

KATARZYNA ROSZEK i JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA

Zakład Biochemii

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej

Uniwersytet Mikołaja Kopernika

Gagarina 7, 87-100 Toruń

e-mail: jgsz@biol.uni.torun.pl

BUDOWA I FUNKCJE BIAŁEK BŁONY LIZOSOMALNEJ

Lizosomy to subkomórkowe organelle o strukturze pęcherzykowej otoczone pojedynczą dwuwarstwą lipidową. Po raz pierwszy opisane zostały w latach 1949-1955 przez Christiana De Duve. Zawierają zestaw co najmniej 50 enzymów hydrolitycznych aktywnych w niskim pH, umożliwiających degradację większości makrocząsteczek (BOWERS 1998).

Powszechnie uważa się lizosomy za końcowy przedział w szlaku niespecyficznej degradacji materiału zewnątrzkomórkowego (endocytoza absorpcyjna, receptorozależna, fluidalna) i wewnątrzkomórkowego (krinofagia, makroautofagia, mikroautofagia) (KORNFELD i MELLMAN 1989; HUNZIKER i GEUZE 1996; CUERVO i DICE 1998; LUZIO i współaut. 2000, 2001). Procesy te w uproszczeniu przedstawiono na Ryc. 1.

Ostatnio wykazano, iż w lizosomach zachodzi również specyficzna proteoliza określonych białek cytosolowych. Ten sposób degradacji uruchamiany jest jednak tylko w niektórych tkankach, w warunkach długotrwałego głodu lub stresu (CUERVO i DICE 1996; CUERVO i współaut. 1995, 1997, 1998).

Lizosomy różnych komórek i tkanek mogą także uczestniczyć w sekrecji zgromadzonego materiału poza komórkę (STINCHCOMBE i GRIFFITHS 1999, ANDREWS 2000). Fuzja lizosomów z błoną komórkową i opróżnienie pęche-

ryzka do przestrzeni zewnątrzkomórkowej zachodzi np. w odpowiedzi na podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} i jest sposobem naprawy uszkodzeń błony komórkowej (MARTINEZ i współaut. 2000, REDDY i współaut. 2001).

Ze względu na szczególne funkcje lizosomu, błona go otaczająca charakteryzuje się specyficznymi właściwościami. Jej struktura musi efektywnie zabezpieczać pozostałe przedziały subkomórkowe oraz samą błonę przed hydrolazami zgromadzonymi we wnętrzu lizosomu. Integralne glikoproteiny błonowe pełnią rolę strukturalną i ochronną, a niektóre z nich funkcjonują jako receptory. Te ostatnie uczestniczą, między innymi, w rozpoznaniu i dostarczaniu do lizosomów materiału przeznaczonego do specyficznej degradacji białek (CUERVO i DICE 1998).

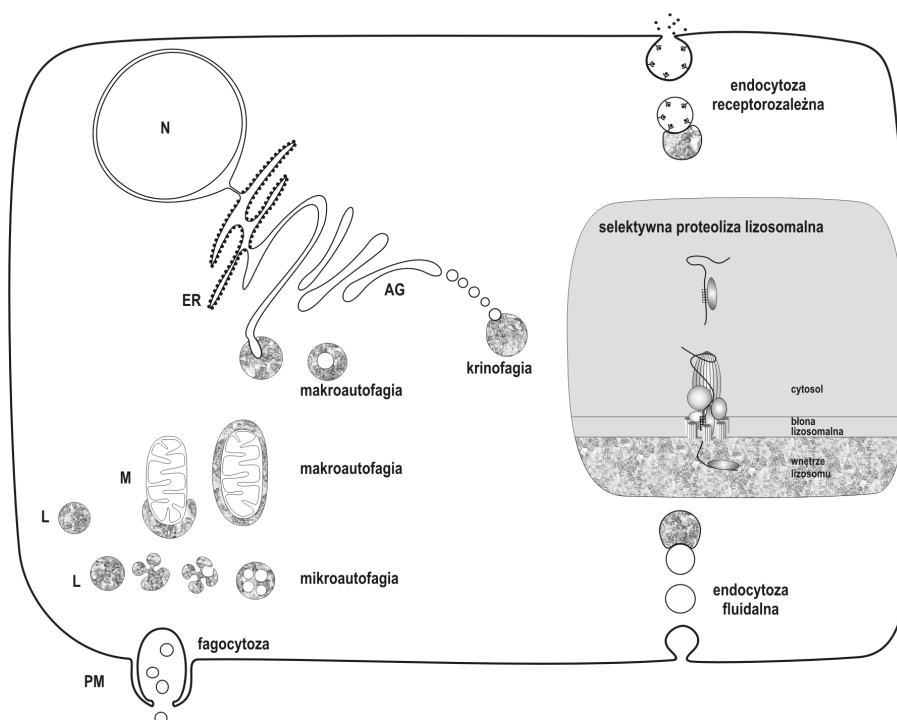
Dzięki obecności białek tworzących pompę protonową, błona lizosomalna uczestniczy w utrzymaniu kwaśnego pH wnętrza lizosomu, a tym samym stwarza właściwe środowisko dla działania enzymów hydrolitycznych (BOWERS 1998).

Białka błonowe o charakterze transporterów pośredniczą w „opróżnianiu” lizosomów z produktów degradacji. Niektóre z nich mają również charakter glikoprotein. Cechuje je wysoka specyficzność względem związków ni-

Hsp – białko szoku termicznego, Hsc – białko pokrewne Hsp, lamp, limp – integralne białka błony lizosomu, lgp – glikoproteina lizosomalna

skocząsteczkowych takich jak aminokwasy, nukleozydy, cukrowce, jony, witaminy itp. (MANCINI i współaut. 2000).

W niniejszym artykule omówiona zostanie budowa i funkcja kilku białek błony lizosomalnej.



Ryc. 1. Udział lizosomów w procesach wewnątrzkomórkowej degradacji makromolekuł.

N – jądro komórkowe, M – mitochondrium, L – lizosom, ER – siateczka śródplazmatyczna, AG – aparat Golgiego, PM – błona plazmatyczna.

