

FOSFATIDYLINOZITOL TRANSFEROVÉ PROTEÍNY: VIAC AKO LEN PRENOS LIPIDOV

ROMAN HOLIČ a PETER GRIAC

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika
Roman.Holic@savba.sk

Došlo 13.2.06, prijaté 31.5.06.

Kľúčové slová: *Saccharomyces cerevisiae*, transport lipidov, transportné proteíny

Obsah

1. Úvod
2. Fosfatidylinozitol/fosfatidylcholín transferový proteín Sec14p v kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*
 - 2.1. Kryštalická štruktúra Sec14p
 - 2.2. Sec14 mutant neschopný prenosu fosfatidylinozitolu
3. Fosfatidylinozitol/fosfatidylcholín transferové proteíny v iných kvasinkách
4. Funkčné a sekvenčné homológy kvasinkového PI/PC transferového proteínu Sec14 u cicavcov
5. Záver

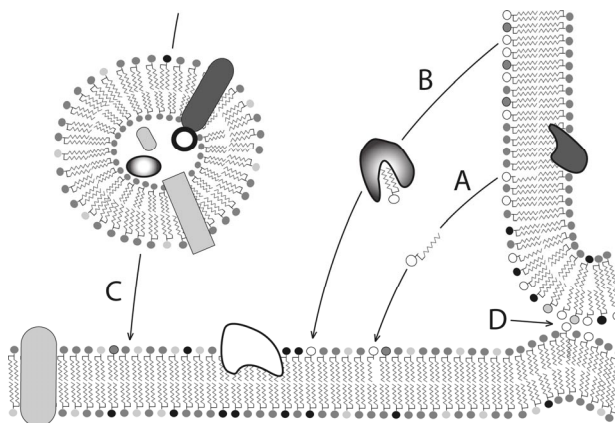
1. Úvod

Membrány eukaryotických buniek oddeľujú bunku od okolia a vytvárajú kompartmenty, esenciálne pre základné bunkové procesy. Špecifické lipidové zloženie biomembrán je výsledkom viacerých zložitých a vysoko regulovaných procesov. Medzi ne patrí syntéza, transport, prestavba a degradácia jednotlivých lipidov. Na lipidy sa už dlhšiu dobu nepozera len ako na pasívne štruktúrne komponenty biologických membrán. Mnohé lipidy majú dôležitú úlohu vo vnútrobunkovej signalizácii, ako napríklad fosforylované formy fosfatidylinozitolu a z neho derivované molekuly. Podobne cholesterol je nielen dôležitou štruktúrnou zložkou membrán, ale aj prekursorom pre steroidné hormóny a objavenie sa fosfatidylserínu vo vonkajšej vrstve plazmatickej membrány je jedným zo signálov pri programovanej bunkovej smrti. Navyše lipidové zloženie membrán je dôležité pre špecifickú interakciu proteínov s membránami a pre vytváranie zakrivenia membrán.

Hlavným miestom syntézy lipidov v eukaryotickej bunke je endoplazmatické retikulum, vnútorná membrána mitochondrií a Golgiho aparát. Pri tejto lokalizovanej bio-

syntéze musia byť jednotlivé lipidy dopravené do všetkých membrán v bunke. Uvažuje sa o štyroch spôsoboch, akými sa lipidy môžu dostávať z miesta syntézy do svojich cieľových membrán: spontánnou difúziou lipidových monomérov; prostredníctvom membránových vezikúl; pomocou lipid prenášajúcich proteínov a prostredníctvom miest dočasného kontaktu medzi donorovou a akceptorovou membránou (obr. 1). Spontánna difúzia lipidových monomérov je efektívna iba v prípade, ak je príslušný lipid relatívne dobre rozpustný vo vode (ako napríklad lyzofosfolipidy). Diacylglycerolfosfolipidy sú v podstate vo vode nerozpustné molekuly a tak iný mechanizmus, ako je spontánna difúzia monomérov, musí existovať pre túto skupinu lipidov. Na základe súčasných poznatkov sa predpokladá, že do určitej miery všetky tri zostávajúce mechanizmy transportu sa podieľajú na distribúcii fosfolipidov do membrán eukaryotickej bunky.

