyw pięciu reszt aminokwasowych ERQES, oraz domeny plekstrynowej. Izofорма $\beta IV\Sigma 2$ zbudowana jest analogicznie jak N-końcowa połowa cząsteczki izoformy $\beta IV\Sigma 1$, zaś $\beta IV\Sigma 3$ jak jej połowa od strony C-końca. Izofорма $\beta IV\Sigma 4$ nie zawiera natomiast domeny z motywem ERQES oraz domeny plekstrynowej. Produkty genu występują w przewężeniach Ranviera neuronów mózgu i w trzustce. Obecność w pobliżu błon lizosomalnych i endosomalnych sugeruje ich udział w procesach tworzenia pęcherzyków wydzielniczych (DEMATTEIS i MORROW 2000).

Obecność cięższej izoformy podjednostki beta, oznaczonej βV , obserwuje się nie tylko u *Drosophila*. Gen *BSPECV* w ludzkim chromosomie 15, w regionie q21, koduje łańcuch polipeptydowy o masie 416 kDa (STABACH i MORROW 2000). Jego cDNA zawiera 68 eksonów. Sekwencja aminokwasowa wskazuje na występowanie 30, a nie 17, jak u innych poznanych spektryn beta, powtarzających się segmentów spektrynowych, podobnie jak w β_H *Drosophila*. Podjednostka ta posiada domeny charakterystyczne dla łańcuchów beta znanych spektryn: domenę wiążącą aktyne, miejsce odpowiedzialne za oddziaływanie z błoną, miejsce asocjacji heterodimeru i, w pobliżu końca karboksylowego, domenę homologiczną do plekstryny. Stwierdzono obecność sekwencji aminokwasowej, która jest podobna do domeny wiążącej ankiryne, ale jej homologia do domen występujących w znanych spektrynach jest niewielka. Postuluje się zatem, że podjednostka ta nie posiada zdolności wiązania ankiryne. Izofорма βV , poznana jako klon biblioteki cDNA siatkówki oka człowieka, ulega ekspresji głównie w tkankach układu nerwowego, mózdzku i rdzeniu kręgowym, ale również i w tkankach innych narządów (płuc i serca płodu, żołądka, wątroby, trzustki, nerek, pęcherza moczowego). Występuje ona także w leukocytach pochodzących z węzłów limfatycznych, gdzie obserwuje się niski poziom jej ekspresji. Wyniki obserwacji prowadzonych techniką immunofluorescencji wskazują na lokalizację tego białka w zewnętrznej części komórek fotoreceptorowych (pręcików i

czopków) siatkówki oraz w błonach i cytozolu komórek nabłonkowych układu pokarmowego. Obecny w 5 segmencie tej izoformy spektryny 45-aminokwasowy odcinek jest homologiczny w 42% do białka E4 wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) (STABACH i MORROW 2000).

Wielkość i lokalizacja eksonów w genach kodujących podjednostki spektryny człowieka nie są skorelowane z budową 106-aminokwasowych segmentów spektrynowych, co wskazuje na obecność intronów w genach kodujących spektrynę już na wczesnym etapie ewolucji.

Obok podjednostek spektryn kodowanych przez genom człowieka, najlepiej scharakteryzowano geny *Drosophila melanogaster*. Trzy występujące w komórkach tego organizmu izoformy są kodowane przez osobne geny. Homologiczną do erytrocytarnej $\alpha I\Sigma 1$ podjednostkę alfa, posiadającą masę 278 kDa i zbudowaną z 2415 reszt aminokwasowych, koduje gen z chromosomu 3. Podobieństwo budowy i układu domen funkcjonalnych i strukturalnych oraz długość segmentów wskazuje na duże podobieństwo również do α -aktyniny (DUBREUIL i współaut. 1989). Drugi gen koduje białko podobne do podjednostki beta spektryny erytrocytarnej, o masie 265 kDa, zbudowane z 2291 reszt aminokwasowych (BYERS i współaut. 1989, 1992). Unikalna, największa z poznanych izoform spektryn, tzw. ciężka podjednostka β lub β_H , posiada masę 430 kDa. Koduje ją gen z chromosomu 3 i tworzy ona funkcjonalne tetramery z podjednostką α . Kodująca ją sekwencja nukleotydowa jest bardziej, niż sekwencje kodujące inne podjednostki występujące u *Drosophila*, podobna do dystrofiny (DUBREUIL i współaut. 1990). Ostatnio badania rozmieszczenia białek integralnych w błonach komórek nabłonkowych zarodków *Drosophila* wykazały, że podjednostka beta bierze udział w procesach polaryzacji komórek niezależnie od podjednostki alfa tworzącej tetramer z β_H , a mutacje w sekwencji tej podjednostki okazały się letalne dla zarodków we wczesnym stadium larwalnym (DUBREUIL i współaut. 2000).

Poznano pełne sekwencje cDNA kodujące podjednostki alfa i beta spektryny zarówno typu erytrocytarnej, jak i występujące w innych tkankach myszy (*Mus musculus*). I tak, odpowiednik izoformy βII kodowany jest przez gen *Spnb2* w chromosomie 11, a odpowiednik βI przez gen *Spnb1* w chromosomie 12, natomiast podjednostkę αI koduje gen *Spna1* w chromosomie 1. Stwierdzono, że mRNA kodujący mysia izoformę spektryny $\beta II\Sigma 1$ występuje, poza komórkami mózgowymi, także w mięśniach szkieletowych, gdzie ulega ekspresji na niskim poziomie, oraz w mięśniu sercowym, gdzie poziom

ekspresji jest bardzo wysoki, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje immunocytochemiczne (ISAYAMA i współaut. 1993). Nową, nietypową formę spektryny o krótkim łańcuchu, zbudowanym zaledwie z 220 reszt aminokwasowych, zidentyfikowano w komórkach serca i wątroby myszy. Produkt genu *elf1* (ang. embryonic liver fodrin 1) jest w 57% homologiczny do występującej w tym samym organizmie izoformy nieerytrocytarnej podjednostki beta spektryny (MISHRA i współaut. 1998). Posiada on typową dla spektryn domenę wiążącą aktyne na końcu aminowym i homologiczny do innych podjednostek beta odcinek C-końcowy. Jego niewielka masa cząsteczkowa wynika z braku powtarzających się 106-aminokwasowych segmentów w centralnej części cząsteczki. Ekspresja tego produktu jest zależna od stadium rozwojowego zarodka: we wczesnym stadium jest on obecny, później ekspresja zanika (MISHRA i współaut. 1998). Podczas rozwoju komórek wątroby zarodków mysich obserwowano występowanie homologu spektryny o masie 200 kDa, będącego produktem genu *elf3*. Gen ten położony jest w chromosomie 11, w miejscu różnym od dotychczas poznanych izoform spektryny. Białko to, zbudowane z 2154 reszt aminokwasowych, jest w 95% homologiczne do mysiej izoformy spektryny $\beta\text{II}\Sigma 1$ i charakteryzuje się obecnością domeny wiążącej aktyne, powtarzających się segmentów o budowie helikalnej w części środkowej cząsteczki oraz krótkiej domeny regulatorowej w końcu karboksylowym. Wyniki obserwacji przeprowadzonych technikami immunocytochemicznymi wskazują na obecność białkowego produktu genu *elf3* zarówno w błonie, jak i w cytoplazmie hepatocytów oraz komórek nabłonka wyściełającego drogi żółciowe (MISHRA i współaut. 1999). Zidentyfikowano izoformy spektryny $\beta\text{IV}\Sigma^*$ kodowane u myszy przez gen w regionie b2 chromosomu 7 (BERGHS i współaut. 2000).

Choć znana jest struktura pierwszorzędowa podjednostki alfa II spektryny szczura (*Rattus norvegicus*), dotychczas nie udało się zlokalizować genu kodującego to białko. Transkrypt genu *RNALIISPE* o długości 7866bp ulega ekspresji w komórkach wątroby (GenBank 1996, nr dostępu X90845) tego zwierzęcia. Znane są fragmenty sekwencji homologicznych do podjednostki alfa spektryny nieerytrocytarnej o wielkości 1,6 kb w mózgu (LETO i współaut. 1988) i 3 kb w nerkach (HONG i DOYLE 1989). W pełni poznano natomiast sekwencję cDNA o długości 7,8 kb, kodującego podjednostkę spektryny βIII szczura. Jest ona w 95% homologiczna do podjednostki βIII człowieka, a 275 reszt w regionie końca aminowego, tworzących do-

menę wiążącą aktyne, jest wysoce konserwatywnych. Ulega ona ekspresji przeważnie w komórkach nerwowych w postaci $\alpha\text{II}/\beta\text{III}$, obok innych izoform ($\beta\text{1}\Sigma 2$ i $\beta 2\Sigma^*$), ale wykazuje inną lokalizację w ciele komórki i jej brak w aksonach. Obserwowany zróżnicowany poziom ilości tego białka w stosunku do ilości mRNA może świadczyć o tym, że regulacja ekspresji genu spektryny βIII następuje nie tylko na poziomie transkrypcji, ale także posttranskrypcyjnie (OHARA i współaut. 1998).

W niedawnych doniesieniach sygnalizowano, że gen kodujący izoformę spektryny $\beta\text{II}\Sigma 1$ może kodować dzięki alternatywnemu składowaniu eksonów również drugą izoformę, $\beta\text{II}\Sigma 2$ (HAYES i współaut. 2000). Izofорма ta, w przeciwieństwie do $\beta\text{II}\Sigma 1$, charakteryzuje się brakiem domeny plekstrynowej i 28-aminokwasowego odcinka w regionie końca karboksylowego. Przeciwciała skierowane przeciw sekwencji zlokalizowanej w końcu karboksylowym krótszej izoformy rozpoznawały swoiste epitopy w polipeptydach o masach 240 kDa i 270 kDa, występujących w mięśniach i komórkach nerwowych szczura. W pochodzących z mózgu komórkach nerwowych, hodowanych w kulturach tkankowych, izofорма „długa” jest obecna w neurytach, podczas gdy występowanie izoformy „krótkiej” ograniczone jest raczej do ciała komórki. *In vitro* forma „krótka” nie wykazuje aktywności wiązania białka aksonów — fodaksyny, co jest cechą charakterystyczną izoformy „długiej”. Występowanie zarówno „długiej”, jak i „krótkiej” izoformy obserwuje się w zakończeniach postsynaptycznych komórek nerwowych, a w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym obie izoformy zlokalizowane są w pobliżu dysków Z. Nieznaną dotychczas spektrynę βIV odnaleziono w mózgu i komórkach nerwowych szczura. W hipokampie zaobserwowano pojawienie się izoformy $\beta\text{IV}\Sigma 1$ dopiero w 19 dniu rozwoju zarodkowego. W neuronach nerwu kulszowego spektryna βIV występuje, podobnie jak u człowieka, w przewężeniach Ranviera (BERGHS i współaut. 2000).

Jedną z pierwszych poznanych pełnych sekwencji podjednostki alfa spektryny mózgowej była spektryna alfa kury (*Gallus gallus*). Produkt genu, o wielkości 7547 bp, koduje białko o masie 285 kDa, zbudowane z 2477 reszt aminokwasowych (WASENIUS i współaut. 1989). Porównania sekwencji aminokwasowej wykazały znaczne podobieństwo tej podjednostki do nieerytrocytarnych spektryn alfa innych organizmów (Tabela 2).