POMPA PROTONOWA

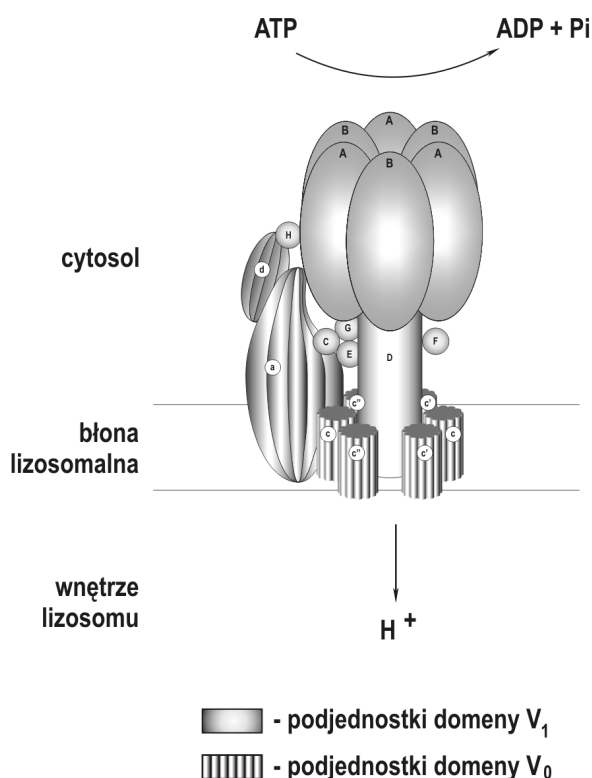
Wytworzenie i utrzymanie niskiego pH wnętrza lizosomu jest wynikiem ustalenia się dynamicznej równowagi pomiędzy zależnym od ATP transportem jonów H^+ do światła organelli a biernym ich wypływem w ramach wymiany z jonami jednowartościowymi, np. K^+ , napływającymi z cytosolu (ZHANG i współaut. 2000, SCHOONDERWOERT i MARTENS 2001).

Błona lizosomu w warunkach fizjologicznych jest przepuszczalna dla jonów jednowartościowych, takich jak K^+ czy Na^+ , natomiast praktycznie nie przepuszczalna dla jonów H^+ . Badania ZHANG i współaut. (2000) przeprowadzone na izolowanych lizosomach, wykazały wzrost przepuszczalności błony lizosomalnej dla H^+ wraz ze wzrostem jej płynności *in vitro*. Nie wiadomo jednak jeszcze dokładnie jakie czynniki powodują w warunkach fizjologicznych zmianę przepuszczalności błony dla jonów H^+ .

Zależny od ATP transport protonów do wnętrza lizosomu możliwy jest dzięki obecno-

ści w błonie lizosomalnej pompy protonowej należącej do rodziny wakuolarnych H^+ -ATPaz (ang. v-type H^+ -ATPase, V-ATPase), obecnych m. in. w cysternach aparatu Golgiego, endosomach i pęcherzykach opłaszczonych klatryną większości komórek eukariotycznych oraz w wakuolach komórek drożdży i roślin (ARAI i współaut. 1993, FINBOW i HARRISON 1997, FORGAC 1999, SCHOONDERWOERT i MARTENS 2001). V-ATPaza błony lizosomalnej jest enzymem wielopodjednostkowym z dwiema podstawowymi domenami – cytosolową V_1 oraz zakotwiczoną w błonie V_0 (FINBOW i HARRISON 1997, SCHOONDERWOERT i MARTENS 2001) (Ryc. 2).

Domena cytosolowa V_1 , o masie cząsteczkowej około 840 kDa, wykazuje aktywność katalityczną względem ATP pochodzącego głównie z cytosolu. Domenę tą buduje osiem różnych podjednostek oznaczonych literami od A do H (Tabela 1). Podjednostki A i B tworzą tak zwaną



Ryc. 2. Model struktury V-ATPazy błony lizosomalnej (wg FORGACA 1999, FINBOW i HARRISONA 1997, SCHOONDERWOERTA i MARTENSA 2001, zmodyfikowana).

„główkę” odpowiedzialną za wiązanie i hydroлизę ATP, przy czym jedynie podjednostka A wy-

kazuje aktywność katalityczną (FORGAC 1999). Pozostałe podjednostki domeny V₁ wchodzi w skład części łączącej „główkę” z domeną błonową V₀.

Na domenę V₀, o masie cząsteczkowej 260 kDa, składa się pięć różnych podjednostek (oznaczonych a, c, c', c'' oraz d). Podjednostki c, c' i c'' są silnie hydrofobowymi, transbłonowymi proteolipidami o wysokim stopniu konserwatywności (FINBOW i HARRISON 1997, FORGAC 1999). Tworzą one kanał w błonie lizosomalnej, umożliwiającą translokację protonów do wnętrza lizosomu. Hydroliza jednej cząsteczki ATP umożliwia translokację dwóch lub trzech jonów H⁺ (FINBOW i HARRISON 1997).

Skład podjednostkowy i stechiometria domeny V₀ i V₁ różnią się nieznacznie w zależności od pochodzenia enzymu (ARAI i współaut. 1993, SCHOONDERWOERT i MARTENS 2001).

Aktywność oczyszczonej V-ATPazy uzyskanej z lizosomów wątroby szczura jest zależna od obecności jonów Mg²⁺. Hydroliza ATP zachodzi optymalnie w pH 7.0–8.0. Oczyszczony enzym jest aktywowany przez aniony takie jak Cl, Br i F oraz hamowany przez NO₃⁻. Inhibitorami aktywności H⁺-ATPazy błony lizosomu są też bafilomycyna A₁, która jest selektywnym, wysoce specyficznym inhibitorem wakuolarnych ATPaz oraz związki reagujące z grupami –SH, np. NEM (ang. N-ethylmaleimide, imid kwasu jabłkowego) (ARAI i współaut. 1993,

Tabela 1. Skład podjednostkowy V-ATPazy (wg FINBOWA i HARRISONA 1997, FORGACA 1999, SCHOONDERWOERTA i MARTENSA 2001, zmodyfikowana).

Domena	Podjednostka	Masa cząsteczkowa (kDa)*	Funkcje
V ₁	A	73	wiązanie i hydroliza ATP
	B	58	wiązanie ATP
	C	40	asocjacja podjednostek, łączenie domen V ₁ i V ₀
	D	34	
	E	33	
	F	14	
	G	15	
	H	50	regulacja aktywności ATPazy (?)
V ₀	a	100	współdział w transporcie protonów, miejsce wiązania bafilomycyny
	c	17	translokacja protonów
	c'	17	
	c''	19	
	d	38	nieznane

*podane masy cząsteczkowe odnoszą się do podjednostek enzymu izolowanego z pęcherzyków opłaszczonych klatryną z komórek mózgu wołu

FINBOW i HARRISON 1997). Wysoka selektywność działania powyższych inhibitorów pozwala na odróżnienie V-ATPazy od ATPazy mitochondrialnej, należącej do rodziny F-ATPaz. Mechanizm translokacji protonów przez błonę lizosomu jest podobny jak w innych pompach protonowych i opiera się na rotacyjnych zmianach konformacji podjednostek ATPazy (FINBOW i HARRISON 1997, FORGAC 1999).