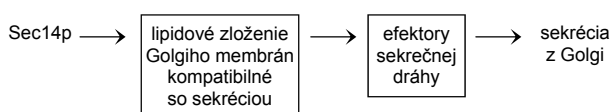
Fosfolipid transferové proteíny boli definované na základe svojej spoločnej vlastnosti, a to schopnosti prenášať fosfolipidy medzi membránami v *in vitro* systéme. Tento prehľad sa zaoberá úlohou jednej skupiny takýchto proteínov, fosfatidylinozitol transferových proteínov v regulácii homeostázy fosfolipidov. Ukazuje sa, že fosfatidylinozitol transferové proteíny hrajú dôležitú úlohu pri koordinácii lipidového metabolizmu a vezikulárneho transportu. Na ich dôležitosť poukazujú štúdie vykonané na myšiach a muškách, kde sa ukázalo, že ak tieto proteíny chýbajú alebo sú defektné, dochádza u experimentálnych organizmov k závažným neurodegeneratívnym a metabolickým poruchám.



Obr. 1. Štyri hlavné spôsoby medzimembránového transportu lipidov; A – spontánna difúzia lipidových monomérov; B – pomocou lipid prenášajúcich proteínov; C – prostredníctvom membránových vezikúl; D – prostredníctvom miest dočasného kontaktu medzi donorovou a akceptorovou membránou

2. Fosfatidylinozitol/fosfatidylcholín transferový proteín Sec14p v kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*

Najlepšie preskúmaným fosfatidylinozitol transferovým proteínom je Sec14p v jednobunkovom eukaryotickom mikroorganizme, kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*. Začiatkom 80. rokov minulého storočia bol tento proteín izolovaný na základe jeho schopnosti prenášať fosfatidylinozitol (PI) a fosfatidylcholín (PC) vo výmennej reakcii medzi dvomi membránami v *in vitro* systéme¹. Neskôr bolo ukázané^{2,3}, že proteín je esenciálny pre životaschopnosť kvasinkovej bunky a jeho chýbanie spôsobuje zastavenie sekrečného procesu na úrovni Golgiho aparátu.

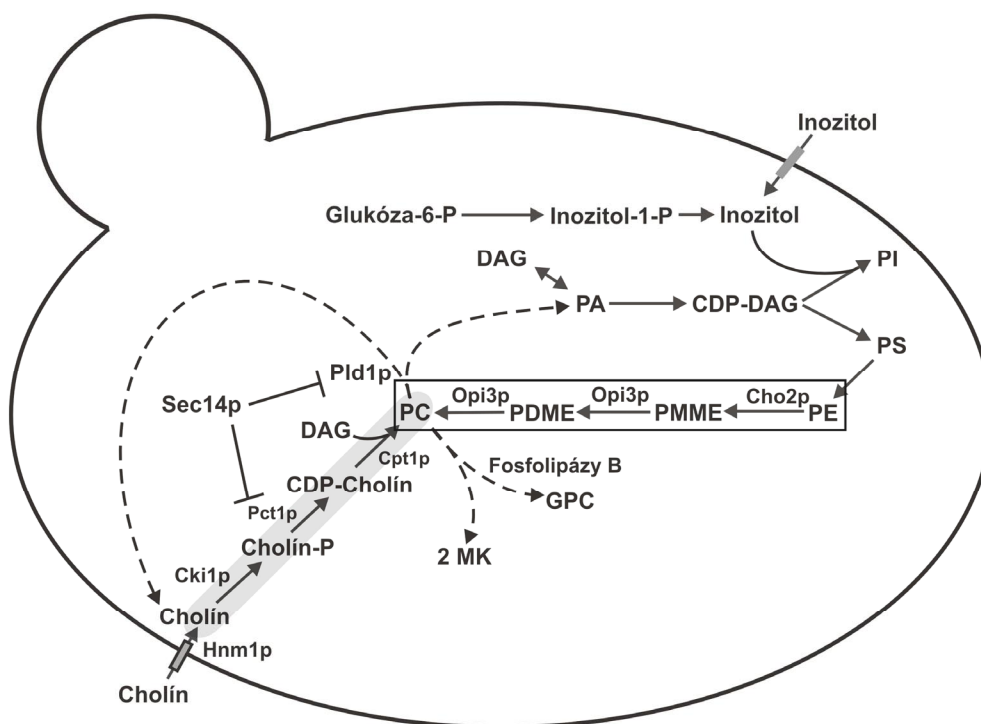


Obr. 2. Kvasinkový fosfatidylinozitol/fosfatidylcholín transferový proteín Sec14p sa podieľa na regulácii lipidového zloženia membrán Golgiho aparátu

Bol nájdený gén, kódujúci tento lipid transferový proteín. Zistilo sa, že gén, kódujúci PI transferový proteín je totožný s génom *SEC14*, ktorý našiel Novick a spol.⁴ vo svojej práci, keď hľadal mutácie, ktoré ovplyvňujú sekrečnú dráhu. Pre bunku sú väčšinou mutácie v sekrečnej dráhe letálne, preto sa na štúdium často používajú teplotne senzitivné mutanty. Bunky s teplotne senzitivnou mutáciou *sec14^{ts}* sú viabilné za permissívnej teploty, defekt sa prejaví pri zvýšení teploty na 37 °C, kedy tieto bunky prestávajú rásť v dôsledku zablokovania sekrečnej dráhy na úrovni Golgiho aparátu.