Badając zmiany zachodzące w trakcie rozwoju zarodkowego *Xenopus laevis*, zaobserwowano zróżnicowany poziom ekspresji białka o

Tabela 2. Porównanie homologii (%) znanych pełnych sekwencji podjednostek alfa spektryny na poziomie struktury pierwszorzędowej.

Organizm typ podjednostki alfa	<i>Homo sapiens</i> ($\alpha I\Sigma^*$)	<i>Homo sapiens</i> ($\alpha II\Sigma^*$)	<i>Mus musculus</i> ($\alpha I\Sigma^*$)	<i>Rattus norvegicus</i> ($\alpha II\Sigma^*$)	<i>Gallus gallus</i> ($\alpha II\Sigma^*$)	<i>Drosophila</i> (α)
<i>Homo sapiens</i> Erytrocytarna alfa ($\alpha I\Sigma^*$)	X	56	80	56	55	66
<i>Homo sapiens</i> Nieerytrocytarna alfa ($\alpha II\Sigma^*$)	56	X	55	98	95	46
<i>Mus musculus</i> Erytrocytarna alfa ($\alpha I\Sigma^*$)	80	55	X	56	55	45
<i>Rattus norvegicus</i> Nieerytrocytarna alfa ($\alpha II\Sigma^*$)	56	98	56	X	95	66
<i>Gallus gallus</i> Nieerytrocytarna alfa ($\alpha II\Sigma^*$)	55	95	55	95	X	65
<i>Drosophila melanogaster</i> Podjednostka alfa (α)	66	46	45	66	65	X

wysokiej homologii do podjednostki alfa spektryny mózgowej. Znane są fragmenty kodujące sekwencji o wielkości 1,0 i 1,4 kb (GIEBELHAUS i współaut. 1987).

Genom nicienia, *Caenorhabditis elegans*, zawiera gen *sma-1*, kodujący homolog ciężkiej izoformy podjednostki beta (β_H) spektryny, podobnej do obecnej u *Drosophila*. Podobnie jak w przypadku izoformy β_V człowieka, nie występuje w nim domena SH3, która jest obecna w β_H *Drosophila*. Kodowane przez ten gen białko, o łańcuchu zbudowanym z 4063 reszt aminokwasowych, ulega ekspresji w komórkach tkanek nabłonkowych zarodków *C. elegans*. Podczas rozwoju zarodkowego *C. elegans* do postaci larwalnej długość zarodka ulega czterokrotnemu zwiększeniu. Uważa się, że jest to możliwe dzięki temu, że w komórkach nabłonka cytoskielet komórkowy ma postać skondensowaną. U zarodków, u których występują mutacje w genie *sma-1*, zaobserwowano niższą szybkość wydłużania ciała, tak że powstałe larwy są znacznie krótsze od larw typu dzikiego. Ponieważ u *Drosophila* spektryna β_H jest związana z błonami plazmatycznymi w miejscach wzrostu komórek (części apikalne), a podjednostka β z błonami

podstawno-bocznych części komórek, postuluje się udział tego homologu spektryny w procesach wydłużania komórek embrionalnych *C. elegans* jako składnika apikalnej części cytoskieletu błonowego (MCKEOWN i współaut. 1998).

Homologi spektryny beta występujące w komórkach nerwowych i mięśniowych *C. elegans* są kodowane przez gen *unc-70*, znajdujący się w chromosomie V (HAMMARLUND i współaut. 2000). Izofoma Ce β S1 jest zbudowana z 2257 reszt aminokwasowych, wykazuje 54% homologii do ludzkiej spektryny $\beta_{II\Sigma 1}$ i różni się długością końca aminowego cząsteczki od izoformy Ce β S2. Zarówno produkt genu *sma-1*, jak i izoformy Ce β S1 oraz Ce β S2, mogą tworzyć funkcjonalne tetramery z homologiem spektryny α (MOORTHY i współaut. 2000). Zastosowanie technik biologii molekularnej w eksperymentach, w których blokowano ekspresję genów kodujących spektrynę beta, pozwoliło przybliżyć funkcję tego białka w komórkach mięśniowych i nerwowych organizmów niższych (HAMMARLUND i współaut. 2000, MOORTHY i współaut. 2000) (patrz: FUNKCJE SPEKTRYNY).

U *Danio rerio* odnaleziono i poznano sekwencję genu *sptb* z chromosomu LG17, o wielkości mRNA 7371bp, kodującego podjednostkę beta spektryny (GenBank, nr dostępu AF262336). Spektryna tego organizmu w rozwoju zarodkowym ulega ekspresji w pierwotnych włóknach mięśniowych, komórkach mezodermalnych tworzących zawiązki mięśni poprzecznie prążkowanych (somitach) oraz w erytrocytach. Podobnie jak w podjednostce $\beta_{II\Sigma}$

ktury pierwszorzędowej podjednostek beta spektryny jest zróżnicowana, podobnie jak w przypadku podjednostek alfa, w zależności od typu podjednostki. Podjednostki tego samego typu wykazują wysoką homologię, niezależnie od organizmu. Pomiedzy podjednostką beta spektryny erythrocytarnej i nieerythrocytarnej tego samego organizmu homologia na poziomie reszt aminokwasowych nie jest większa niż 65% (Tabela 3).

Tabela 3. Porównanie homologii znanych pełnych sekwencji podjednostek beta spektryny na poziomie struktury pierwszorzędowej.

Organizm typ podjednostki beta	<i>Homo sapiens</i> ($\beta_{I\Sigma^*}$)	<i>Homo sapiens</i> ($\beta_{II\Sigma^*}$)	<i>Homo sapiens</i> ($\beta_{III\Sigma^*}$)	<i>Mus musculus</i> ($\beta_{II\Sigma^*}$)	<i>Rattus norvegicus</i> ($\beta_{III\Sigma^*}$)	<i>Drosophila</i> (β)
<i>Homo sapiens</i> Erythrocytarna ($\beta_{I\Sigma^*}$)	X	59	53	59	53	48
<i>Homo sapiens</i> Nieerythrocytarna ($\beta_{II\Sigma^*}$)	59	X	57	93	59	55
<i>Homo sapiens</i> Beta III ($\beta_{III\Sigma^*}$)	53	57	X	61	87	44
<i>Mus musculus</i> Nieerythrocytarna ($\beta_{II\Sigma^*}$)	59	93	61	X	63	55
<i>Rattus norvegicus</i> Beta III ($\beta_{III\Sigma^*}$)	53	59	87	63	X	44
<i>Drosophila melanogaster</i> Podjednostka beta (β)	48	55	44	55	44	X

spektryny ssaków, w białku tym obecna jest domena PH. Stwierdzono, że mutacje w obrębie tego genu prowadzą do sferocytozy (LIAO i współaut. 2000).

Poznano pełne sekwencje aminokwasowe podjednostek alfa wykazują zróżnicowany stopień homologii, zależny od typu podjednostki. U ssaków, na przykład, podjednostki erythrocytarne wykazują wobec podjednostki alfa erythrocytarnej innego organizmu wysoką homologię (80–98%). Analogicznie, największy stopień homologii podjednostki nieerythrocytarne wykazują wobec podjednostek spektryn nieerythrocytarnych innych organizmów (Tabele 2 i 3). Oba typy podjednostek wykazują homologię pomiędzy sobą na poziomie 46–66%. Homologia stru-

Stosując przeciwciała skierowane przeciw znanym spektrynom kręgowców, począwszy od 1984 r. wykryto wiele immunoanalogów w organizmach zwierząt jednokomórkowych. Jako pierwsze zlokalizowano białko GP-260 o wydłużonym kształcie pod błoną komórkową *Acanthamoeba*. Jest ono immunologicznie podobne do spektryny beta i posiada zdolność wiązania aktyny (POLLARD 1984). Polipeptydy o masach 180–240 kDa, występujące w pobliżu błon komórek *Dictyostelium*, *Amoeba*, *Paramecium* i *Trypanosoma*, zidentyfikowano wykorzystując różne przeciwciała, skierowane zarówno przeciw całym cząsteczkom spektryn kręgowców, jak i przeciw podjednostkom alfa lub beta.

IMMUNOANALOGI SPEKTRYNY U ROŚLIN I BAKTERII

Dotychczasowe badania dowodzą obecności białek lub polipeptydów podobnych do spe-

ktryn w komórkach organizmów bakteryjnych i roślinnych. Na podobieństwo wskazuje ich re-

aktywność z przeciwciałami tak mono-, jak i poliklonalnymi, skierowanymi przeciw całej cząsteczce spektryny lub przeciw poszczególnym jej podjednostkom, oraz lokalizacja podbłonowa w komórkach roślinnych.

Wśród białek ulegających ekstrakcji roztworem o niskiej sile jonowej z liści pomidora (*Lycopersicon esculentum*), jeden z prążków elektroforetycznych, odpowiadający masie cząsteczkowej 220 kDa, wykazywał reaktywność z przeciwciałami skierowanymi przeciwko podjednostce beta ludzkiej spektryny erythrocytarnej. Stosując te same przeciwciała, zlokalizowano ten polipeptyd w pobliżu błony komórkowej pomidora (MICHAUD i współaut. 1991). Na obecność immunoanalogów spektryny w komórkach innych roślin wyższych wskazują dane uzyskane z doświadczeń na komórkach korzeni ryżu (*Oryza sativa*) (FARADAY i SPANSWICK 1993), liści marchwi (*Daucus carota*) (DERUIJTER i EMONS 1993), korzeni i liści grochu (*Pisum sativum*) (SIKORSKI i współaut. 1993).

Polipeptydy z ekstraktów komórek korzeni i liści grochu reagujące z przeciwciałami skierowanymi przeciw podjednostce alfa miały masę 200 kDa, a te reagujące z przeciwciałami skierowanymi przeciw podjednostce beta — masę około 100 kDa. Lokalizują się one w błonie komórkowej i współoczyszczają z frakcją błonową. Białka te posiadają zdolność wiązania F-aktyny, ankiryny i kalmoduliny (BISIKIRSKA i SIKORSKI 1997).

Białka spektrynopodobne zlokalizowano również w strukturach wewnątrzkomórkowych cebuli (*Allium cepa*) jako związane z błonami retikulum endoplazmatycznego (REUZEAU i współaut. 1997).

Obecność spektrynopodobnego białka stwierdzono także w komórkach korzeni wyki (*Vicia sativa*), gdzie obserwuje się zmianę ilości antygenów spektrynowych w fazie wzrostu włosków korzeniowych, skorelowaną ze zmianami stężenia jonów wapnia (DERUIJTER i współaut. 1998). W dalszych badaniach zaobserwowano obecność immunoanalogów spektryny erythrocytarnej człowieka i kury domowej w merystemach bobu (*Vicia faba*) i w izolowanych jądrach komórek *V. faba* i *V. sativa* (DERUIJTER i współaut. 2000). Immunoanalogi lokalizujące się w obszarach otoczki jądrowej posiadają wyznaczone elektroforetycznie masy wynoszące 220 i 240 kDa. Według autorów, wyniki te wskazują na oddziaływanie białek podobnych do spektryn z macierzą jądrową.