Ze względu na funkcję V-ATPazy w fizjologii komórek, pompa protonowa w błonie lizosomu (i nie tylko) wymaga precyzyjnej regulacji. Jednym z proponowanych mechanizmów regulacyjnych jest odwracalna inaktywacja enzymu poprzez tworzenie mostków dwusiarczkowych pomiędzy resztami cysteiny w pozycji 254 i 532 w obrębie podjednostki katalitycznej A (FORGAC 1999, SCHOONDERWOERT i MARTENS 2001).

W komórkach eukariotycznych odnajdywano często pojedyncze podjednostki lub całe domeny V_0 i V_1 (ARAI i współaut. 1993, SCHOONDERWOERT i MARTENS 2001), co może wskazywać na możliwość asocjacji i dysocjacji tych elementów jako sposobu regulacji aktywności. Domena V_0 odłączona od elementu V_1 nie jest zdolna do translokacji protonów, a wyizolowana z cytosolu domena V_1 nie wykazuje również zdolności hydrolizowania ATP (FINBOW i HARRISON 1997).

Efektywność przenoszenia protonów przez V-ATPazę może być także kontrolowana przez wewnętrzne pH lizosomu. Im niższa war-

tość pH, tym więcej podjednostek c przyjmuje konformację uniemożliwiającą translokację protonów, co znacznie obniża efektywność „pompowania” protonów (SCHOONDERWOERT i MARTENS 2001). W przypadku wakuol roślinnych stwierdzono, iż znacząca (4–5 jednostek) różnica pomiędzy wartością pH cytosolowego i luminalnego powoduje spadek ilości przenoszonych protonów do średnio 1.75 H^+ na jedną cząsteczkę zhydrolizowanego ATP (patrz FINBOW i HARRISON 1997). Oprócz wyżej wymienionych modeli regulacji czynności ATP-azy, niewątpliwie istnieje jeszcze szereg innych mechanizmów.

Wyniki badań z ostatnich lat wskazują, iż w lizosomach funkcjonuje jeszcze inny układ umożliwiający powstanie gradientu protonowego i napływ jonów H^+ do wnętrza lizosomu. W błonie lizosomu wykryto obecność przenośników elektronów, między innymi cytochromu b i ubichinonu, tworzących łańcuch reakcji utleniania i redukcji. Substratem w tych reakcjach jest NADH, który ulega utlenieniu po stronie cytosolowej błony lizosomalnej, stając się źródłem jonów H^+ (GILLE i NOHL 2000). Powstający gradient protonów i ich napływ do wnętrza lizosomu prowadzi do obniżenia wewnątrzlizosomalnego pH. Być może jest to mechanizm ważniejszy i efektywniejszy od transportu protonów zachodzącego z udziałem H^+ -ATPazy, ponieważ nie wymaga dostarczania ATP z pozalizosomalnych źródeł (NOHL i GILLE 2001).

GLIKOPROTEINY LIZOSOMALNE

Glikoproteiny błony lizosomalnej (ang. lysosomal membrane glycoproteins, lgps) stanowią 50% wszystkich białek w błonie lizosomu (cyt. za WINCHESTER 2001). Ze względu na strukturę łańcucha polipeptydowego oraz komponentu cukrowcowego zostały podzielone na dwie rodziny: białka lamp (ang. lysosome-associated membrane protein) o masie cząsteczkowej 90–120 kDa oraz białka limp (ang. lysosomal integral membrane protein) o masie cząsteczkowej 30–85 kDa (HUNZIKER i GEUZE 1996) (Ryc. 3).

Najlepiej poznane glikoproteiny rodziny lamp – lamp1 (nazywane też lgp A) i lamp2 (nazywane lgp B), są kodowane przez odrębne lecz ewolucyjnie spokrewnione geny. W obrębie lamp2 zidentyfikowano trzy izoformy (nazywane a, b i c) wykazujące znaczne podobie-

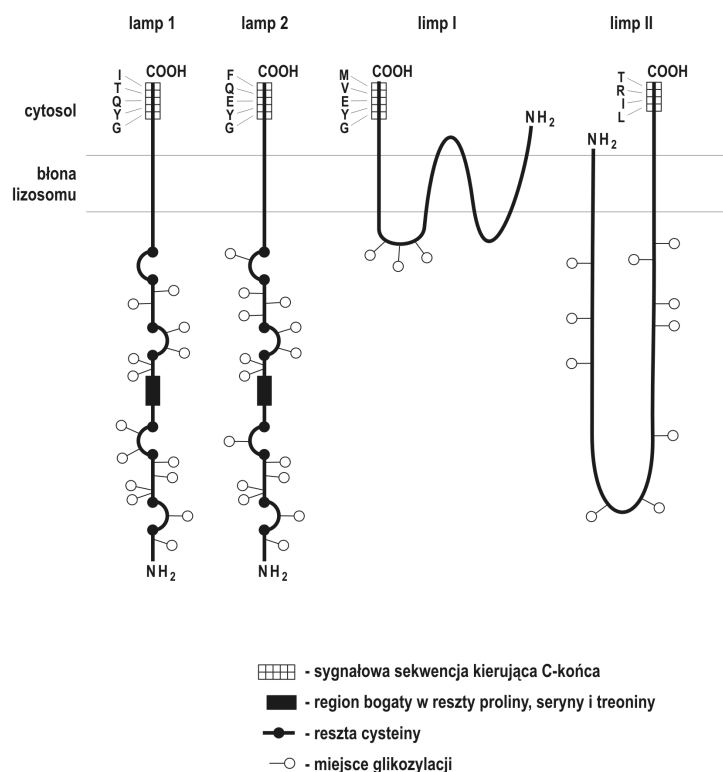
ństwo sekwencji aminokwasów w regionie luminalnym (HUNZIKER i GEUZE 1996, CUERVO i DICE 2000b). Białka lamp występują głównie w błonie lizosomalnej, choć pewne formy odnajdywano także w świetle lizosomu (JADOT i współaut. 1996, 1997, CUERVO i DICE 2000c).

Glikoproteiny rodziny lamp wykazują znaczne podobieństwo w budowie. Dominującym elementem jest silnie glikozylowana domena N-końcowa zwrócona do światła pęcherzyka lizosomalnego. Pojedynczy region transbłonowy zbudowany jest z około 20 aminokwasów. Cytosolowa domena C-końca składa się z 10–12 reszt aminokwasów, z których część to sygnałowa sekwencja sortująca warunkująca właściwe kierowanie białka do lizosomu (KORNFELD i MELLMAN 1989, HUNZIKER i GEUZE 1996).

Podobnie jak wszystkie glikoproteiny w komórce, również lamp i limp ulegają potranslacyjnej obróbce w aparacie Golgiego. Do miejsca przeznaczenia docierają prawdopodobnie drogą bezpośredniego sortowania w regionie trans aparatu Golgiego i transportu pęcherzykowego przy udziale klatryny i białek adaptorowych AP (HUNZIKER i GEUZE 1996). W proces ten zaangażowane są pęcherzyki odmienne

MELLMAN 1989, HUNZIKER i GEUZE 1996, WINCHESTER 2001). Sekwencje te rozpoznawane są przez odpowiednie jednostki białek adaptorowych, co inicjuje ukierunkowany transport glikoprotein (MARKS i współaut. 1996, KIRCHHAUSEN i współaut. 1997).