Schopnosť Sec14p prenášať PI výmenou za PC medzi membránami *in vitro* naznačovala jeho bunkovú funkciu. Súčasné poznatky ale nasvedčujú tomu, že Sec14p nie je pasívnym prenášačom fosfolipidov, ale že skôr je komplexným regulátorom fosfolipidových metabolických dráh. Reguláciou biosyntézy a degradácie fosfolipidov Sec14p zabezpečuje také zloženie membrán Golgiho aparátu, ktoré je kompatibilné so vznikom sekrečných vezikúl (obr. 2).

Pri syntéze fosfolipidov slúži ako východzia molekula kyselina fosfatidová (PA) a jej defosforylovaná forma, diacylglycerol (DAG) (obr. 3). PC, najviac zastúpený fosfolipid v membránach eukaryotických buniek, sa v kva-



Obr. 3. Metabolizmus fosfolipidov u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*; Kennedyho dráha syntézy PC je v šedom ovále; metylačná dráha syntézy PC je v rámečku. Použité skratky: CDP-DAG – cytidindifosfátdiacylglycerol; CDP-Cholín – cytidindifosfátcholín; DAG – diacylglycerol; Glukóza-6-P – glukóza-6-fosfát; GPC – glycerolfosfocholín; Inozitol-1-P – inozitol-1-fosfát; Cholín-P – cholínfosfát; MK – masťná kyselina; PA – kyselina fosfatidová; PC – fosfatidylcholín; PDME – fosfatidyltrimetyletanolamín; PE – fosfatidyletanolamín; PI – fosfatidylinozitol; PMME – fosfatidylmonometyletanolamín; PS – fosfatidylserín; Hnm1p – transportér cholínu z vonkajšieho prostredia do vnútra bunky; Enzýmy Kennedyho dráhy syntézy PC: Cki1p – cholínkináza; Pct1p – cholínfosfát:CTP-cytidylyltransferáza; Ctp1p – *sn*-1,2-DAG-cholínfosfotransferáza; Enzýmy metylačnej dráhy syntézy PC: Cho2p a Opi3p – fosfolipid-*N*-metyltransferázy; Degradatívne enzýmy: Pld1p – fosfolipáza D1, Fosfolipázy B

sinkách syntetizuje dvomi metabolickými dráhami. V jednej dráhe sa PC syntetizuje postupnou metyláciou fosfatidyletanolamínu (PE), v druhej dráhe (Kennedyho alebo CDP-cholínovej dráhe) sa na syntézu PC využíva voľný cholín. Degradácia fosfatidylcholínu je zabezpečená rôznymi druhmi fosfolipáz, a to hlavne fosfolipázami typu B a D. Aktivitou fosfolipáz B sa tvoria voľné mastné kyseliny a glycerolfosfocholín, zatiaľ čo enzymatickou aktivitou fosfolipázy D vzniká kyselina fosfatidová a voľný cholín. Je zaujímavé, že v kvasinkách neboli identifikované fosfolipázy A, ktoré hydrolyzujú acylesterovú väzbu PC na pozícii *sn-1* alebo *sn-2* za vzniku voľných mastných kyselín a lyzofosfolipidu. Je možné, že úlohu fosfolipáz A u kvasiniek plní niektorá z fosfolipáz B. Fosfolipázy B vykazujú obe aktivity, acylester hydrolázovú, aj lyzofosfolipázovú. U fosfolipáz B lyzofosfolipázová aktivita prevažuje nad acylester hydrolázovou a tak sa nehromadí lyzofosfolipid, čo je typické pre fosfolipázy typu A.