Poza roślinami wyższymi, immunoanalogi spektryny zlokalizowano w komórkach glonu *Chlamydomonas reinhardtii* (zielenice — *Chlorophyta*) (LORENZ i współaut. 1995). W obrazach

uzyskanych technikami immunofluorescencji, analogi podjednostek spektryny występują bezpośrednio pod błoną komórkową glonu. Widoczny po rozdziale elektroforetycznym w warunkach natywnych prążek odpowiadający masie około 800 kDa może być formą oligomeryczną białka, którego monomery mają masy około 200 kDa — immunoanalog podjednostki alfa, oraz 190 kDa — analog podjednostki beta erythrocytarnej spektryny wołowej. Białka te, podobnie jak spektryny zwierzęce, ulegają ekstrakcji roztworami o niskiej sile jonowej.

U innych organizmów należących do zielenic, takich jak *Micrasterias denticulata*, *Closterium lunula* i *Euastrum oblongum*, wykryto polipeptydy o masach 220, 120 i 70 kDa, które reagują z przeciwciałami skierowanymi przeciw cząsteczce spektryny erythrocytów ludzkich i kury (HOLZINGER i współaut. 1999). Autorzy postulują udział białek spektrynopodobnych obecnych w komórkach tych organizmów w egzocytozie.

Zwielokrotnioną liczbę epitopów dla przeciwciał przeciwpektrynowych zaobserwowano w wierzchołkach wzrostowych konidiów grzyba, *Neurospora crassa* (KAMINSKY i HEATH 1995, DEGOUSSE i współaut. 2000). Frakcjonowanie komórek i badania immunocytochemiczne dowiodły obecności białek o masach 220–240 kDa, związanych z błonami plazmatycznymi, które posiadają zdolność wiązania aktyny i wykazują dodatnią reakcję z przeciwciałami skierowanymi przeciw podjednostkom alfa i beta spektryny kury, co pozwala zaliczyć je do białek podobnych do spektryny.

Obecność immunoanalogów spektryny wykazują również komórki bakterii, *Halobacterium salinarium* i *Escherichia coli* (BISIKIRSKA i współaut. 1996). Dodatnia reakcja z przeciwciałami skierowanymi przeciw podjednostkom spektryny erythrocytarnej wołu świadczy o obecności w komórkach *Halobacterium* analogu podjednostki alfa o masie 120 kDa i podjednostki beta o masie 165 kDa. Nie stwierdzono w komórkach *E. coli* występowania immunoanalogu podjednostki beta, zaś immunoanalog podjednostki alfa posiada masę cząsteczkową około 200 kDa.

Na podstawie badań przeprowadzonych za pomocą technik biologii molekularnej oraz przeszukania zamieszczonej w banku pełnej sekwencji genomu *E. coli* stwierdzono, że w komórkach bakterii dodatnio reagujących z przeciwciałami skierowanymi przeciwko podjednostkom spektryny nie występuje długi odcinek sekwencji nukleotydowej, który mógłby pretendować do miana genu kodującego spektrynę bakteryjną. Istnieje wiele krótkich se-

kwencji nukleotydowych, których homologia tłumaczy hybrydyzację ze znakowanymi sondami o sekwencjach spektryny oraz obecne są krótkie odcinki polipeptydowe wykazujące homologię do fragmentów sekwencji aminokwasowej spektryny, które są odpowiedzialne za dodatnie reakcje ze swoistymi przeciwciałami (LORENZ 1999).

Doświadczenia przeprowadzone technikami biologii molekularnej dowiodły, że w komórki liści ziemniaka i grochu ulegają ekspresji wyso-

kocząsteczkowe mRNA o wielkościach 8 i 7 kb, zbliżone wielkością do transkryptów znanych spektryn zwierzęcych (LORENZ 1999). Genomy tych roślin zawierają wiele sekwencji nukleotydowych ulegających amplifikacji w reakcjach PCR przy użyciu starterów o sekwencjach spektryn zwierzęcych. Wykryte sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe niewątpliwie wyjaśniają dodatnie reakcje białek z komórek roślinnych z przeciwciałami skierowanymi przeciw spektrynie.

NADRODZINA SPEKTRYN

Spośród wielu białek zdolnych do wiązania aktyny, do nadrodziny spektryn należą białka posiadające w części końca aminowego cząsteczki region odznaczający się wysoką homologią struktury pierwszorzędowej, stanowiący domenę wiążącą aktynę. Jest to rodzina białek wiążących i sieciujących aktynę, których cechą wspólną jest występowanie przynajmniej jednej domeny odpowiedzialnej za wiązanie filamentów aktynowych. Analiza struktury pierwszorzędowej domen wiążących aktyny białek należących do nadrodziny spektryn wykazała, że zawierają one konserwatywną sekwencję o długości około 250 reszt aminokwasowych, która odpowiada dwóm powtórzeniom domeny CH (ang. calponin homology domain) (MATSUDAIRA 1991).

Nadrodzinę tę tworzą następujące grupy białek:

— zawierające potrójnie helikalny, powtarzający się motyw o wielkości 106–125 reszt aminokwasowych w części środkowej, a w części C-końcowej domeny wiążące jony Ca^{2+} , po-

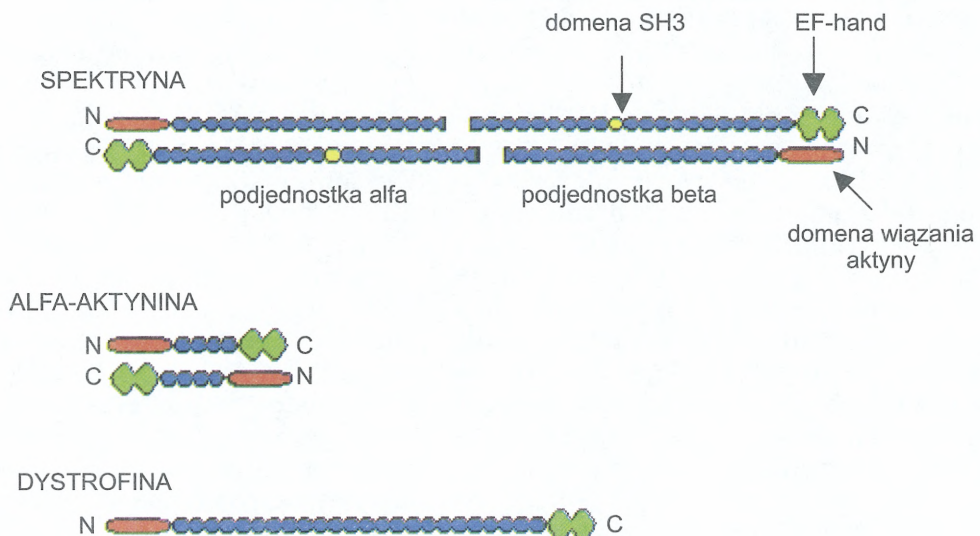
dobne do domen „EF-hand” kalmoduliny. Do grupy tej należą spektryna, alfa-aktynina i dystrofina;

— zawierające powtarzające się 96-aminokwasowe segmenty o strukturze β . Grupę tę tworzą filamina, białka ABP-280 i ABP-120;

— dla których wspólna jest tylko obecność domeny wiążącej aktynę. W skład tej grupy wchodzi fimbryna/plastyna i adducyna.

RODZINA BIAŁEK SPEKTRYNA- α -AKTYNINA-DYSTROFINA

Jak już wspomniano, spektryna należy do rodziny białek posiadających w odcinkach końcowych cząsteczki charakterystyczne domeny funkcjonalne: domenę wiążącą aktynę w części N-końcowej i domeny odpowiedzialne za wiązanie jonów wapnia na końcu karboksylowym (Ryc. 3), natomiast powtarzające się wielokrotnie w częściach środkowych cząsteczek segmenty zawierające trzy odcinki α -helikalne nadają cząsteczkom tych białek charakterystyczny, wydłużony kształt. Zarówno spektryna, jak



Ryc. 3. Rodzina białek spektryna- α -aktynina-dystrofina.

i α -aktywnina oraz dystrofina są białkami tworzącymi strukturę cytoszkieletu podbłonowego i uczestniczącymi w budowie cytoszkieletu komórkowego.

α -Aktywnina jest białkiem homodimerskim, zbudowanym z dwóch takich samych podjednostek o masie około 100 kDa, ułożonych przeciwnie do siebie. N-końcowa część tego białka jest odpowiedzialna za wiązanie filamentów aktynowych. Część środkowa odpowiada za wydłużony kształt cząsteczki α -aktywniny i składa się z czterech 114–125-aminokwasowych powtórzeń o strukturze α -helicjalnej i homologii do segmentów spektrynowych (DAVISON i współaut. 1989). Na końcu karboksylowym występują dwie wiążące jony wapnia domeny „EF-hand”, podobne do struktur obecnych w cząsteczce kalmoduliny. Białko to zlokalizowano w komórkach mięśniowych jako białko dysków Z oraz w komórkach niemięśniowych, gdzie uczestniczy w tworzeniu struktur zakotwiczących filamenty aktynowe. Wiązanie niemięśniowej α -aktywniny z F-aktyną regulują jony wapnia, podczas gdy wiązanie filamentów aktynowych przez izoformę mięśniową α -aktywniny jest niezależne od ich stężenia. α -Aktywniny są związane ze strukturami aktynowymi w komórkach charakteryzujących się zdolnością ruchu. Ich brak, niedobór lub zmiany w strukturze pierwszo- lub drugorzędowej upośledzają funkcje ruchu, natomiast jeśli defekty te dotyczą izoform mięśniowych, są przyczyną atrofii mięśni.

Trzy izoformy α -aktywniny kodowane są w genomie człowieka przez osobne geny. Gen *ACTN-1* w chromosomie 14 koduje izoformę o 892 resztach aminokwasowych, występującą w mięśniach gładkich i w komórkach niemięśniowych (MILLAKE i współaut. 1989). W mięśniach szkieletowych występuje 893-aminokwasowa izoforma kodowana przez gen *ACTN-2* z chromosomu 1 oraz produkt genu *ACTN-3* z chromosomu 11 (BEGGS i współaut. 1992).

Poznano całkowitą sekwencję mRNA kodującą izoformę α -aktywniny homologiczną do izoformy trzeciej człowieka (BIRKENMEIER i współaut. 1998), a także fragmenty sekwencji mRNA świadczące o obecności izoform pierwszej i drugiej w komórkach myszy. Obecny w genomie kury gen, analogiczny do ludzkiego genu *ACTN-1*, koduje izoformę α -aktywniny z mięśni gładkich (BARON i współaut. 1987) oraz jej izoformę obecną w komórkach mózgu (WAITES i współaut. 1992).