Rola glikoprotein błon lizosomalnych nie jest jeszcze w pełni poznana. Wiadomo, iż różne formy białek lamp ulegają wybiórczej eks-



Ryc. 3. Struktura glikoprotein błony lizosomalnej (wg KORNFELDA i MELLMANA 1989, HUNZIKERA i GEUZE 1996, zmodyfikowana).

od tych, które transportują rozpuszczalne białka oznakowane ugrupowaniem mannozo-6-fosforanowym (KARLSSON i CARLSSON 1998). Sposób pośredni to droga sekrecyjna polegająca na transporcie i wbudowaniu glikoprotein do błony komórkowej z następującym transportem do endosomów i lizosomów (KORNFELD i MELLMAN 1989, HUNZIKER i GEUZE 1996).

Prawidłowe kierowanie lamp i limp zapewniają sygnałowe sekwencje sortujące w regionie cytosolowym białek: motyw zawierający resztę tyrozyny w układzie YXXΦ (gdzie X oznacza dowolny aminokwas, Φ – aminokwas z rozbudowaną domeną hydrofobową) dla białek lamp1, lamp2 i limpI oraz motyw dileucynowy LL dla białek limpII (KORNFELD i

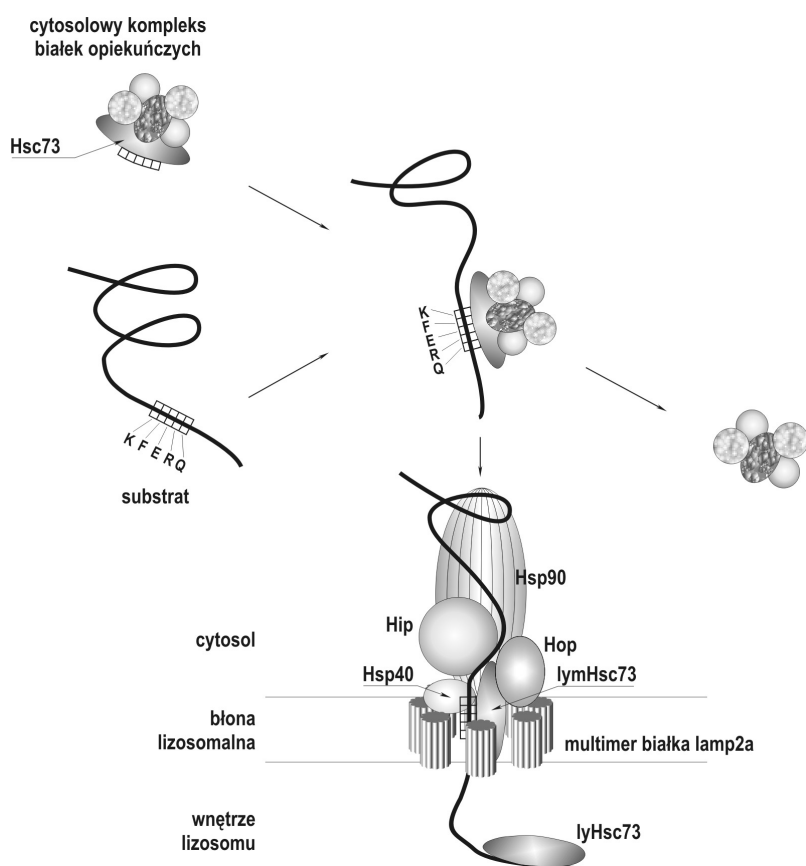
presji w określonych typach tkanek, co wskazuje na specyficzność ich działania (CUERVO i DICE 2000c). Udokumentowana jest, jak do tej pory, ich rola w ochronie błony lizosomu przed hydrolitycznym działaniem enzymów lizosomalnych (KORNFELD i MELLMAN 1989, HUNZIKER i GEUZE 1996, KUNDRA i KORNFELD 1999). W ostatnim czasie wyjaśniona została stosunkowo dobrze rola glikoproteiny lamp2a w selektywnej proteolizie białek cytosolowych zachodzącej w lizosomach w warunkach stresu i głodu. Proces ten przebiega z udziałem białek szoku termicznego (chaperonów, białek opiekuńczych) i nazywany jest autofagią zależną od białek opiekuńczych (ang. chaperone mediated autophagy).

GLIKOPROTEINA LAMP2A W SPECYFICZNEJ DEGRADACJI BIAŁEK CYTOSOLOWYCH

Substratami dla lizosomalnej degradacji specyficznej są białka cytosolowe, zawierające pentapeptyd KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) pełniący funkcję sekwencji kierującej do lizosomu. Około 30% białek cytosolowych posiada motyw KFERQ, a więc potencjalnie mogą one być substratami w procesie specyficznej degradacji (patrz CUERVO i współaut. 1998).

Przykładem białek z powyższym motywem są: rybonukleaza A, dehydrogenaza 3-fosfogliceroaldehydu (CUERVO i DICE 1996) oraz inne enzymy glikolityczne, czynniki transkrypcyjne (ANIENTO i współaut. 1996) i ich regulatory

nosi 45 kDa, co w zestawieniu z masą cząsteczkową 96 kDa wskazuje na znaczną zawartość reszt cukrowych w strukturze tej glikoproteiny. Najbardziej rozbudowana część białka receptorowego to silnie glikozylowana domena luminalna, stanowiąca N-koniec polipeptydu. Krótki, cytosolowy C-koniec zbudowany jest zaledwie z 12 aminokwasów, których część tworzy sygnałową sekwencję sortującą zawierającą resztę tyrozyny i odpowiedzialną za prawidłowe kierowanie glikoproteiny lamp2a do lizosomu (CUERVO i DICE 1996). Domena C-koncowa uczestniczy także w rozpoznawaniu



Ryc. 4. Model transportu białek cytosolowych do lizosomu (wg CUERVO i DICE 2000a, AGARRABERESA i DICE 2001b, zmodyfikowana).

(CUERVO i współaut. 1998), a także podjednostki proteasomu (CUERVO i współaut. 1995).

Za prawidłowe rozpoznanie białek objętych procesem specyficznej degradacji i ich transport do wnętrza lizosomu odpowiedzialna jest integralna glikoproteina błony lizosomalnej – lamp2a (lgp96) o masie cząsteczkowej 96 kDa oraz białka szoku termicznego.

Masa cząsteczkowa glikoproteiny lamp2a określona na podstawie sekwencji cDNA wy-

substratów przeznaczonych do degradacji czyli białek z sekwencją KFERQ (CUERVO i DICE 2000b). Schemat budowy glikoprotein rodziny lamp2 przedstawia Ryc. 3.