Dôležité informácie o funkcii Sec14 proteínu *in vivo* sa získali analýzou podmienok, ktoré umožňujú bunke prežiť aj keď jej chýba inak esenciálny Sec14 proteín. Zistilo sa, že zablokovanie Kennedyho dráhy syntézy PC (obr. 3) obnoví bunecný rast, delenie a funkčnosť sekrečnej dráhy aj bez Sec14p. Vysvetlenie, prečo zablokovaním Kennedyho dráhy prestáva byť delécia génu *SEC14* letálna, podali Skinner a spol.⁵ Títo autori zistili, že Sec14p negatívne reguluje aktivitu enzýmu CTP:fosfocholín-cytidylyl transferázy (Pct1p; EC 2.7.7.15), ktorý je rýchlosť určujúcim enzýmom Kennedyho dráhy. V dôsledku nefunkčnosti Sec14p sa v bunke zvýši syntéza PC Kennedyho dráhou, čoho následkom je výrazne zmenené lipidové zloženie membrán Golgiho aparátu a odčerpávanie dostupného diacylglycerolu (DAG). Prerušenie Kennedyho dráhy tento defekt do značnej miery napráva. Dôležitým zistením bolo, že na to, aby mutácie v Kennedyho dráhe dokázali obnoviť rast a sekreciu kvasinkového kmeňa s defektným Sec14 proteínom, je potrebná prítomnosť funkčnej fosfolipázy D1 (cit.⁶). Aktivita fosfolipázy D je v prípade nefunkčnosti Sec14p výrazne zvýšená⁶. Táto zvýšená aktivita fosfolipázy D1 potom prispieva k obnoveniu lipidových pomerov v membránach Golgiho aparátu degradáciou nadbytočného PC. Ďalšia súvislosť Sec14p s metabolizmom lipidov bola nedávno odhalená zistením, že Sec14p je aktivátorom intracelulárnej fosfolipázy B (cit.⁷).

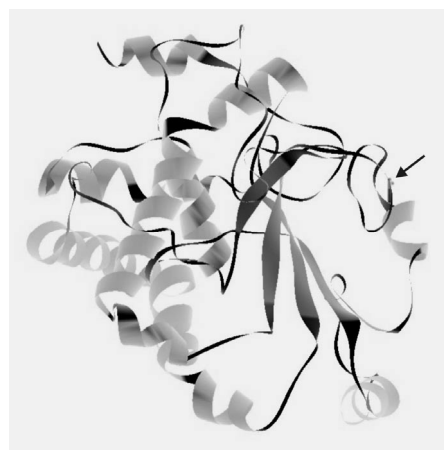
Ďalšie podmienky, ktoré umožňujú kvasinkovým bunkám rásť bez prítomnosti Sec14p, tiež súvisia s lipidovým metabolizmom. Sú to napr. nefunkčnosť PI 4-fosfatázy alebo chýbanie jedného člena rodiny oxysterol viažúcich proteínov, Kes1 proteínu. Je zaujímavé, že aj v týchto prípadoch sa vyžaduje prítomnosť funkčnej fosfolipázy D1 (cit.⁸).

Analýzou vyššie uvedených podmienok, za ktorých bunka toleruje stratu Sec14p, sa zistilo, že Sec14 proteín sa cestou regulácie biosyntetických a degradačných dráh fosfolipidov podieľa na zabezpečení takého lipidového zloženia membrán Golgiho aparátu, ktoré umožňuje tvorbu sekrečných vezikúl. V prípade, ak je proteín Sec14 ne-

funkčný, alebo úplne chýba, vyššie opísané alternatívne mechanizmy sú schopné za určitých podmienok zabezpečiť so sekrečným procesom kompatibilné zloženie membrán Golgiho aparátu. Výsledkom týchto alternatívnych mechanizmov, ktoré odrážajú funkciu samotného proteínu Sec14, sú: pokles v syntéze PC, nárast degradácie PC do prevládzaný nárastom produkcie PA a DAG a zvýšenie množstva PI a PI 4-fosfátu.

2.1. Kryštalická štruktúra Sec14p

Sec14 je proteín zložený z 304 aminokyselín a jeho sekundárna štruktúra je tvorená z dvanástich α -helixov, šiestich β -skladaných listov a ôsmich 3_{10} -helixov (obr. 4). Proteín bol kryštalizovaný s naviazanými dvoma molekulami β -oktylglykozidu (detergent použitý v kryštalizačnom roztoku)⁹. Keďže cyklická časť β -oktylglykozidu sa podobá inozitolovej funkčnej skupine fosfatidylinozitolu, predpokladá sa, že vzniknutý komplex napodobňuje Sec14p s naviazaným PI. C-Koniec proteínu vytvára hydrofóbny vačok, ktorý chráni hydrofóbne časti fosfolipidu (zvyšky mastných kyselín) pred hydrofilným prostredím. Dno tohto hydrofóbného vačku je tvorené β -skladanými listami a steny najmä 3_{10} -helixami. Súčasťou štruktúry, ktorá pomáha stabilizovať tento hydrofóbny vačok, je aj aminokyselina glycín na pozícii 266, ktorej nahradenie za kyselinu asparagovú spôsobuje termosenzitívnu mutáciu *sec14^{ts}*. Mutácia v tejto aminokyseline spôsobuje pri zvýšenej teplote destabilizáciu hydrofóbnnej C-koncovkej domény, čím sa Sec14 proteín znefunkční. Pre normálnu funkciu domény je esenciálna interakcia medzi zvyškom kyseliny glutámovej (E207) a lyzínu (K239). Záměna ktorejkoľvek z týchto dvoch aminokyselín za alanín spôsobí dramatické zníženie efektívnosti prenosu PI medzi membránami *in vitro*. Súčasná substitúcia K66 a K239 za alanín prenos PI prakticky znemožňuje¹⁰.