Również genomy bezkręgowców zawierają geny kodujące izoformy α -aktywniny. Chromosom 5 *C. elegans* zawiera gen *atr-1*, kodujący białko o masie 106 kDa, które zbudowane jest

z 910 reszt aminokwasowych. Izofорма mięśniowa wykazuje 63% homologii z α -aktywniną kury, a powtarzające się segmenty liczą 122 reszty aminokwasowe (BARSTEAD i współaut. 1991). Homolog α -aktywniny o masie 97 kDa, złożony z 862 reszt aminokwasowych, zidentyfikowano w komórkach *Dictyostelium discoideum* (WITKE i NOEGEL 1990). U *D. melanogaster* pojedynczy gen koduje α -aktywninę mięśniową i dwie izoformy niemięśniowe. Podobieństwo na poziomie struktury pierwszorzędowej α -aktywniny *Drosophila* do α -aktywnin kręgowców jest większe (68% do α -aktywniny kury) niż do białek innych bezkręgowców (30% do α -aktywniny *D. discoideum*). Transkrypt genu *TVAA1 Trichomonas vaginalis* koduje białko o długości 849 reszt aminokwasowych zlokalizowane wraz z aktyną w obszarach podbłonowych i cytoplazmie komórek (ADDIS i współaut. 1998). Nietypowe dla α -aktywnin jest występowanie segmentów, które, poza pierwszą domeną wiążącą aktynę, są w niskim stopniu homologiczne do segmentów α -aktywniny innych organizmów (BRICHEUX i współaut. 1998).

Znane są potencjalne białka roślinne (poznane dzięki automatycznemu sekwencjonowaniu genomów) wykazujące podobieństwo do znanych α -aktywnin zwierzęcych (GenBank).

Dystrofina — to białko o wysokiej masie cząsteczkowej (427 kDa), zbudowane z 3685 reszt aminokwasowych. Obserwacje technikami mikroskopii elektronowej dowiodły, że natywna cząsteczka dystrofiny charakteryzuje się wydłużonym kształtem. Znane są formy mono-, di- i tetrameryczne tego białka (SATO i współaut. 1992). Wyróżnia się ono obecnością czterech charakterystycznych domen: N-końcowej, zawierającej miejsce wiązania aktyny, pod względem funkcjonalnym i strukturalnym homologicznej do aminowego końca cząsteczki α -aktywniny (HEMMINGS i współaut. 1992) oraz pozostałych białek rodziny. Na część środkową składają się dwadzieścia cztery powtórzenia 109-aminokwasowe o wzajemnej homologii na poziomie 25%. Segmenty te mają strukturę trzech α -helis, podobnie jak powtarzające się segmenty w spektrynie i α -aktywninie (KAHANA i współaut. 1994). Kolejną domenę tworzy region wykazujący podobieństwo do struktur „EF-hand”, zaś w obszarze C-końcowym zlokalizowane jest miejsce odpowiedzialne za wiązanie białek kompleksu zwanego dystroglikanem, zawierającego glikoproteiny sarkolemmy. Lokalizacja dystrofiny bezpośrednio pod sarkolemmą przemawia za funkcją białka jako pośrednika w wiązaniu filamentów aktynowych szkieletu komórkowego do integralnych glikoprotein błonowych.

Gen kodujący dystrofinę mięśniową leży w regionie p21.3-p21.1 chromosomu X genomu człowieka. Wielkość kodowanego przez 79 eks-onów transkryptu mRNA określono na 14 kb (KOENIG i współaut. 1988). Występująca w obszarze końca karboksylowego zmienność struktury pierwszorzędowej, charakterystyczna dla białek rodziny, jest przyczyną powstawania różnych izoform tego białka. Defekty genetyczne tego obszaru, mające wpływ na funkcjonowanie odcinka odpowiedzialnego za wiązanie glikoprotein, prowadzą do nieodwracalnych uszkodzeń sarkolemy, co objawia się stopniową degradacją włókien mięśniowych i jest znane jako dystrofia mięśniowa Duchenne-Beckera (HOFFMAN i współaut. 1987a, b).

Gen białka zwanego utrofina, występującego w mózgu i komórkach nerwów obwodowych unerwiających włókna mięśniowe (GRAMOLINI i JASMIN 1997), wykazującego 69% podobieństwo do dystrofiny, zlokalizowano w chromosomie 6 (KHURANA i współaut. 1992). Sekwencje kodujące dystrofiny występują również w genomach innych kręgowców, m.in. kury, królika i myszy.

Nowo opisanymi członkami tej rodziny są tzw. trabekulina (ang. microtubule actin cross-linking factor, MACF) kręgowców i białko zwane „Kakapo” *D. melanogaster*, które posiadają domeny CH, 23–29 potrójnie helikalne segmenty oraz domeny „EF-hand” (kalmodulinowe), a także domeny plektynową i plakinową. Koniec karboksylowy tych białek zawiera domenę wiążącą mikrotubule. Białka te mogą wiązać filamenty aktynowe, kadheryny i integryny (poprzez domenę plakinową) oraz miktotubule (GREGORY i BROWN, 1998, LEUNG i współaut. 2001). Osiem do dziewięciu segmentów podobnych do powtórzeń spektrynowych wykryto w niezbędnym do prawidłowego kierowania aksonów *C. elegans* białku Trio/Unc73 (DEBANT i współaut. 1996, STEVEN i współaut. 1998), które zawiera także domenę plekstrynową.

EWOLUCJA SEGMENTU SPEKTRYNOWEGO

Układ domen funkcjonalnych i podobna budowa segmentów w białkach należących do rodziny spektryna- α -aktynina-dystrofina wskazuje na ich wspólne pochodzenie ewolucyjne. Analizując sekwencję powtarzającego się wielokrotnie segmentu o długości 106 aminokwasów

w spektrynie i o długości około 120 aminokwasów w α -aktynie, a także strukturę trzeciorzędową tego polipeptydu, zaproponowano model ewolucji od wspólnego pra-genu kodującego pra- α -aktyninę (PASCUAL i współaut. 1997a) (Ryc. 4). Podobieństwo pomiędzy poszczególnymi powtarzającymi się segmentami wskazuje na ewoluowanie poprzez serie niejednakowych duplikacji. Rozwinięciem tej hipotezy jest model, który wysunęli autorzy analizujący sekwencję aminokwasową spektryny β_H *D. melanogaster* (THOMAS i współaut. 1997, THOMAS 1998). Obecność homologicznej domeny SH3 w podjednostkach alfa spektryny i jej izoformie β_H wskazuje na pochodzenie podjednostek alfa i beta od wspólnego przodka, a nowy model zakłada powstanie spektryn z gigantycznego prekursora posiadającego zdolność wiązania aktyny podobnego do dystrofiny i „ciężkich” izoform spektryny beta. Wprowadzenie promotora transkrypcji wewnątrz jednego z segmentów jest, jak się uważa, genezą miejsca tetrameryzacji (por. Ryc. 2) i wyodrębnienia się genów kodujących podjednostki alfa i beta spektryny.

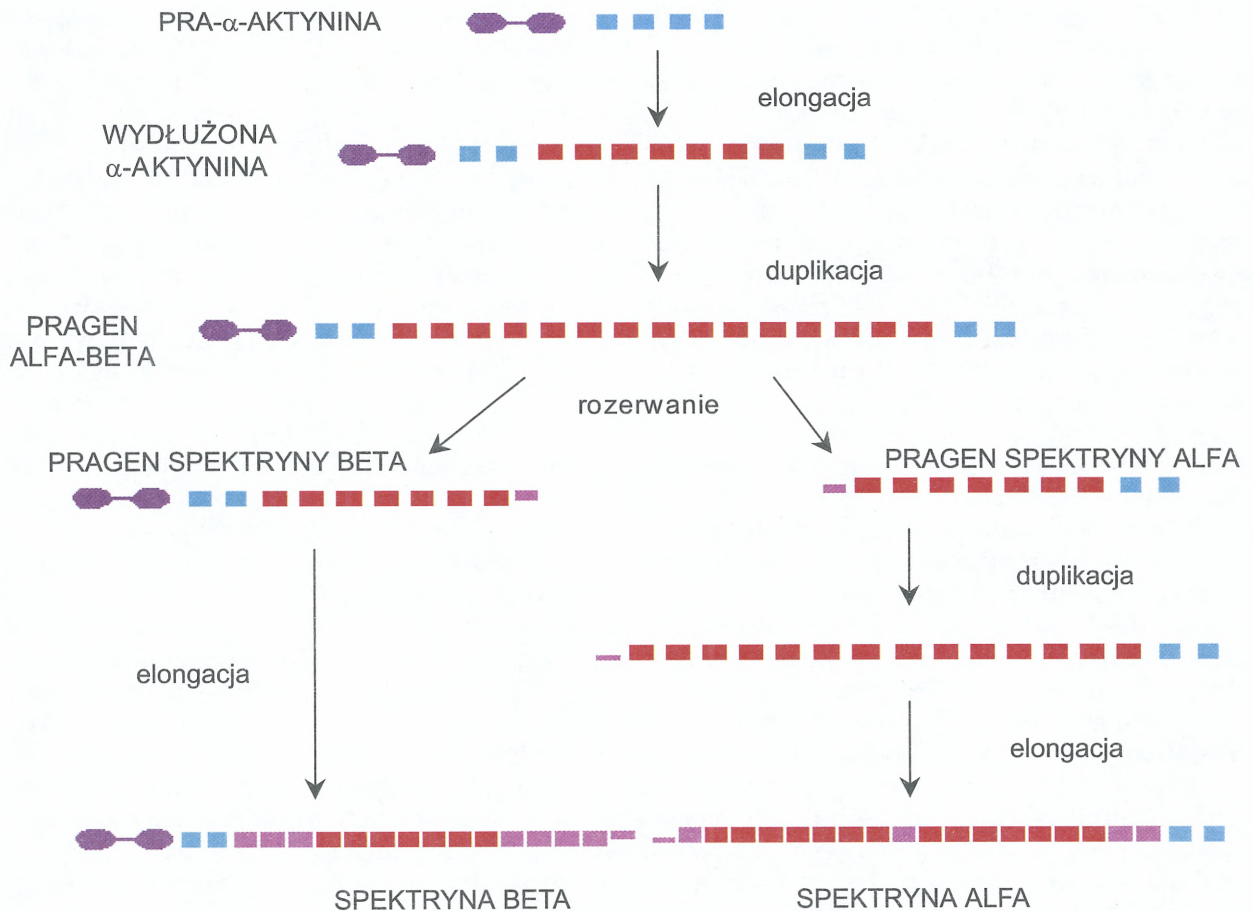
Obecnie uważa się, że większe podobieństwo poszczególnych typów podjednostek spektryny (erytrocytarna/erytrocytarna i nierytrocytarna/nierytrocytarna) obserwowane pomiędzy gatunkami, niż pomiędzy typami podjednostek (erytrocytarna/nierytrocytarna) w obrębie gatunku sugeruje, że podczas ewolucji rozejście się genów kodujących poszczególne typy podjednostek dokonało się przed rozszczepieniem linii stawonogi/kręgowce (THOMAS 1998).

Wszystkie dotychczas zaobserwowane immunoanalogi roślinne spektryny charakteryzują się niższą niż spektryny zwierzęce masą cząsteczkową. Rozpatrując zaproponowaną przez PASCUALA i współaut. (1997b) hipotezę dotyczącą ewolucji spektryn zwierzęcych, można mniemać, że roślinne białka podobne do spektryn nie posiadają struktury wielokrotnie powtarzających się segmentów charakterystycznych dla spektryn zwierzęcych. Rzeczywiście, nasze dane (Hanus-Lorenz i współaut., złożone do druku) wskazują na to, że wśród białek roślin i drożdży występują białka charakteryzujące się występowaniem jednego do najwyżej kilku segmentów podobnych do 106 aminokwasowych powtórzeń spektryny alfa.