Glikoproteina lamp2a może polimeryzować z wytworzeniem form tetra-, okta- i multimerycznych, co sugeruje możliwość tworzenia w błonie lizosomu kanałów o różnej średnicy ułatwiających transport białek (patrz CUERVO i DICE 2000b).

Populacje lizosomów wyodrębnione z wątroby szczura, szczególnie aktywnie uczestniczące w selektywnej degradacji białek cytosolowych z sekwencją KFERQ, wyróżniały się zwiększoną zawartością białka lamp2a (CUERVO i DICE 2000b), a także były bogate w białko szoku termicznego Hsc73. Cytosolowe białko Hsc73, syntetyzowane konstytutywnie, jest niezbędne dla rozpoznania sekwencji KFERQ na drodze ATP-zależnej (AGARRABERES i DICE 2001a) oraz dla rozkładowania substratu przeznaczonego do degradacji, co umożliwia jego przejście przez błonę lizosomalną (SALVADOR i współaut. 2000).

Oprócz cytosolowego białka Hsc73 istnieją jeszcze dwie izoformy obecne odpowiednio w świetle lizosomu (tzw. ly-Hsc73) i w błonie lizosomalnej od strony cytosolu (tzw. lym-Hsc73) (TERLECKY i DICE 1993, AGARRABERES i DICE 2001b). Białka te są niezbędne dla wspomagania translokacji substratu do wnętrza lizosomu (CUERVO i współaut. 1997, AGARRABERES i współaut. 1997). Wyższa zawartość lizosomalnych form białka Hsc73 w lizosomach z wysokim poziomem selektywnej degradacji jest wynikiem zwiększonej jego internalizacji z cytosolu i obniżonej degradacji (CUERVO i współaut. 1997).

Najnowsze badania wskazują ponadto na udział szeregu innych białek szoku termicznego w procesie specyficznej degradacji białek w lizosomach (CUERVO i DICE 2000a; AGARRABERES i DICE 2001a, b). Na cytosolowej powierzchni błony lizosomalnej oprócz białka lym-Hsc73 funkcjonuje kompleks białek opiekuńczych, nieodzowny dla translokacji substratu (białek przeznaczonych do degradacji) przez błonę lizosomu. W skład kompleksu wchodzi białko Hsp40 wzmacniające aktywność ATP-azową cytosolowego białka Hsc73, co ułatwia identyfikację substratu z sekwencją KFERQ. Kolejne białka kompleksu to Hsp90, Hip (ang. Hsc73 interacting protein) oraz Hop (ang. Hsc73-Hsp90 organizing protein), które stabilizują połączenie kompleksów Hsc73 z substratem kierowanym do lizosomów.

Hipotetyczny model transportu białek cytosolowych do lizosomu przedstawiono na Ryc.4 (patrz CUERVO i DICE 2000a, AGARRABERES i DICE 2001b). Sekwencja wydarzeń prowadząca do degradacji polega na rozpoznaniu cytosolowego białka z sekwencją KFERQ przez cytosolową formę Hsc73, które przy współudziale innych białek opiekuńczych two-

rzy aktywny kompleks. Kolejny etap prowadzi do rozkładowania białka i wytworzenia konformacji optymalnej dla translokacji. Na cytosolowej powierzchni błony lizosomu białko w kompleksie z Hsc73 zostaje rozpoznane przez receptor lamp2a i przy udziale dodatkowych białek opiekuńczych lym-Hsc73, Hsp40, Hsp90, Hip oraz Hop przechodzi przez błonę lizosomalną. Od strony światła lizosomu translokację wspomaga białko ly-Hsc73.

Regulacja specyficznej degradacji białek wewnątrz lizosomów odbywa się między innymi poprzez regulowanie poziomu białka lamp2a w błonie lizosomu. Ogólna zawartość białka lamp2a w błonie lizosomalnej wynosi 5,8 μ g na 100 μ g białek błonowych i jest skorelowana z poziomem autofagii zachodzącej z udziałem białek opiekuńczych (CUERVO i DICE 1996, 1998, 2000c). Badania CUERVO i DICE (1996) potwierdziły, iż wzrost poziomu ekspresji lamp2a w fibroblastach ludzkich powoduje zwiększenie wydajności szlaku specyficznej proteolizy. Zmiany w zawartości glikoproteiny lamp2a w błonie lizosomu zależą od jej odporności na degradację oraz od dystrybucji pomiędzy błoną a wnętrzem lizosomu (JADOT i współaut. 1996, 1997). W warunkach stresu rośnie odporność lamp2a na degradację, wskutek czego wzrasta wydajność autofagii z udziałem białek opiekuńczych. Ponadto transport substratów przez błonę lizosomu przy udziale lamp2a powoduje częściową internalizację tej glikoproteiny do światła lizosomu, a dzięki procesowi reinsercji receptor powraca do błony lizosomalnej (CUERVO i DICE 2000c). W populacjach lizosomów z wysoką aktywnością proteolizy specyficznej aż 78% lamp2a znajduje się w błonie, a 22% we wnętrzu lizosomu, natomiast w lizosomach z niską aktywnością tego procesu tylko 57% lamp2a pozostaje w błonie lizosomu, a 43% obecne jest w jego wnętrzu (CUERVO i DICE 2000b). Wynika stąd, iż internalizacja i reinsercja glikoproteiny lamp2a jest jednym z mechanizmów regulujących poziom procesu specyficznej proteolizy białek cytosolowych z sekwencją KFERQ.

Zaangażowanie w interakcję z substratem cytosolowej i lizosomalnej formy Hsc73 oraz glikoproteiny lamp2a może być sposobem potrójnej kontroli prawidłowości wyboru białka przeznaczonego do degradacji. Kontrola taka pozwala komórce ustrzec się przed przypadkową proteolizą białek istotnych dla jej funkcjonowania (AGARRABERES i DICE 2001b).

BIAŁKA BŁONY LIZOSOMALNEJ W ROLI TRANSPORTERÓW METABOLITÓW I JONÓW

Hydroliza makrocząsteczek w obrębie lizosomu prowadzi do powstania wielu prostych związków, które mogą być wykorzystane przez komórkę. Specyficzna hydroliza białek, zachodząca w szczególności w warunkach głodu, chroni białka szczególnie ważne metabolicznie i równocześnie dostarcza substraty dla przemian energetycznych. Słabo przepuszczalna błona lizosomalna nie pozwala na uwolnienie większości produktów degradacji, niemniej jednak przedostają się one do cytosolu. Pokonanie bariery błony lizosomalnej umożliwiają specyficzne nośniki, będące integralnymi białkami błonowymi (patrz LLOYD 2000). Tworzą one systemy transportujące jony, substancje i związki niskocząsteczkowe przez błonę lizosomu. Znanych jest około 20 systemów transportujących, kilka z nich dokładnie poznano i scharakteryzowano (MANCINI i współaut. 2000, WINCHESTER 2001).