Obr. 4. Kryštalická štruktúra Sec14p; šípka označuje aminokyselinu glycín na pozícii 266, ktorej nahradenie za kys. asparagovú spôsobuje termosenzitívnu mutáciu *sec14^{ts}*

N-Koniec proteínu je tvorený α helixami A₁-A₄, ktoré sú navzájom antiparalelne usporiadané, pričom helixy A₂, A₃ a A₄ tvoria útvar pripomínajúci trojnožku s hydrofóbnym vnútrom. Súčasťou tohto priestorového útvaru je aj väčšina z *N*-koncových aminokyselinových zvyškov, ktoré sú zodpovedné a zároveň postačujúce pre asociáciu proteínu Sec14 s membránami Golgiho aparátu.

2.2. Sec14 mutant neschopný prenosu fosfatidylinozitolu

Na základe analýzy štruktúry Sec14p bol pripravený mutantný Sec14p^{K66,239A}, ktorý nedokáže prenášať v *in vitro* podmienkach PI (cit.¹⁰). Proteín Sec14^{K66,239A} si zachoval nezmenenú schopnosť prenášať PC. Vvedenie tohto v prenose PI defektného proteínu Sec14 do kvasinkových buniek bez natívneho proteínu Sec14 obnovilo predtým defektný rast, sekréciu a reguláciu Kennedyho dráhy biosyntézy PC. Toto pozorovanie svedčí o tom, že PI transferová aktivita nie je pre vegetatívne rastúcu kvasinku *S. cerevisiae* esenciálna.

Otvorenou otázkou ostáva, či PC transferová aktivita Sec14p je esenciálnou vlastnosťou Sec14p. Predbežné výsledky z nášho laboratória ukazujú, že aj mutant defektný v *in vitro* prenose PC dokáže nahradiť chýbajúci Sec14p v jeho základnej funkcii umožniť sekréciu proteínov z Golgiho aparátu.

Zistenia, že ani PI, ani PC transferová aktivita nie sú potrebné pre esenciálne funkcie Sec14p sú do značnej miery prekvapujúce. Naznačujú, že prenos fosfolipidov nie je hlavnou úlohou tohto proteínu *in vivo*. Väzba jednotlivých fosfolipidov bude mať skôr úlohu regulovať aktivitu proteínu Sec14.

3. Fosfatidylinozitol/fosfatidylcholín transferové proteíny v iných kvasinkách

Proteín Sec14 bol objavený aj v iných kvasinkách. Doteraz sa jeho funkcia skúmala v kvasinke *Schizosaccharomyces pombe*¹¹, v dimorfickej kvasinke *Yarrowia lipolytica*¹² a v patogénnej dimorfickej kvasinke *Candida albicans*¹³. Obe spomínané dimorfické kvasinky dokážu rásť v dvoch odlišných morfológických formách, kvasinkovej a hyfálnej. Zistilo sa, že u pacientov trpiacich na mykózové ochorenia spôsobené *C. albicans*, táto kvasinka preferenčne rastie v hyfálnej forme¹⁴. Hyfálna forma kvasinke umožňuje prerastať dovnútra tkaniva a tak lepšie využívať živiny. Bolo pozorované, že Sec14p hrá významnú úlohu v patogenicite *C. albicans* reguláciou prechodu z kvasinkovej na hyfálnu formu rastu. To umožňuje uvažovať o Sec14p *C. albicans* ako o možnom mieste terapeutického zásahu liečiv, ktoré by znižovali patogenicitu tohto mikroorganizmu. Sec14p u všetkých troch spomínaných kvasiniek vykazuje PI/PC transferovú aktivitu *in vitro*.