FUNKCJE SPEKTRYNY

Brak organelli w dojrzałych erytrocytach sprawia, że izolacja błony tej komórki jest bardzo prosta, a uzyskany preparat jest homogen-

ny (nie zawiera innych, poza plazmalemą, błon). Erytrocyty nie posiadają także żadnego innego, typowego dla pozostałych komórek or-



Ryc. 4. Ewolucja segmentu spektrynowego (PASCUALA i współaut. 1997a, zmodyfikowane).

Podobieństwo budowy i wielkości segmentów oraz układu domen funkcjonalnych białek z rodziny spektryna- α -aktynina-dystrofina wskazuje na ich wspólne pochodzenie. Szereg mutacji, a szczególnie wielokrotne duplikacje całych fragmentów pra-genu doprowadziło do powstania współczesnych form tych białek.

ganizmu, systemu cytoszkieletu; są natomiast komórkami podlegającymi znacznym stresom mechanicznym podczas krążenia. Błone erytrocytu charakteryzuje znaczna elastyczność i wytrzymałość mechaniczna — komórka o średnicy 8 μm wielokrotnie w ciągu swojego życia pokonuje odcinki naczyń kapilarnych o średnicy około 2 μm , zawsze powracając do swojego pierwotnego kształtu dwuwklęsłego dysku. Dlatego erytrocyty są dogodnym modelem do badań nad rolą spektryny. Zdolność do licznych oddziaływań z białkami cytoszkieletu podbłonowego, jak również oddziaływania spektryny z mikrotubulami i elementami filamentów pośrednich w komórkach innych niż erytrocyty, nadają spektrynie rolę białka odpowiedzialnego za kształt i elastyczność komórek. Dzięki wiązaniom z białkami integralnymi błony, spektryna reguluje ich ruchliwość, jest czynnikiem wpływającym na organizację domen, bierze udział w stabilizowaniu błony. W komórkach innych niż erytrocyty spektryna odgrywa istotną rolę w adhezji komórek, w nadawaniu i utrzymaniu polar-

ności błon plazmatycznych, pośredniczy w łączeniu innych niż cytoszkielet podbłonowy struktur z błoną komórkową. Badania genetyczne nad izoformami spektryny w organizmach bezkręgowców ujawniają jej znaczenie dla zachowania kształtu i stabilizacji całych organizmów (DUBREUIL i GRUSHKO 1998).

U kręgowców, np. w limfocytach, spektryna występuje w postaci agregatów w cytozolu, które przemieszczają się w kierunku błony plazmatycznej po zadziałaniu czynników różnicujących (GREGORIO i współaut. 1992). Jest ona także obecna w rejonach kontaktu między komórkami podczas rozwoju zarodkowego oraz w połączeniach międzykomórkowych w hodowlach komórek nabłonkowych. Podobne obserwacje poczyniono badając normalne i zmienione chorobowo komórki skóry właściwej. W keratynocytach spektryna, wraz z innymi białkami cytoszkieletu podbłonowego, odgrywa ważną rolę w powstaniu i utrzymaniu polarności błon, kontaktowaniu się komórek i stabilizacji nowo powstających błon przy tworzeniu

połączeń międzykomórkowych (SHIMIZU i współaut. 1996).

Podczas wymuszonej przeciwciałami precypitacji cząsteczek spektryny w komórkach tkanek o stabilnej morfologii (np. w fibroblastach płuc ludzkich) nie obserwuje się istotnych zmian w trakcie ich podziałów, ani zmian w ich ruchliwości. Natomiast, w organizmach jedno-komórkowych, np. *Amoeba proteus*, gdzie spektryna jest związana nie tylko z błoną plazmatyczną, ale jest także obecna w okolicach błony jądrowej i błon fagolizosomalnych, działanie przeciwciał wiążących jej cząsteczki wpływa na zmiany kształtu komórek i powoduje znaczną różnicę w ich ruchliwości. Zmiany te nie są skorelowane ze zmianami w rozmieszczeniu filamentów aktynowych, co sugeruje ważną rolę spektryny jako białka występującego w cytoplazmie (CHOI i JEON 1992). Podobne obserwacje lokalizacji cytoplazmatycznej białek spektrynopodobnych poczyniono w komórkach *Paramecium* (KWIATKOWSKA i SOBOTA 1992) i *Trypanosoma* (ALCINA i współaut. 1988, SCHNEIDER i współaut. 1988). Immunoanalogom podjednostek spektryny alfa i beta z komórek *Acanthamoeba*, które charakteryzują się lokalizacją podbłonową i zdolnością wiązania aktyny, przypisuje się istotną rolę w procesach fagocytozy (KWIATKOWSKA i SOBOTA 1997).

Spektryna (α IIIS1/ β IIIS1)₂ jest główną izoformą spektryny mózgowej, związaną z błonami komórek nerwowych (ZAGON i współaut. 1986). Fakt wiązania spektryny, występującej zarówno w błonach aksonów, jak i po cytoplazmatycznej stronie błony pęcherzyków synaptycznych, przez synapsynę I (białko błon pęcherzyków synaptycznych) i F-aktynę, przemawia za jej udziałem w uwalnianiu neuroprzekaźników do przestrzeni pomiędzy błoną pre- i postsynaptyczną (SIKORSKI i współaut. 1991, KELLY 1993). Interakcja pomiędzy spektryną i F-aktyną jest wymagana do prawidłowego przebiegu procesów różnicowania i rozwoju neurytów, a także ich właściwej polarności w komórkach nerwowych (SIHAG i współaut. 1996). Badania nad interakcjami *in vitro* wskazują na udział spektryny w organizacji i specjalizacji obszarów błony plazmatycznej w komórkach tkanek nabłonkowych, połączeniach nerwowo-mięśniowych, przewężeniach Ranviera i początkowych odcinkach aksonów (BENNETT i GILLIGAN 1993). Oddziaływanie spektryny mózgowej z synapsyną I w komórkach nerwowych jest podobne do obserwowanego w błonach erytrocytów oddziaływania białka 4.1 ze spektryną erytrocytarną (α IES1/ β IES1)₂ (IGA i współaut. 1997). Spektryna komórek nerwowych wiąże synapsynę I zarówno w postaci wyizolowanej, jak i po wbudowa-

niu do błon pęcherzyków synaptycznych (SIKORSKI i współaut. 1991). Zlokalizowano obszar 25 reszt aminokwasowych w regionie końca karboksylowego podjednostki β odpowiedzialnych za to oddziaływanie (ZIMMER i współaut. 2000). Przeciwciała skierowane przeciw domenie wiążącej synapsynę I w spektrynie mózgowej specyficznie blokują transmisję pęcherzyków synaptycznych w neuronach (SIKORSKI i współaut. 2000b), co świadczy o kluczowej roli, jaką odgrywa spektryna mózgowa w przekazywaniu sygnałów przez komórki nerwowe.

Obserwacje komórek rozwijających się zarodków *D. melanogaster* wskazują na istnienie znacznej ilości cząsteczek spektryny nie związanej ze strukturami błonowymi. Pula spektryny cytoplazmatycznej może stanowić rezerwę wykorzystywaną do powiększania struktury cytoszkieletu podbłonowego w trakcie podziałów komórkowych podczas embriogenezy (PESCARETA i współaut. 1989).

Eksperymenty genetyczne na larwach *Drosophila* potwierdziły znaczącą rolę białek cytoszkieletu podbłonowego w komórkach nieerytrocytarnych (LEE i współaut. 1993, 1997). Wymuszony brak spektryny jest dla osobników dorosłych śmiertelny, ale w rozwoju zarodkowym zaobserwowano, że mutacja ta nie prowadzi do całkowitej destrukcji cytoszkieletu podbłonowego (DUBREUIL i YU 1994). Zarówno spektryna beta, jak i ankiryne, gromadzą się w obszarach podbłonowych niezależnie od braku spektryny alfa, co umożliwia przejściowo funkcjonowanie cytoszkieletu.

Na podstawie badań nad polaryzacją błon komórek nabłonkowych *Drosophila* określono również istotną rolę spektryny beta i ankiryne w organizacji rozmieszczenia cząsteczek Na⁺/K⁺-ATPazy (DUBREUIL i współaut. 1998, 2000). Zablockowanie ekspresji genu kodującego spektrynę beta zarodków doprowadziło do utraty zdolności komórek do adhezji, co okazało się dla nich śmiertelne we wczesnym stadium rozwoju. W podobnych doświadczeniach na komórkach nabłonkowych przewodu pokarmowego, mimo braku spektryny beta, kształt komórek ulegał nieznacznym zmianom i upośledzony był proces sekrecji, ale rozmieszczenie cząsteczek Na⁺/K⁺-ATPazy i stan polaryzacji komórek zostawały zachowane. Okazało się, że funkcje przypisywane dotychczas formie spektryny $\alpha_2\beta_2$ może również pełnić spektryna $\alpha_2\beta_{H_2}$ (DUBREUIL i współaut. 2000).

Również i w komórkach *C. elegans* pula spektryny alfa jest dzielona i białko to tworzy heterodimery z podjednostką beta oraz z podjednostką β_H , które razem pełnią funkcje przypisywane spektrynom, zarówno bowiem pro-

dukt genu *sma-1*, jak i izoformy $Ce\beta S1$ i $Ce\beta S2$ mogą tworzyć funkcjonalne tetramery (MOORTHY i współaut. 2000). Ich obecność w komórkach nabłonka umożliwia adhezję komórek, a także zapewnia prawidłowe funkcjonowanie komórek mięśniowych oraz nerwowych. Uszczuplenie zasobów spektryny beta przez obniżenie ilości mRNA, do poziomu niewykrywalnego, nie spowodowało istotnych zmian na poziomie komórki pod względem zachowania stabilności struktury błon, nie zaobserwowano także zmian w ich polaryzacji (MOORTHY i współaut. 2000). W przeciwieństwie do ostatnio przedstawianego modelu, który zakładał wiązanie spektryny beta z błonami organelli komórkowych, zubożenie puli spektryny beta nie powodowało wykrywalnych zmian w funkcjach wydzielniczych komórek nabłonka przewodu pokarmowego. Jednakże, ilość dostępnej spektryny beta w komórkach mięśniowych i nerwowych ma decydujące znaczenie dla prawidłowego rozwoju zarodków. Jej brak był przyczyną zaniku struktury sarkomerów i nieobecności retikulum sarkoplazmatycznego w mięśniach. W komórkach nerwowych natomiast, choć liczba neuronów pozostawała niezmienną, obserwowano zmniejszoną liczbę połączeń tworzonych przez komunikujące się aksony (HAMMARLUND i współaut. 2000). A zatem, liczba zmian w procesach zachodzących w komórkach spowodowanych wymuszonym brakiem spektryny była niższa niż tego oczekiwano na podstawie wcześniejszych odkryć. Można to tłumaczyć zastępowaniem funkcji spektryny (polaryzacja błony, dystrybucja białek integralnych) przez funkcje innych białek. Natomiast brak spektryny radykalnie wpływał na rozwój i funkcjonowanie tkanek mięśniowych i nerwowych. Na podstawie tych przykładów można wnioskować o zróżnicowanej roli spektryny, zależnie od rodzaju komórek, w których ona występuje.