Za eksport cystyny z lizosomów do cytosolu odpowiedzialne jest białko cystynozyna (MANCINI i współaut. 2000). Wykazuje ono lokalizację identyczną z glikoproteinami rodziny lamp2. Prawidłowe funkcjonowanie transportu cystyny stymulowane jest ponadto przez kwaśne pH wnętrza lizosomu, transport ten jest więc pośrednio zależny od ATP (KALATZIS i współaut. 2001). Cystynozyna została wyizolowana z różnych źródeł, między innymi z komórek wątroby szczura i ludzkich erytrocytów (MANCINI i współaut. 2000).

Uzyskanie cDNA z komórek ludzkich pozwoliło na poznanie struktury cystynozyny. Białko zbudowane jest z 367 aminokwasów z kilkoma funkcjonalnymi domenami. Domena N-końcowa zawiera 7 miejsc potencjalnej glikozylacji. Tuż za nią znajduje się odcinek transbłonowy, który siedmiokrotnie przechodzi przez błonę lizosomu. W obrębie 10 reszt aminokwasowych tworzących domenę C-końca znajduje się sygnałowa sekwencja sortująca GYDQL oparta na tyrozynie, niezbędna dla właściwego kierowania białka do lizosomów (MANCINI i współaut. 2000, KALATZIS i współaut. 2001). Prawidłowe dotarcie cystynozyny do miejsca przeznaczenia zależne jest także od współudziału dodatkowego motywu – YFPQA, zlokalizowanego w obrębie jednej z pętli cytosolowych białka. Motyw ten nie przypomina żadnej z dotychczas poznanych sekwencji sortujących, chociaż kluczową rolę odgrywa w nim również reszta tyrozyny. Prawdo-

podobnie rozpoznawany jest przy udziale białek adaptorowych AP, ale nie wiadomo dokładnie w jaki sposób zapewnia kierowanie do lizosomu (CHERQUI i współaut. 2001).

Sialina odpowiada w błonie lizosomalnej za transport poza lizosom kwasu siałowego i kwaśnych monosacharydów (MANCINI i współaut. 2000). Dowiedziono, że może też pośredniczyć w transporcie kwasów mono- i dikarboksylovych, a także stanowi uniwersalny przenośnik anionów (HAVELAAR i współaut. 1998b, 1999).

Sialina jest białkiem zbudowanym z 495 reszt aminokwasów, jej masa cząsteczkowa przewidziana na podstawie sekwencji cDNA wynosi 53 kDa (nie uwzględnia komponentu cukrowcowego). Domeny N-końcowa i C-końcowa zwrócone są do cytosolu. Odcinek transbłonowy przechodzi przez błonę 12 razy, a na utworzonych w ten sposób pętlach luminalnych znajduje się 6 miejsc potencjalnej glikozylacji. Sugeruje się, że funkcjonowanie nośnika stymulowane jest przez jednoczesny symport jonów H^+ , a więc konieczne jest istnienie gradientu protonów w poprzek błony. Dotychczas brak jednak danych na temat obecności w strukturze sialiny sygnałowej sekwencji sortującej kierującej to białko do błony lizosomalnej. Może to wskazywać, iż sialina zlokalizowana jest nie tylko w lizosomach lecz także w błonach innych struktur wewnątrzkomórkowych. Gen kodujący białko transportujące ulega ekspresji głównie w komórkach mózgu, wątroby, łożyska, płuc, mięśni i nerek człowieka (MANCINI i współaut. 2000).

Białko MTP (ang. mouse transporter protein) umożliwia eksport nukleozydów do cytosolu, dostarczając w ten sposób substraty do biosyntezy kwasów nukleinowych oraz regulując wewnątrzkomórkowy poziom nukleozydów. Wkrótce po sklonowaniu białka MTP z komórek myszy, uzyskano homologiczne białko HUMORF13 o nieznanej dotychczas funkcji, obecne w komórkach ludzkich. Oba białka wykazują 98% identyczności składu aminokwasowego przewidywanego na podstawie sekwencji cDNA. Wysoki stopień homologii sugeruje istotną rolę tych białek w funkcjonowaniu komórek (HOGUE i współaut. 1996, CABRITA i współaut. 1999). MTP i jego odpowiedniki w komórkach innych ssaków rezydują w błonach różnych przedziałów wewnątrzkomórkowych, głównie cystern aparatu Golgiego, póź-

nych endosomów i lizosomów (HOGUE i współaut. 1996).

Białko MTP to niewielki polipeptyd zbudowany z 233 reszt aminokwasów, o masie cząsteczkowej około 25 kDa, z czterokrotnie przechodzącym przez błonę odcinkiem transbłonowym. Zarówno MTP, jak i HUMORF13 posiadają w obrębie domeny C-końcowej sekwencję odpowiadającą wzorowi YXX, co upodabnia je do glikoprotein lamp i pozwala przypuszczać, że jest to białko lizosomalne. Właściwe kierowanie białka do lizosomu wymaga jednakże obecności dodatkowej sygnałowej sekwencji sortującej opartej na reszcie tyrozyny, podobnie jak w przypadku cystynozyny (HOGUE i współaut. 2002). Brak

natomiast danych na temat glikozylacji powyższych białek.

Wprowadzenie genu kodującego MTP do komórek *Saccharomyces cerevisiae* powoduje ekspresję białka normalnie nieobecnego w komórkach drożdży i prowadzi do wzrostu odporności komórek na różne związki, m. in.: antybiotyki, jonofory i hormony steroidowe (HOGUE i współaut. 1999). Możliwe, że podobną rolę spełnia to białko w komórkach ssaków, gdzie właśnie lizosomy są odpowiedzialne za akumulowanie i unieczynnianie trucizn docierających do komórki (patrz CABRITA i współaut. 1999).

Wymienione powyżej białka to tylko niektóre, najlepiej poznane, systemy transportu

Tabela 2. Systemy transportu w błonie lizosomalnej.