4. Funkčné a sekvenčné homológy kvasinkového PI/PC transferového proteínu Sec14 u cicavcov

V cicavčích bunkách sa nachádzajú dve skupiny proteínov so vzťahom ku kvasinkovému PI/PC transferovému proteínu Sec14. Jednu skupinu tvoria klasické fosfatidylinozitol-fosfatidylcholín transferové proteíny (PITP), ktoré v *in vitro* podmienkach špecificky prenášajú PI a PC medzi membránami. Niektoré z týchto proteínov dokážu čiastočne funkčne nahradiť kvasinkový Sec14p (cit.¹⁵). Zaujímavé je, že napriek funkčnej zastupiteľnosti tieto proteíny nevykazujú podobnosť so Sec14p na úrovni primárnej štruktúry. Druhá skupinu k Sec14p podobných cicavčích proteínov tvoria sekvenčné homológy, ktoré majú výraznú podobnosť primárnej štruktúry so Sec14p. Väčšina týchto proteínov dokáže okrem lipidov viazať a prenášať aj ďalšie, hlavne lipofilné molekuly.

Cicavce exprimujú tri známe cytozolické PITP (PITP α , PITP β a RdgB β), ktoré sa však odlišujú od kvasinkových a rastlinných PITP primárnou štruktúrou. Po vyriešení kryštalickej štruktúry PITP α sa ukázalo, že proteín PITP α obsahuje dutinu, v ktorej sa viaže fosfolipid, avšak iným spôsobom ako v Sec14p. Cicavčí PITP α viaže fosfolipid v takej orientácii, kde fosfolipidová hlavička je ponorená vnútri v dutine a konce zvyškov mastných kyselín fosfolipidu smerujú von k okolitému prostrediu¹⁶.

PITP α a PITP β majú svoju primárnu štruktúru navzájom na 77 % identickú a na 94 % podobnú. Sekvenčná identita RdgB β k spomínaným PITP je okolo 40 %. PITP α má molekulovú hmotnosť 32,5 kDa a v bunke sa lokalizuje prevažne do jadra a cytoplazmy¹⁷. Druhá izoforma, PITP β má podobnú molekulovú hmotnosť ako PITP α , avšak v porovnaní s PITP α je schopná prenášať okrem PI a PC aj sfingomyelín (SM) (cit.¹⁶⁻¹⁸). PITP β sa na rozdiel od PITP α lokalizuje okrem cytoplazmy aj do Golgiho aparátu.

Štúdie na kvasinkách *S. cerevisiae* ukázali, že kvasinkový PITP, Sec14p, je dôležitý pre reguláciu syntézy a degradácie PC (cit.^{5,19}). Tieto zistenia podnietili preskúmanie úlohy cicavčích PITP v modulácii metabolismu PC. V bunkách potkana sa po znížení hladiny PITP α pomocou antisense RNA (o 25 %) pozorovala zmena hladín niektorých metabolitov cholínu. Znížila sa hladina fosfatidylcholínu a niektorých jeho derivátov (SM, lyzo-PC, glycerol-fosfocholín), zatiaľ čo hladina cholínfosfátu a CDP-cholínu sa zvýšila o 30–40 %. Toto pozorovanie sa vysvetľuje inhibíciou rýchlosti určujúceho enzýmu Kennedyho dráhy biosyntézy PC, CTP:fosfocholín-cytidylyl transferázy (Pct1p; EC 2.7.7.15). Spomalenie tvorby PC *de novo* syntézou²⁰ pri znížení hladiny PITP α je opakom situácie v kvasinke *S. cerevisiae*, kde Sec14p je inhibítorom syntézy PC (cit.²¹). Najnovšie experimenty s myšami, ktoré mali prerušený gén pre PITP α ukázali, že tieto myši majú závažné neurodegeneratívne choroby a poškodenú miechu.

PITP α je u myši potrebný aj pre normálnu absorpciu v tukoch rozpustných vitamínov a tiež pre normálnu homeostázu lipidov v pečeni. Navyše myši s prerušeným génom pre PITP α boli hypoglykemické a zomierali veľmi mladé²².

Pri nadprodukcii druhého fosfolipid transferového proteínu, PITP β (viac ako 10 krát) v NIH3T3 bunkách výrazne prevládala syntéza sfingomyelinu nad jeho degradáciou. Predpokladá sa preto, že PITP β by mohol regulovať aktivitu sfingomyelinázy alebo transport sfingomyelinu z Golgiho aparátu do plazmatickej membrány²³. PITP β sa pravdepodobne aktívne zúčastňuje transportu vezikúl z *trans*-Golgi do plazmatickej membrány. V kontraste s týmito pokusmi v experimentoch, v ktorých sa použili iné bunky (COS-7), nadprodukcia PITP β nemala žiadny efekt na syntézu sfingomyelinu²⁴. Toto pozorovanie sa vysvetľuje tým, že expresia a funkcia PITP β je tkanivovo špecifická.