Modelowe badania nad oddziaływaniem spektryny i białka 4.1 z fosfolipidami pozwoliły na stwierdzenie, że jest ono bezpośrednie i odwracalne, co może mieć znaczenie dla funkcji błon jako przenośników cząsteczek (MC KIERNAN i współaut. 1997). W przypadku cząsteczek wydłużonych, takich jak spektryna, wiązanie z fosfolipidami pozwala na zwiększenie stężenia cząsteczek białek adaptorowych, np. ankiryne lub białka 4.1, w pobliżu błony, co ułatwia wiązanie z białkami integralnymi. Ma ono także znaczenie dla zachowania funkcji spektryny wówczas, gdy stężenie białek pośredniczących w wiązaniu z błoną jest bardzo niskie, lub gdy ekspresja tych białek jest zablokowana, np. w erytrocytach pacjentów ze sferocytozą. Na podstawie tych obserwacji PINDER i BAINES (2000)

zaproponowali udział spektryny nie tylko w porządkowaniu lokalizacji białek integralnych, ale również w gromadzeniu białek transportowanych w pęcherzykach i ich stabilizacji po dotarciu do błony. W przedstawianym modelu, tetramer spektryny, poprzez wiązanie jednej cząsteczki ankiryne, oddziałuje z błoną, natomiast drugie miejsce wiązania jest wysycane przez ankiryne wiążącą białko transportowane przez pęcherzyki, np. cząsteczkę nowo syntetyzowanej Na^+/K^+ -ATPazy, i kieruje je do błony. W świetle wyników doświadczeń z blokowaniem genów spektrynowych (HAMMARLUND i współaut. 2000, MOORTHY i współaut. 2000), taka hipoteza wyjaśnia prawidłowy kontakt pomiędzy komórkami i brak zmiany ich polaryzacji przy braku spektryny.

Dotąd identyfikowana jako białko organizujące i stabilizujące strukturę błon komórkowych, spektryna jest ostatnio postrzegana również jako czynnik odgrywający ważną rolę w połączeniach pomiędzy błonami a cytozolem komórek. Poprzez równoczesne wiązanie integralnych białek błon, białek cytozolowych oraz, bezpośrednio lub poprzez białka pośredniczące, wiązanie z fosfolipidami, spektryna tworzy na powierzchni błon wielofunkcyjny szkielet uczestniczący w kontakcie elementów strukturalnych z cytoplazmatycznymi białkami sygnałowymi i wielocząsteczkowymi kompleksami białek błonowych. DEMATTEIS i MORROW (2000) podają, że spektryna beta oddziałuje z ponad 30 białkami, wiadomo też, że ma ona zdolność oddziaływania z kilkoma rodzajami fosfolipidów (SIKORSKI i współaut. 2000a).

Z błonami aparatu Golgiego związane są, za pośrednictwem ankiryne, homopolimeryczne izoformy spektryny βIII (BECK i współaut. 1994, 1997). Zakotwiczenie spektryny βIII poprzez region domeny plekstrynowej bezpośrednio w błonach aparatu Golgiego jest stymulowane i regulowane przez zaktywowany czynnik rybozylacji ADP (ang. ADP-ribosylation factor, ARF) kontrolujący poziom fosfoinozytydów w błonie, co potwierdziły doświadczenia *in vitro* i *in vivo* (GODI i współaut. 1998). Zablockowanie wiązania spektryny z błonami aparatu Golgiego hamuje transport pęcherzykowy białek z retikulum endoplazmatycznego do środkowych cystern aparatu Golgiego, co wskazuje na rolę spektryny w regulacji funkcji pełnionych przez to organelum.

Po identyfikacji spektryny w strukturze aparatu Golgiego zaproponowano dwa modele, w oparciu o które podejmowane są próby wyjaśnienia roli tego białka w funkcjonowaniu tego organelum. Pierwszy z nich zakłada obecność spektryny jako białka związanego z błonami

cystern Golgiego. Oprócz organizacji i stabilizacji błon, spektryna nadaje kształt i integruje struktury tych cystern, odpowiada też za dynamikę cytoszkieletu cystern. Dzięki niej struktura ta może zarówno zakotwiczać w kompartmentach *cis* pęcherzyki transportujące intermediaty z retikulum endoplazmatycznego, a także uwalniać do przestrzeni za aparatem Golgiego pęcherzyki docelowo kierowane do błony komórkowej (DEMATTEIS i MORROW 1998, 2000). Drugi model opiera się na obecności kompleksów spektryna-ankiryna na powierzchni pęcherzyków transportujących związki zsyntetyzowane w retikulum endoplazmatycznym do cystern aparatu Golgiego. Zakłada on oddziaływanie spektryny z błoną pęcherzyka na etapie tzw. wczesnego uwalniania z retikulum endoplazmatycznego. Tak „opłaszczony” przez spektrynę pęcherzyk jest transportowany do części *cis* aparatu Golgiego wzdłuż mikrotubul dzięki zdolności oddziaływania spektryny z dyneiną, a

następnie zostaje wbudowany do błony aparatu Golgiego, uwalniając transportowane cząsteczki do wnętrza cystern (DEMATTEIS i MORROW 2000, DEVARAJAN i współaut. 1997). Chociaż przedstawione modele zakładają odmienną lokalizację spektryny w aparacie Golgiego, zgodnie przypisują jej istotną rolę w procesach wydzielania wewnętrznego i biosyntezy. Uwzględniają one jednak funkcję tylko jednej z izoform spektryny. Obecnie wiemy, że odmienna lokalizacja implikuje też zróżnicowanie funkcji tego białka. Dotychczasowe odkrycia wykazały, że spektryna jest białkiem powszechnie występującym w komórkach zwierzęcych, gdzie pełni wiele istotnych funkcji, często odmiennych w zależności od specyfiki tkanek, w komórkach których występuje. Istotne są więc pytania, czy podobne izoformy mogą się wzajemnie „zastępować” w przypadku braku lub niedoboru jednej z nich, oraz czy funkcję spektryn mogą przejmować inne białka obecne w komórce.

SPECTRINS — A DIVERSITY OF FORMS AND FUNCTIONS IN WIDE-SPREAD CYTOSKELETAL PROTEINS

Summary

In this review, the structure of spectrins and the membrane skeleton is presented. The best known red blood cell membrane cytoskeleton is responsible for maintaining red cell membrane integrity and other properties such as deformability and elasticity. The presence of a good many homologues of various erythroid membrane cytoskeletal proteins in nonerythroid cells of animals (including protozoan organisms) suggests a similar role in these cells and tissues. However, interactions of these proteins (mostly spectrins and ankyrins) with components of the plasma membrane such as cell adhesion molecules and channel proteins, cytosol, including all major cytoskeletal systems (intermediate filaments, microfilaments and microtubules), as well as the binding to intracellular organelles such as Golgi cisternae or vesicles and exocytotic vesicles, suggest important

roles spectrins and other membrane skeletal proteins in stabilisation of cell structures and in regulation of cellular processes. Such variety of functions and localisations are probably based on the variety of isoforms generated by the presence of multiple genes in mammals (at least two genes encoding subunits and at least five genes coding for subunits of spectrin). Each of these genes can be alternatively spliced generating additional sets of isoforms. The actin-binding domain (CH-domain), a sequence motif that is present in all members of the spectrin family, is also present in proteins otherwise unrelated; e.g. filamins or fimbrin. Although spectrin immunologues were detected in plants, fungi and bacteria, the genes coding for true spectrins have not been found to date in these organisms.

LITERATURA

- ADDIS M. F., RAPPELLI P., DELOGU G., CARTA F., CAPPUCCINELLI P., FIORI P. L., 1998. *Cloning and molecular characterization of a cDNA clone coding for Trichomonas vaginalis α -actinin and intracellular localization of the protein*. Infect. Immun. 66, 4924–4931.
- ALCINA A., HARGREAVES A. J., AVILA J., HESKETH J. E., FRESNO M., 1988. *The detection of a spectrin-like protein in Trypanosoma cruzi with a polyclonal antibody*. Cell Biol. Int. Rep. 12, 979–985.
- BARON M. D., DAVISON M. D., JONES P., CRITCHLEY D., 1987. *The sequence of chick α -actinin reveals homologies to spectrin and calmodulin*. J. Biol. Chem. 262, 17623–17629.
- BARSTEAD R. J., KLEIMAN L., WATERSTON R. H., 1991. *Cloning, sequencing and mapping of an alpha-actinin gene from the nematode Caenorhabditis elegans*. Cell Motil. Cytoskel. 20, 69–78.
- BECK K. A., BUCHANAN J. A., MALHOTRA V., NELSON W. J., 1994. *Golgi spectrin: identification of a erythroid beta-spectrin homolog associated with the Golgi complex*. J. Cell Biol. 127, 707–723.
- BECK K. A., BUCHANAN J. A., NELSON W. J., 1997. *Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex*. J. Cell Sci. 110, 1239–1249.
- BEGGS A. H., BYERS T. J., KNOLL J. H., BOYCE F. M., BRUNS G. A., KUNKEL L. M., 1992. *Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11*. J. Biol. Chem. 5, 267, 9281–9288.
- BENNETT V., GILLIGAN D. M., 1993. *The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane*. Annu. Rev. Cell Biol. 9, 27–66.
- BERGHS S., AGGUJARO D., DIRKX R. J. R., MAKSIMOVA E., STABACH P., HERMEL J. M., ZHANG J. P., PHILBRICK W., SLEPNEV V., ORT T., SOLIMENA M., 2000. *BetaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of Ranvier in the central and peripheral nervous system*. J. Cell Biol. 151, 985–1002.