System transportu	Substrat(y)	Funkcja
transportery aminokwasów: - kationowych - anionowych - neutralnych - aromatycznych	Lys, Arg Glu, Asp Ala, Ser, Pro, Thr Trp, Phe	specyficzne dla różnych grup aminokwasów, umożliwiają ich eksport do cytosolu bez udziału ATP (MANCINI i współaut. 2000); wyjątek stanowi opisany ostatnio transporter dla aminokwasów neutralnych, który funkcjonuje jako symporter jonów H^+ , a więc jest stymulowany aktywnością H^+ -ATPazy (SAGNE i współaut. 2001)
transporter cystyny (cystynozyna)	cystyna, selenocystyna	transportuje cystynę do cytosolu; pośrednio zależny od ATP, ponieważ do swego funkcjonowania wymaga istnienia gradientu protonów (MANCINI i współaut. 2000, KALATZIS i współaut. 2001)
transporter heksoz	D-glukoza, D-galaktoza, D-mannoza, D- i L-fukoza	odpowiada za transport heksoz; niezależny w działaniu od ATP, chociaż efektywność transportu rośnie wraz z obniżeniem wartości pH wnętrza lizosomu (MANCINI i współaut. 1990)
transporter kwaśnych cukrowców (sialina)	kwas sialowy, kwaśne monosacharydy, związki anionowe	umożliwia eksport prostych cukrowców poza lizosom; pośrednio zależna w funkcjonowaniu od ATP (wymaga istnienia gradientu protonów) (HAVELAAR i współaut. 1998b, 1999)
transporter nukleozydów (MTP, HUMORF13)	nukleozydy purynowe i pirymidynowe	transportuje nukleozydy do cytosolu na drodze niezależnej od hydrolizy ATP; w komórkach <i>Saccharomyces cerevisiae</i> powoduje wzrost odporności na związki szkodliwe (HOGUE 1996, 1999; CABRITA i współaut. 1999)
transporter jonów siarczanowych	SO_4^{2-} , MoO_4^{2-}	eksportuje do cytosolu jony siarczanowe powstające jako produkt hydrolizy glikozaminoglikanów i sulfolipidów; funkcjonuje jako wymiennicz z jonami Cl^- ; prawidłowe działanie zależy od istnienia gradientu pH w poprzek błony (JONAS i JOBE 1990)
transporter jonów fosforanowych	HPO_4^{2-}	umożliwia import nieorganicznych fosforanów do lizosomu; funkcjonowanie nie zależy od gradientu protonów, chociaż wydajność transportu rośnie wraz z obniżeniem wartości pH (PISONI 1991)
transporter jonów metali ciężkich	Ag^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+}	importuje jony metali ciężkich do światła lizosomu na drodze ATP-zależnej (należy do P-ATPaz); nieznaną funkcję fizjologiczną (HAVELAAR i współaut. 1998a)

blony lizosomalnej. Liczne prace donoszą o istnieniu również innych transporterów (Tabela 2). W większości są to białka eksportujące

związki niskocząsteczkowe z lizosomu do cytosolu, jedynie niektóre z nich pośredniczą w transporcie w przeciwnym kierunku.

PODSUMOWANIE

Błona lizosomalna odgranicza wnętrze lizosomów zawierające enzymy umożliwiające degradację wszystkich makromolekuł a także uczestniczy czynnie w utrzymaniu odpowiedniego środowiska dla procesów degradacji.

1. Kompleks białek lizosomalnej H^+ -ATPazy uczestniczy w pompowaniu protonów do wnętrza lizosomów, co zapewnia optymalne warunki działania enzymom lizosomalnym hydrolizującym większość cząsteczek.

2. Glikoproteiny lamp2a uczestniczą w procesie specyficznej proteolizy białek z sekwencją KFERQ w warunkach stresu i głodu.

3. Specyficzne białka błonowe umożliwiają eksport z lizosomów takich produktów degradacji makromolekuł jak aminokwasy, dipeptydy, cukrowce i nukleozydy jak również eksport i import kationów i anionów.

STRUCTURE AND FUNCTIONING OF LYSOSOMAL MEMBRANE PROTEINS

S u m m a r y

The lysosomal membrane delimits the internal part of lysosomes containing the enzymes capable of degrading practically all cellular macromolecules, and actively participates as well in establishing an efficient environment for the degradation processes.

1. H^+ -ATPase – the main membrane protein complex ensures the low pH environment needed for efficient activity of lysosomal hydrolases.

2. Glycoproteins lamp2a are involved in specific degradation of proteins containing the KFERQ sequence (chaperone mediated autophagy) under condition of stress and starvation.

3. Specific lysosomal membrane proteins participate in export from and import to of low molecular weight compounds such as amino acids, dipeptides, sugars, nucleosides, or ions.

LITERATURA

- AGARRABERES F. A., TERLECKY S. R., DICE J. F., 1997. *An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation*. J. Cell Biol. 137, 825–834.
- AGARRABERES F. A., DICE J. F., 2001a. *Protein translocation across membranes*. Biochim. Biophys. Acta 1513, 1–24.
- AGARRABERES F. A., DICE J. F., 2001b. *A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation*. J. Cell Sci. 114, 2491–2499.
- ANDREWS N. W., 2000. *Regulated secretion of conventional lysosomes*. Trends Cell Biol. 10, 316–321.
- ANIENTO F., PAPAVALASSIOU A. G., KNECHT E., ROCHE E., 1996. *Selective uptake and degradation of c-Fos and v-Fos by rat liver lysosomes*. FEBS Lett. 390, 47–52.
- ARAI K., SHIMAYA A., HIRATANI N., OHKUMA S., 1993. *Purification and characterization of lysosomal H^+ -ATPase. An anion-sensitive v-type H^+ -ATPase from rat liver lysosomes*. J. Biol. Chem. 268, 5649–5660.
- BOWERS W. E., 1998. *Christian De Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes*. Trends Cell Biol. 8, 330–333.
- CABRITA M. A., HOBMAN T. C., HOGUE D. L., KING K. M., CASS C. E., 1999. *Mouse transporter protein, a membrane protein that regulates cellular multidrug resistance, is localized to lysosomes*. Cancer Res. 59, 4890–4897.
- CHERQUI S., KALATZIS V., TRUGNAN G., ANTIGNAC C., 2001. *The targeting of cystinosis to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif*. J. Biol. Chem. 276, 13314–13321.
- CUERVO A. M., DICE J. F., 1996. *A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes*. Science 273, 501–503.
- CUERVO A. M., DICE J. F., 1998. *Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones and proteases*. J. Mol. Med. 76, 6–12.
- CUERVO A. M., DICE J. F., 2000a. *When lysosomes get old*. Exp. Geront. 35, 119–131.
- CUERVO A. M., DICE J. F., 2000b. *Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms*. J. Cell. Sci. 113, 4441–4450.
- CUERVO A. M., DICE J. F., 2000c. *Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane*. Traffic 1, 570–583.
- CUERVO A. M., PALMER A., RIVETT A. J., KNECHT E., 1995. *Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver*. Eur. J. Biochem. 227, 792–800.
- CUERVO A. M., DICE J. F., KNECHT E., 1997. *A population of rat liver lysosomes responsible for the selective*