Pri hľadaní mechanizmov, akými PITP fungujú, sa používali najmä rekonštitučné prístupy s použitím permeabilizovaných buniek. V týchto pokusoch bolo ukázané, že PITP sú potrebné pre aktiváciu fosfolipázy C, ktorá hydrolyzuje PI(4,5)P₂ vytvára dôležité signálne molekuly, IP₃ a diacylglycerol²⁵. Tak isto cestou rekonštitúcie permeabilizovaných buniek bola zistená úloha PITP α v regulovanej exocytóze. PITP α a PI 4-kináza boli identifikované ako komponenty cytozolu zodpovedné za sprostredkovanie odpovede sekretorických buniek po stimulácii vápnikom²⁶.

Na základe týchto poznatkov môžeme povedať, že cicavčie PITP majú v bunke veľmi významnú úlohu najmä vo vezikulárnom transporte (tvorba sekrečných vezikúl z *trans*-Golgiho aparátu, fúzia sekrečných vezikúl s plazmatickou membránou) a v signálnych dráhach spojených s činnosťou fosfolipázy C. Zdá sa, že všetky tieto deje sú spojené s metabolizmom fosfatidylinozitolu a jeho fosforylovanými derivátmi. Bola vyslovená hypotéza, podľa ktorej by lipid naviazaný na PITP (PI alebo PC) mohol priamo regulovať bunkové procesy, podobne ako GTP a GDP molekuly naviazané na malých proteínových GTPázach²⁷.

Okrem klasických PITP (funkčné homológy *S. cerevisiae* Sec14p), v cicavčích bunkách existujú proteíny s výraznou podobnosťou primárnej štruktúry ku kvasinkovému Sec14p. Podobne ako Sec14p obsahujú doménu, ktorá im umožňuje viazať a prenášať lipidy a iné lipofilné látky. Na základe funkčných vlastností proteínov tejto skupiny bola táto doména nazvaná CRAL/TRIO (cellular retinaldehyde-binding/triple function domain⁹). Do tejto skupiny patriace proteíny dokážu viazať a prenášať lipofilné vitamíny A a E, ďalej PI, PC, fosfatidylglycerol a skvalén.

5. Záver

Fosfatidylinozitol transferové proteíny boli ako skupina definované svojou spoločnou vlastnosťou, schopnosťou

prenášať *in vitro* fosfatidylinozitol a fosfatidylcholin cez vodné prostredie medzi dvomi membránami. Je to pozoruhodná skupina proteínov, ktorá sa zúčastňuje mnohých základných bunkových procesov. Ukazuje sa, že prenos lipidov v bunke nebude ich hlavnou úlohou, tou bude skôr regulácia syntézy a degradácie lipidov, pričom vznikajú dôležité signálne molekuly. Reguláciou lipidového zloženia membrán a tvorbou signálnych molekúl sa PITP podieľajú na bunkovej signalizácii, regulácii exocytózy a prestavby aktínového cytoskeletu. Berúc do úvahy, akých dôležitých procesov sa PITP zúčastňujú, prekvapivo málo vieme o molekulárnych mechanizmoch, pomocou ktorých PITP uskutočňujú svoju úlohu. Nerozumieme napr. molekulárnemu mechanizmu, akým PITP vyberajú lipid z membrány. Podobne sa nevie, aká je úloha väzby jednotlivých lipidov na aktivitu PITP a akým ďalším spôsobom je aktivita PITP proteínov regulovaná. Veríme, že štrukturálne štúdie, dostupnosť mutantov selektívne defektných vo väzbe jednotlivých ligandov a metodologické pokroky umožnia v krátkej dobe odpovedať na tieto otázky a tak prispieť k pochopeniu neurodegeneratívnych a metabolických porúch spojených so zmenenou funkčnosťou PITP.

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 2/4130/24 a APVT 51-024904.

Použité skratky

CDP	cytidindifosfát
CRAL/TRIO	cellular retinaldehyde-binding/triple function domain
CTP	cytidintrifosfát
DAG	diacylglycerol
GDP	guanozindifosfát
GTP	guanozintrifosfát
PA	kyselina fosfatidová
PC	fosfatidylcholin
PE	fosfatidyletanolamin
PI	fosfatidylinozitol
PITP	fosfatidylinozitol-fosfatidylcholin transferový proteín
PI(4,5)P ₂	fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát
SM	sfingomyelín
VLDL	lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou

LITERATÚRA

- Daum G., Paltauf F.: *Biochim. Biophys. Acta* 794, 385 (1984).
- Bankaitis V. A., Malehorn D. E., Emr S. D., Greene R.: *J. Cell Biol.* 108, 1271 (1989).
- Bankaitis V. A., Aitken J. R., Cleves A. E., Dowhan W.: *Nature* 347, 561 (1990).
- Novick P., Field C., Schekman R.: *Cell* 21, 205 (1980).
- Skinner H. B., McGee T. P., McMaster C. R., Fry