- BIALKOWSKA K., 1995. Współzależność oddziaływań fosfolipidów i ankiryn z spektryną — model ankiryna:PE. Praca doktorska. Uniwersytet Wrocławski.
- BIALKOWSKA K., ZEMBRON A., SIKORSKI A. F., 1994. Ankyrin inhibits binding of erythrocyte spectrin to phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1191, 21–26.
- BIRKENMEIER C. S., GIFFORD E. J., BARKER J. E., 1998. Mouse skeletal muscle alpha-actinin 3. GenBank — AF093775
- BISIKIRSKA B., SIKORSKI A. F., 1997. Some properties of spectrin-like proteins from *Pisum sativum*. *Z. Naturforsch.* 52c, 180–186.
- BISIKIRSKA B., LORENZ M., NIETUBYĆ M., SIKORSKI A. F., 1996. Polypeptides immunologically related to spectrin are present in bacterial cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 1, 171–177.
- BRICHEUX G., COFFE G., PRADEL N., BRUGEROLLE G., 1998. Evidence for an uncommon actinin protein in *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 15, 241–249.
- BYERS T. J., BRANTON D., 1985. Visualization of the protein associated in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6153–6157.
- BYERS T. J., HUSAIN-CHISHTI A., DUBREUIL R.R., BRANTON D., GOLDSTEIN L.S., 1989. Sequence similarity of the amino-terminal domain of *Drosophila* beta spectrin to alpha actinin and dystrophin. *J. Cell Biol.* 109, 1633–1641.
- BYERS T.J., BRANDIN E., LUE R. A., WINOGRAD E., BRANTON D., 1992. The complete sequence of *Drosophila* beta-spectrin reveals supra-motifs comprising eight 106-residue segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6187–6191.
- CHOI E. Z., JEON K. W., 1992. Role of spectrin in *Amoeba proteus*, as studies by microinjection of anti-spectrin monoclonal antibodies. *Exp. Cell Res.* 199, 174–178.
- CIANCI C. D., KIM J. C., MCLAUGHLIN J., STABACH P.R., LOMBARDO C. R., MORROW J. S., 1996. Spectrin isoform diversity and assembly in non-erythroid cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 1, 79–88.
- CIANCI C. D., ZHANG Z., PRADHAN D., MORROW J. S., 1999. Brain and muscle express an unique alternative transcript of II spectrin. *Biochemistry* 38, 15721–15730.
- DAVISON M. D., BARON M. D., CRITCHLEY D. R., WOOLTON J. C., 1989. Structural analysis of homologous repeated domains in alpha-actinin and spectrin. *Int. J. Biol. Macromol.* 11, 81–90.
- DEBANT A., SERRA-PAGES C., SEIFEL K., O'BRIEN S., TANG M., PARK S.H., STREULI M., 1996. The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a kinase domain and has a separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5466–5471.
- DEGOUSSE N., GUPTA G. D., LEW R. R., HEATH I. B., 2000. A putative spectrin-containing membrane skeleton in hyphal tips of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* 30, 33–40.
- DELAUNAY J., 1995. Red cell membrane. Structure and function. *Blood Cell Biochem.* 6, 1–35.
- DEMATTEIS M. A., MORROW J. S., 1998. The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation. *Curr. Op. Cell Biol.* 10, 542–549.
- DEMATTEIS M. A., MORROW J. S., 2000. Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell Biol.*, 113, 2331–2343.
- DERULJTER N., EMONS A. M., 1993. Immunodetection of spectrin antigens in plant cells. *Cell Biol. Int.* 17, 169–182.
- DERULJTER N., ROOK M. B., BISSELING T., EMONS A. M., 1998. Lipochito-oligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. *Plant J.* 13, 341–350.
- DERULJTER N.C., KATELAAR T., BLUMENTHAL S. S., EMONS A. M., SCHEL J. H., 2000. Spectrin-like proteins in plant nuclei. *Cell Biol. Int.* 24, 427–438.
- DESILVA T. M., PENG K. C., SPEICHER, K. D., SPEICHER D. W., 1992. Analysis of human red cell spectrin tetramer (head-to-head) assembly using complementary univalent peptides. *Biochemistry* 31, 10872–10878.
- DEVARAJAN P., MORROW J. S., 1996. The spectrin cytoskeleton and organization of polarized epithelial cell membranes. *Cur. Top. Membr.* 43, 97–128.
- DEVARAJAN P., STABACH P.R., DEMATTEIS M. A., MORROW J. S., 1997. Na,K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in *Madin Darby* canine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10711–10716.
- DUBREUIL R. R., YU J., 1994. Ankyrin and beta spectrin accumulate independently of alpha spectrin in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10285–10289.
- DUBREUIL R. R., GRUSHKO T., 1998. Genetic studies of spectrin: new life for a ghost protein. *Bioessays* 20, 875–878.
- DUBREUIL R. R., BYERS T. J., SILLMAN A. L., BAR-ZVI D., GOLDSTEIN L. S. B., BRANTON D. 1989. The complete sequence of *Drosophila* alpha-spectrin: conservation of structural domains between alpha-spectrins and alpha-actinin. *J. Cell. Biol.* 109, 2197–2205.
- DUBREUIL R. R., BYERS T.J., STEWART C. T., KIEHART D. P. 1990. A beta-spectrin isoform from *Drosophila* (beta H) is similar in size to vertebrate dystrophin. *J. Cell Biol.* 111, 1849–1858.
- DUBREUIL R. R., FRANKEL J., WANG P., HOWRYLAK J., KAPPIL M., GRUSHKO T. A., 1998. Mutations of spectrin and labial block cuprophilic cell differentiation and acid secretion in the middle midgut of *drosophila* larvae. *Dev. Biol.* 194, 1–11.
- DUBREUIL R. R., WANG P., DAHL S., LEE J., GOLDSTEIN L. S., 2000. *Drosophila* beta spectrin functions independently of alpha spectrin to polarize the Na, K ATPase in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 149, 647–656.
- FARADAY C. D., SPANSWICK R. M., 1993. Evidence for membrane skeleton in higher plants. A spectrin-like polypeptides co-isolates with rice plasma membranes. *FEBS Lett.* 318, 313–316.
- GASCARD P., MOHANDAS N., 2000. New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells. *Cur. Op. Hem.* 7, 123–129.
- GIEBELHAUS D. H., ZELUS B. D., HENCHMAN S. K., MOON R. T. 1987. Changes in the expression of alpha-fodrin during embryonic development of *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* 105, 843–853.
- GILLIGAN M. D., BENNETT V., 1993. The junctional complex of the membrane skeleton. *Sem. Hem.* 30, 74–83.
- GODI A., SANTONE I., PERTILE P., DEVARAJAN P., STABACH P. R., MORROW J. S., DITULLIO G., POLISHCHUK R., PETRUCCI T. C., LUINI A., 1998. ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8607–8612.
- GRAMOLINI A. O., JASMIN B. J., 1997. Duchenne Molecular Dystrophy and the neuromuscular junction: the utrophin link. *BioEssays* 19, 747–750.
- GREGORIO C. C., KUBO R. T., BAUKERT R. B., REPASKY E. A., 1992. Translocation of spectrin and protein kinase C to a cytoplasmic aggregate upon lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4947–4951.
- GREGORY S.L., BROWN N.H., 1998. Kakapo, a gene required for adhesion between cell layers in *Drosophila*, encodes a large cytoskeletal linker protein related to plectin and dystrophin. *J. Cell Biol.* 143, 1271–1282.
- GRUM V. L., DONGNING L., MACDONALD R. I., MONDRAGON A., 1999. Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility. *Cell* 98, 523–535.
- HAMMARLUND M., DAVIS W. S., JORGENSEN E. M., 2000. Mutations in alpha-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure. *J. Cell Biol.* 149, 913–942.
- HARTWIG J. H., 1994. Actin binding proteins 1: spectrin superfamily. *Protein Profile* 2, 703–800.
- HAYES N. V., SCOTT C., HEERKENS E., OHANIAN V., MAGGS A. M., PINDER J. C., KORDELI E., BAINES A. J., 2000. Identifi-

- fication of a novel C-terminal variant of *II spectrin*: two isoforms of *II spectrin* have distinct intracellular locations and activities. *J. Cell Sci.* 113, 2023–2034.
- HEMMING N. J., ANSTEE D. J., STARICOFF M. A., TANNER M. J., MOHANDAS N., 1995. Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 270, 5360–5366.
- HEMMINGS L., KUHLMAN P. A., CRITCHLEY D. R., 1992. Analysis of the actin-binding domain of α -actinin by mutagenesis and demonstration that dystrophin contains a functionally homologous domain. *J. Cell Biol.* 116, 1369–1380.
- HOFFMAN E. P., BROWN R. H. JR., KUNKEL L. M., 1987a. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.
- HOFFMAN E. P., KNUDSON C. M., CAMPBELL K. P., KUNKEL L. M., 1987b. Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature* 330, 754–758.
- HOLZINGER A., DE RUIJTER N., EMONS A. M., LUETZ-MEINDL U., 1999. Spectrin-like Proteins in Green Algae (*DESMIDIACEAE*). *Cell Biol. Int.* 23, 335–344.
- HONG W., DOYLE D., 1989. Cloning and analysis of cDNA clones for rat kidney *alpha-spectrin*. *J. Biol. Chem.* 264, 12758–12764.
- HU R. J., WATANABE M., BENNETT V., 1992. Characterization of human brain cDNA encoding the general isoform of *beta-spectrin*. *J. Biol. Chem.* 267, 18715–18722.
- HUEBNER K., PALUMBO A. P., ISOBE M., KOZAK C. A., MONACO S., ROVERA G., CROCE C. M., CURTIS P. J., 1985. The *alpha-spectrin* gene is on chromosome 1 in mouse and man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3790–3793.
- IGA M., INUI M., SOBUE K., 1997. Characterization of the interaction between synapsin I and caldesmon (brain spectrin, fodrin). *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 231, 852–855.
- ISAYAMA T., GOODMAN S. R., ZAGON I. S., 1993. Localization of spectrin isoforms in the adult mouse heart. *Cell Tissue Res.* 274, 127–133.
- ISENBERG G., 1991. Actin-binding proteins — lipid interaction. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 12, 135–144.
- KAHANA E., MARSH P. J., HENRY A. J., WAY M., GRATZER W. B., 1994. Conformation of dystrophin structural repeats. *J. Mol. Biol.* 235, 1271–1277.
- KAMINSKY S. G. W., HEATH I. B., 1995. Integrin and spectrin homologues, and cytoplasm wall adhesion in tip growth. *J. Cell Sci.* 108, 849–856.
- KELLY R. B. 1993. Storage and release of neurotransmitters. *Cell* 72, 43–53.
- KHURANA T. S., WATKINS S. C., KUNKEL L. M., 1992. The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *J. Cell Biol.* 119, 357–366.
- KOENIG M., MONACO A. P., KUNKEL L. M., 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–226.
- KORSGREN C., COHEN C. M., 1988. Association of human erythrocyte band 4.2. Binding to ankyrin and to the cytoplasmic domain of band 3. *J. Biol. Chem.* 263, 10212–10218.
- KOTULA L., LAURY-KLEINTOP L. D., SHOWE L., SAHR K., LINNENBACH A. J., FORGET B., CURTIS P. J., 1991. The exon-intron organization of the human erythrocyte *alpha-spectrin* gene. *Genomics* 9, 131–140.
- KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 1992. 240 kDa immunoanalogue of vertebrate *alpha-spectrin* occurs in *Paramecium* cells. *Cell. Motil. Cytoskel.* 23, 111–121.
- KWIATKOWSKA K., SOBOTA A., 1997. Local accumulation of *alpha-spectrin*-related protein under plasma membrane during capping and phagocytosis in *Acanthamoeba*. *Cell. Motil. Cytoskel.* 36, 253–265.
- LEE J. K., COYNE R., DUBREUIL R. R., GOLDSTEIN L. S. B., BRANTON D., 1993. Cell shape and interaction defects in *alpha-spectrin* mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 123, 1797–1809.
- LEE J.K., BRANDIN E., BRANTON D., GOLDSTEIN L. S. B., 1997. *Alpha-spectrin* is required for ovarian follicle monolayer integrity in *Drosophila melanogaster*. *Development* 124, 353–362.
- LETO T. L., FORTUGNO-ERIKSON D., BARTON D. E., YANG-FENG T. L., FRANCKE U., HARRIS A. S., MORROW J. S., MARCHESI V. T., BENZ E. J. JR., 1988. Comparison of nonerythroid *alpha-spectrin* genes reveals strict homology among diverse species. *Mol. Cell Biol.* 8, 1–9.
- LEUNG C.L., SUN D., ZHENG M., KNOWLES D.R., LIEM R.K., 2001. Microtubule actin cross-linking factor (MACF) a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule skeletons. *J. Cell Biol.* 147, 1276–1286.
- LIAO E. C., PAW B. H., PETERS L. L., ZAPATA A., PRATT S. J., DO C. P., LIESCHKE G., ZON L. I., 2000. Hereditary spherocytosis in zebrafish illustrates evolution of erythroid α -spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. *Development* 127, 5123–5132.
- LORENZ M., 1999. *Spektryna roślin i bakterii*. Praca doktorska. Uniwersytet Wrocławski.
- LORENZ M., BISIKIRSKA B., HANUS-LORENZ B., STRZAIKA K., SIKORSKI A. F., 1995. Proteins reacting with anti-spectrin antibodies are present in *Chlamydomonas* cells. *Cell. Biol. Int.* 19, 625–632.
- MACIAS M. J., MUSACCHIO A., PONSINGI H., NIGLES M., SARASTE M., OSCHKINAT H., 1994. Structure of the pleckstrin homology domain from α -spectrin. *Nature* 369, 675–677.
- MATSUDAIRA P., 1991. Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem. Sci.* 16, 87–92.
- MC KIERNAN A. E., MACDONALD R. I., MACDONALD R. C., AXELROD D., 1997. Cytoskeletal protein binding kinetics at planar phospholipid membranes. *Biophys. J.* 73, 1987–1998.
- MC KEOWN C., PRAITIS V., AUSTIN J., 1998. *Sma-1* encodes a *beta*H-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis. *Development* 125, 2087–2098.
- MCMAHON A. P., GIEBELHAUS D. W., CHAMPION J. E., BAILES J. E., LACEY S., CARRITT B., HENCHMAN S. K., MOON R. T. 1987. cDNA cloning, sequencing and chromosome mapping of a nonerythroid spectrin, human α -fodrin. *Differentiation* 34, 68–78.
- MICHAUD D., GUILLETT G., ROGERS P. A., CHAREST P. M., 1991. Identification of a 220 kDa membrane-associated plant cell protein immunologically related to human α -spectrin. *FEBS Lett.* 294: 77–80.
- MILLAKE D. B., BLANCHARD A. D., PATEL B., CRITCHLEY D. R., 1989. The cDNA sequence of a human placental *alpha-actinin*. *Nucleic Acids Res.* 17, 6725.
- MISHRA L., CAI T., LEVINE A, WENG D, MEZEY E, MISHRA B, GEARHART J., 1998. Identification of *elf1*, a *beta-spectrin*, in early mouse liver development. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 221–224.
- MISHRA L., CAI T., YU P., MONGA S. P. S., MISHRA B., 1999. *Elf3* encodes a novel 200-kDa α -spectrin: role in liver development. *Oncogene.* 18, 353–364.
- MOORTHY S., CHEN L., BENNETT V., 2000. *Caenorhabditis elegans beta-G spectrin* is dispensable for establishment of epithelial polarity, but essential for muscular and neuronal function. *J. Cell Biol.* 149, 915–930.
- MORROW J. S., HAIGH W. B. JR., MARCHESI V. T., 1981. Spectrin oligomers: a structural feature of the erythrocyte cytoskeleton. *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.* 17, 275–287.
- OHARA O., OHARA R., YAMAKAWA H., NAKAJIMA D., NAKAYAMA M., 1998. Characterization of a new α -spectrin gene which is predominantly expressed in brain. *Mol. Brain Res.* 57, 181–192.