- uptake and degradation of cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 5606–5615.
- CUERVO A. M., HU W., LIM B., DICE J. F., 1998. *IB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis.* *Mol. Biol. Cell* 9, 1995–2010.
- FINBOW M. E., HARRISON M. A., 1997. *The vacuolar H^+ -ATPase, a universal proton pump of eukaryotes.* *Biochem. J.* 324, 697–712.
- FORGAC M., 1999. *Structure and properties of the vacuolar H^+ -ATPases.* *J. Biol. Chem.* 274, 12951–12954.
- GILLE L., NOHL H., 2000. *The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone.* *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 347–354.
- HAVELAAR A. C., DE GAST I. L., SNIJDERS S., BEERENS C. E. M. T., MANCINI G. M. S., VERHEIJEN F. W., 1998a. *Characterization of a heavy metal ion transporter in the lysosomal membrane.* *FEBS Lett.* 436, 223–227.
- HAVELAAR A. C., MANCINI G. M. S., BEERENS C. E. M. T., SOUREN R. M. A., VERHEIJEN F. W., 1998b. *Purification of the lysosomal sialic acid transporter. Functional characteristics of a monocarboxylate transporter.* *J. Biol. Chem.* 273, 34568–34574.
- HAVELAAR A. C., BEERENS C. E. M. T., MANCINI G. M. S., VERHEIJEN F. W., 1999. *Transport of organic anions by the lysosomal sialic acid transporter, a functional approach towards the gene for sialic acid storage disease.* *FEBS Lett.* 446, 65–68.
- HOGUE D. L., ELLISON M. J., YOUNG J. D., CASS C. E., 1996. *Identification of a novel membrane transporter associated with intracellular membranes by phenotypic complementation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.* *J. Biol. Chem.* 271, 9801–9808.
- HOGUE D. L., KERBY L., LING V., 1999. *A mammalian lysosomal membrane protein confers multidrug resistance upon expression in *Saccharomyces cerevisiae*.* *J. Biol. Chem.* 274, 12877–12882.
- HOGUE D. L., NASH C., LING V., HOBMAN T. C., 2002. *Lysosome-associated protein transmembrane 4a (LAPTM4a) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes.* *Biochem. J.* 365, 721–730.
- HUNZIKER W., GEUZE H. J., 1996. *Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins.* *BioEssays* 18, 379–389.
- JADOT M., WATTIAUX R., MAINFERME F., DUBOIS F., CLAESSENS A. M., WATTIAUX-DE CONINCK S., 1996. *Soluble form of Lamp II in purified rat liver lysosomes.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 353–359.
- JADOT M., DUBOIS F., WATTIAUX-DE CONINCK S., WATTIAUX R., 1997. *Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids.* *Eur. J. Biochem.* 249, 862–869.
- JONAS A. J., JOBE H., 1990. *Sulfate transport by rat liver lysosomes.* *J. Biol. Chem.* 265, 17545–17549.
- KALATZIS V., CHERQUI S., ANTIGNAC C., GASNIER B., 2001. *Cystinosis, the protein defective in cystinosis, is a H^+ -driven lysosomal cystine transporter.* *EMBO J.* 20, 5940–5949.
- KARLSSON K., CARLSSON S. R., 1998. *Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose-6-phosphate receptor/adaptin vesicles at the trans-Golgi network.* *J. Biol. Chem.* 273, 18966–18973.
- KIRCHHAUSEN T., BONIFACINO J. S., RIEZMAN H., 1997. *Linking cargo to vesicle formation, receptor tail interactions with coat proteins.* *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 488–495.
- KORNFIELD S., MELLMAN I., 1989. *The biogenesis of lysosomes.* *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 483–525.
- KUNDRA R., KORNFIELD S., 1999. *Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis.* *J. Biol. Chem.* 274, 31039–31046.
- LLOYD J. B., 2000. *Lysosome membrane permeability, implications for drug delivery.* *Adv. Drug Del. Rev.* 41, 189–200.
- LUZIO J. P., ROUS B. A., BRIGHT N. A., PRYOR P. R., MULLOCK B. M., PIPER R. C., 2000. *Lysosome-endosome fusion and lysosomal biogenesis.* *J. Cell Sci.* 113, 1515–1524.
- LUZIO J. P., MULLOCK B. M., PRYOR P. R., LINDSAY M. R., JAMES D. E., PIPER R. C., 2001. *Relationship between endosomes and lysosomes.* *Biochem. Soc. Trans.* 29, 476–480.
- MANCINI G. M. S., BEERENS C. E. M. T., VERHEIJEN F. W., 1990. *Glucose transport in lysosomal membrane vesicles. Kinetic demonstration of a carrier for neutral hexoses.* *J. Biol. Chem.* 265, 12380–12387.
- MANCINI G. M. S., HAVELAAR A. C., VERHEIJEN F. W., 2000. *Lysosomal transport disorders.* *J. Inherit. Metab. Dis.* 23, 278–292.
- MARKS M. S., WOODRUFF L., OHNO H., BONIFACINO J. S., 1996. *Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals, evidence for distinct saturable components.* *J. Cell Biol.* 135, 341–354.
- MARTINEZ I., CHAKRABARTI S., HELLEVIK T., MOREHEAD J., FOWLER K., ANDREWS N. W., 2000. *Synaptotagmin VII regulates Ca^{2+} -dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts.* *J. Cell Biol.* 148, 1141–1149.
- NOHL H., GILLE L., 2001. *The existence and significance of redox-cycling ubiquinone in lysosomes.* *Protoplasma* 217, 9–14.
- PISONI R. L., 1991. *Characterization of a phosphate transport system in human fibroblast lysosomes.* *J. Biol. Chem.* 266, 979–985.
- REDDY A., CALER E. V., ANDREWS N. W., 2001. *Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes.* *Cell* 106, 157–169.
- SAGNE C., AGULHON C., RAVASSARD P., DARMON M., HAMON M., EL MESTIKAWY S., GASNIER B., GIROS B., 2001. *Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids.* *PNAS* 98, 7206–7211.
- SALVADOR N., AGUADO C., HORST M., KNECHT E., 2000. *Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state.* *J. Biol. Chem.* 275, 27447–27456.
- SCHOONDERWOERT V. Th. G., MARTENS G. J. M., 2001. *Proton pumping in the secretory pathway.* *J. Membr. Biol.* 182, 159–169.
- STINCHCOMBE J. C., GRIFFITHS G. M., 1999. *Regulated secretion from hemopoietic cells.* *J. Cell Biol.* 147, 1–5.
- TERLECKY S. R., DICE J. F., 1993. *Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes.* *J. Biol. Chem.* 268, 23490–23495.

- WINCHESTER B. G., 2001. *Lysosomal membrane proteins*. Eur. J. Paediatr. Neurol. 5 (Suppl. A), 207–215.
- ZHANG G. J., LIU H. W., YOUNG L., ZHONG Y. G., ZHENG Y. Z., 2000. *Influence of the membrane physical state on the lysosomal proton permeability*. J. Membr. Biol. 175, 53–62.