- M. R., Bell R. M., Bankaitis V. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 112 (1995).
6. Sreenivas A., Patton-Vogt J. L., Bruno V., Griac P., Henry S. A.: *J. Biol. Chem.* 273, 16635 (1998).
 7. Murray J. P., McMaster C. R.: *J. Biol. Chem.* 280, 8544 (2005).
 8. Xie Z., Fang M., Rivas M. P., Faulkner A. J., Sternweis P. C., Engebrecht J. A., Bankaitis V. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12346 (1998).
 9. Sha B., Phillips S. E., Bankaitis V. A., Luo M.: *Nature* 391, 506 (1998).
 10. Phillips S. E., Sha B., Topalof L., Xie Z., Alb J. G., Klenchin V. A., Swigart P., Cockcroft S., Martin T. F., Luo M., Bankaitis V. A.: *Mol. Cell* 4, 187 (1999).
 11. Nakase Y., Nakamura T., Hirata A., Routt S. M., Skinner H. B., Bankaitis V. A., Shimoda C.: *Mol. Biol. Cell* 12, 901 (2001).
 12. Lopez M. C., Nicaud J. M., Skinner H. B., Vergnolle C., Kader J. C., Bankaitis V. A., Gaillardin C.: *J. Cell Biol.* 125, 113 (1994).
 13. Riggle P. J., Slobodkin I. V., Brown D. H. Jr., Hanson M. P., Volkert T. L., Kumamoto C. A.: *Microbiology* 143, 3527 (1997).
 14. Felk A., Kretschmar M., Albrecht A., Schaller M., Beinhauer S., Nichterlein T., Sanglard D., Kortling H. C., Schafer W., Hube B.: *Infect Immun.* 70, 3689 (2002).
 15. Kearns B. G., Alb J. G. Jr., Bankaitis V.: *Trends Cell Biol.* 8, 276 (1998).
 16. Routt S. M., Bankaitis V. A.: *Biochem. Cell Biol.* 82, 254 (2004).
 17. van der Rest M. E., Kamminga A. H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W. N.: *Microbiol. Rev.* 59, 304 (1995).
 18. de Vries K. J., Heinrichs A. A., Cunningham E., Brunink F., Westerman J., Somerharju P. J., Cockcroft S., Wirtz K. W., Snoek G. T.: *Biochem. J.* 310, 643 (1995).
 19. Patton-Vogt J. L., Griac P., Sreenivas A., Bruno V., Dowd S., Swede M. J., Henry S. A.: *J. Biol. Chem.* 272, 20873 (1997).
 20. Monaco M. E., Alexander R. J., Snoek G. T., Moldover N. H., Wirtz K. W., Walden P. D.: *Biochem. J.* 335, 175 (1998).
 21. McGee T. P., Skinner H. B., Bankaitis V. A.: *J. Bacteriol.* 176, 6861 (1994).
 22. Alb J. G. Jr., Cortese J. D., Phillips S. E., Albin R. L., Nagy T. R., Hamilton B. A., Bankaitis V. A.: *J. Biol. Chem.* 278, 33501 (2003).
 23. Van Tiel C. M., Luberto C., Snoek G. T., Hannun Y. A., Wirtz K. W.: *Biochem. J.* 346, 537 (2000).
 24. Segui B., Allen-Baume V., Cockcroft S.: *Biochem. J.* 366, 23 (2002).
 25. Thomas G. M., Cunningham E., Fensome A., Ball A., Totty N. F., Truong O., Hsuan J. J., Cockcroft S.: *Cell* 74, 919 (1993).
 26. Hay J. C., Martin T. F.: *Nature* 366, 572 (1993).
 27. Litvak V., Dahan N., Ramachandran S., Sabanay H., Lev S.: *Nat. Cell Biol.* 7, 225 (2005).

R. Holíč and P. Griáč (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Phosphatidylinositol Transfer Proteins: Lipid Transfer and Beyond**

Phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer proteins are characterized by their common feature, the ability to transfer phospholipids between membrane bilayers *in vitro*. In the cell, they fulfil specific roles at the interface between lipid metabolism and important cell functions that go beyond the *in vitro* observed phospholipid transfer activities. Experimental evidence indicates that the proteins are involved in complex regulations of lipid metabolism, which form an appropriate environment for essential transport processes. The focus of this review is the yeast PI/PC transfer protein Sec14p and its functional and sequence homologues in higher eukaryotes.