- PASCUAL J., CASTRESANA J., SARASTE M., 1997a. *Evolution of the spectrin repeat*. *BioEssays* 19, 811–817.
- PASCUAL J., PFUHL M., WALTHER D., SARASTE M., NIGLES M., 1997b. *Solution structure of the spectrin repeat: a left-handed antiparallel triple-helical coiled-coil*. *J. Mol. Biol.* 273, 740–751.
- PESCARETA T. C., BYERS T. J., DUBREUIL R., KIEHART D. P., BRANTON D., 1989. *Drosophila spectrin: the membrane skeleton during embryogenesis*. *J. Cell Biol.* 108, 1697–1709.
- POLLARD T., 1984. *Purification of a high molecular weight protein from Acanthamoeba that shares antigenic determinants with vertebrate spectrins*. *J. Cell Biol.* 99, 1970–1980.
- REUZEAU C., DOOLITTLE K. W., MCNALLY J. G., PICKARD B. G., 1997. *Covisualisation in living onion cells of putative integrin, putative spectrin, actin, putative intermediate filaments, and other proteins in the cell membrane and in an endome Vicia faba membrane sheath*. *Protoplasma* 199, 173–177.
- SATO O., NONOMURA Y., KIMURA S., MARUYAMA K., 1992. *Molecular shape of dystrophin*. *J. Biochem.* 112, 631–636.
- SCHNEIDER A., LUTZ HU., MARUGG R., GEHR P., SEEBECK T., 1988. *Spectrin-like proteins in the paraflagellar rod structure of Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 90, 307–315.
- SHAHBAKHTI F., GRATZER W. B., 1986. *Analysis of the self-association of human red cell spectrin*. *Biochemistry* 25, 5969–5975.
- SHIMIZU T., TAKAKUWA Y., KOIZUMI H., OHKAWARA A., 1996. *Nonerythroid membrane skeletal proteins in normal and diseased skin*. *Histol. Histopathol.* 11, 495–501.
- SIHAG R. K., SHEA T. B., WANG F.-S., 1996. *Spectrin — actin interaction is required for neurite extension in NB2a/dl neuroblastoma cells*. *J. Neurosci. Res.* 44, 430–437.
- SIKORSKI A. F., 1988. *Oddziaływanie spektryny ze zrębem hydrofobowym błony erytrocytu*. *Acta Univ. Wratisl.* 1057, 1–116.
- SIKORSKI A. F., TERLECKI G., ZAGON I. S., GOODMAN S. R., 1991. *Synapsin I — mediated interaction of brain spectrin with synaptic vesicles*. *J. Cell Biol.* 114, 313–318.
- SIKORSKI A. F., BIAŁKOWSKA K., BISI-KIRSKA B., SZOPA J., 1993. *Spektryny erytrocytarna i nieerytrocytarne — struktura i funkcje*. *Post. Biochemii* 39, 50–60.
- SIKORSKI A. F., SWAT W., BRZEZIŃSKA M., WRÓBLEWSKI Z., BISI-KIRSKA B., 1993. *A protein cross-reacting with anti-spectrin antibodies is present in higher plant cells*. *Z. Naturforsch.* 48c, 580–583.
- SIKORSKI A. F., HANUS-LORENZ B., JEZERSKI A., DLUZEWSKI A. R., 2000a. *Interaction of membrane skeletal proteins with membrane lipid domain*. *Acta Biochim. Polon.* 47, 565–578.
- SIKORSKI A. F., SANGERMAN J., GOODMAN S. R., CRITZ S. D., 2000b. *Spectrin (SpII) is an essential component of synaptic transmission*. *Brain Res.* 852, 161–166.
- SPEICHER D. W., MARCHESI V. T., 1984. *Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments*. *Nature* 311, 177–180.
- SPEICHER D. W., WEGLARZ L., DESILVA T. M., 1992. *Properties of human red cell spectrin heterodimer (site-to-site) assembly and identification of an essential nucleation site*. *J. Biol. Chem.* 267, 14775–14782.
- STABACH P. R., MORROW J. S., 2000. *Identification and characterization of V spectrin, a mammalian ortholog of Drosophila beta H spectrin*. *J. Biol. Chem.* 275, 21385–21395.
- STANKEWICH M. C., TSE W. T., PETERS L. L., CHNG Y., JOHN K. M., STABACH P. R., DEVARAJAN P., MORROW J. S., LUX S. E., 1998. *A widely expressed III spectrin associated with Golgi and cytoplasmic vesicles*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14158–14163.
- STEINER J. P., BENNETT V., 1988. *Ankyrin — independent membrane protein — binding sites for brain and erythrocyte spectrin*. *J. Biol. Chem.* 263, 14417–14425.
- STEVEN R., KUBISESKI T. J., ZHENG H., KULKARNI S., NANCILLAS J., RUIZ MORALES J., HOGUE C. W., PAWSON T., CULOTTI J., 1998. *Unc 73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in C. elegans*. *Cell* 92, 785–795.
- THOMAS G. H., 1998. *Molecular evolution of spectrin repeats*. *BioEssays* 20, 600.
- THOMAS G. H., NEWBERN E. C., KORTE C. C., BALES M. A., MUSE S. V., CLARK A. G., KIEHART D. P., 1997. *Intragenic duplication and divergence in the spectrin superfamily of proteins*. *Mol. Biol. Evol.* 14, 1285–1295.
- UPENDER M., GALLAGHER P. G., MOON D. C., WARD D. C., FORGET B. G., 1994. *Localization of human α -fodrin gene to 9q33-q34 by fluorescence in situ hybridization*. *Cytogenet. Cell Genet.* 66, 39–41.
- WAITES G. T., GRAHAM I. R., JACKSON P., MILLAKE D. B., PATEL B., BLANCHARD A. D., WELLER P. A., EPERON I. C., CRITCHLEY D. R., 1992. *Mutually exclusive splicing of calcium-binding domain exons in chick α -actinin*. *J. Biol. Chem.* 267, 6263–6271.
- WASENIUS V. M., SARASTE M., SALVEN P., ERAMAA M., HOLM L., LEHTO V. P., 1989. *Primary structure of the brain α -spectrin*. *J. Cell Biol.* 108, 79–93.
- WINKELMANN J. C., FORGET B. G., 1993. *Erythroid and non-erythroid spectrins*. *Blood* 81, 3173–3185.
- WINKELMANN J. C., CHANG J. G., TSE W. T., SCARPA A. L., MARCHESI V. T., FORGET B. G., 1990. *Full-length sequence of the cDNA for human erythroid α -spectrin*. *J. Biol. Chem.* 265, 11827–11832.
- WITKE W., NOEGEL A. A., 1990. *A single base exchange in an intron of the Dictyostelium discoideum α -actinin gene inhibits correct splicing of the RNA but allows transport to the cytoplasm and translation*. *J. Biol. Chem.* 265, 34–39.
- YAN Y., WINOGRAD E., VIEL A., CRONIN T., HARRISON S. C., BRANTON D., 1993. *Crystal structure of the repetitive segments of spectrin*. *Science* 162, 2027–2033.
- ZAGON I. S., HIGBEE R., RIEDERER B. M., GOODMAN S. R., 1986. *Spectrin subtypes of mammalian brain: an immunoelectron microscopic study*. *J. Neurosci.* 6, 2977–2986.
- ZIMMER W. E., ZHAO Y., SIKORSKI A. F., CRITZ S. D., SANGERMAN J., ELFERINK L. A., XU S., GOODMAN S. R., 2000. *The domain of brain α -spectrin responsible for synaptic vesicle association is essential for synaptic transmission*. *Brain Res.* 88, 18–27.