

Joanna Bandorowicz-Pikuła^{1,✉}

Marcin Woś¹

Anna Sekrecka-Belniak²

Sławomir Pikuła¹

¹Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

²Katedra Fizyki, WTD, SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

✉Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 589 22 62, e-mail: j.bandorowicz-pikuła@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 23 maja 2016 r.

Artykuł zaakceptowano 23 czerwca 2016 r.

Słowa kluczowe: aneksyny, mitochondria, organizacja błon mitochondrialnych

Wykaz skrótów: AnxA – aneksyna kręgowców; $[Ca^{2+}]$ – stężenie jonów wapnia; ER – siateczka śródplazmatyczna; mit – mitochondrium

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej są finansowane ze środków przyznanych przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie.

STRESZCZENIE

Aneksyny tworzą rodzinę białek oddziałujących z błonami biologicznymi, której przedstawiciele powszechnie występują w organizmach kręgowców. Oddziaływanie te są regulowane przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_{wek}$), pH, a także obecność w błonie ujemnie naładowanych lipidów i cholesterolu. Jako białka reagujące na zmiany $[Ca^{2+}]_{wek}$ oraz czynniki uczestniczące w fuzji błon biologicznych, aneksyny regulują szlaki przekazywania sygnałów, w których uczestniczą izoformy białkowej kinazy C (PKC). Wyniki wielu badań prowadzonych w różnych laboratoriach na świecie wskazują, że aneksyny mogą w komórce uczestniczyć między innymi w naprawie uszkodzeń błon biologicznych (szkielet aktynowy komórki oraz białka partnerskie aneksyn z rodziny S100), w transporcie pęcherzykowym, szczególnie w endocytozie (mikrodomeny błony wzbogacone w cholesterol), w przekazywaniu sygnałów, w regulacji homeostazy jonów wapnia, a także w regulacji funkcji mitochondriów i organizacji sieci mitochondrialnej w komórce. Temu ostatniemu zagadnieniu poświęcony jest niniejszy artykuł przeglądowy. Autorzy dedykują go Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi, z okazji 90-lecia Jego urodzin.

WPROWADZENIE

Aneksyny tworzą rodzinę białek oddziałujących z błonami biologicznymi, występującą powszechnie w organizmach kręgowców. Wyniki wielu badań wskazują, że aneksyny mogą pełnić w komórce różne funkcje, między innymi uczestniczyć w transporcie pęcherzykowym, szczególnie w endocytozie. Udział aneksyn w transporcie endosomalnym związany jest z ich zdolnością, uzależnioną od zmian stężenia jonów wapnia w komórce, do oddziaływania z błoną plazmatyczną, przede wszystkim z cząsteczkami ujemnie naładowanych fosfolipidów oraz wieloma białkami partnerskimi [1].

Uczestnictwo aneksyn w transporcie endosomalnym ma znaczenie w regulacji różnorodnych procesów przekazywania sygnałów. Receptory cząsteczek sygnałowych na powierzchni błony komórkowej ulegają w trakcie endocytozy internalizacji, co prowadzi do aktywacji kolejnych etapów szlaku sygnałowego. Wiąże się to z powstaniem wyspecjalizowanych dla określonego przedziału komórkowego platform sygnałowych, które stwarzają optymalne warunki do modulacji siły sygnału. Opisano także udział aneksyn w tworzeniu i stabilizacji bogatych w cholesterol platform sygnałowych [2-6]. Cholesterol reguluje oddziaływanie z błoną plazmatyczną wielu ważnych z punktu widzenia funkcjonowania komórki białek uczestniczących w szlakach przekazywania sygnałów i transporcie pęcherzykowym, takich jak receptory SNAP, białko CD63, P-selektyna, wirusy. Coraz więcej danych wskazuje, że aneksyny, np. AnxA6, regulują te oddziaływania na drodze zależnej od cholesterolu [7-9].

Aneksyny są rodziną białek cytoplazmatycznych o masie cząsteczkowej od 28 do 73 kDa, występującymi w organizmach wszystkich zbadanych pod tym względem organizmów eukariotycznych, w tym także we wszystkich organizmach roślin [10,11], w komórkach drożdży [12], w tkankach pasożytów [13], a także w komórkach organizmów prokariotycznych [14,15]. Zarówno komórkowe, jak i tkankowe rozmieszczenie aneksyn jest bardzo zróżnicowane [1-4,16]. Wszyscy przedstawiciele tej rodziny mają zdolność odwracalnego wiązania fosfolipidów błony plazmatycznej zależnie od zmian $[Ca^{2+}]$ oraz zmian wartości wewnątrzkomórkowego pH. W strukturze aneksyn można wyróżnić, złożony głównie z α -helikalnych powtórzeń rdzeń, w którym zachowana w ewolucji powtarzająca się domena zbudowana z 70-80 reszt aminokwasowych odpowiedzialna jest za zależne od stężenia $[Ca^{2+}]$ wiązanie z cząsteczkami ujemnie naładowanych fosfolipidów w błonie. Większość przedstawicieli rodziny aneksyn posiada cztery powtórzenia 70-80 reszt aminokwasowych. Jedynym wyjątkiem jest aneksyna A6 (AnxA6), w której strukturze sekwencja ta powtórzona jest ośmiokrotnie. Rdzeń, długi na około 300 reszt aminokwasowych ma kształt dys-

ku, który w warunkach *in vitro*, po związaniu z błoną, może zmieniać jej przepuszczalność dla jonów. Oprócz rdzenia, ważną funkcję w cząsteczce typowej aneksyny pełni również domena N-końcowa, w której zlokalizowane są miejsca oddziaływania z białkami partnerskimi aneksyn. Domena ta jest charakterystyczna dla określonych aneksyn i prawdopodobnie odpowiada za indywidualne funkcje poszczególnych przedstawicieli rodziny *in vivo* [1].

Szczególne właściwości aneksyn skłaniają wielu badaczy do wysunięcia hipotezy, że aneksyny uczestniczą w wielu procesach związanych z dynamiką błon, takich endocytoza [1-4,16], egzocytoza [17] oraz udział w wewnątrzkomórkowej homeostazie jonowej [1] i przekazywaniu sygnałów, w których uczestniczy receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) [2,18,19]. Aneksyny zostały także zidentyfikowane w macierzy pozakomórkowej, gdzie są prawdopodobnie zaangażowane w procesy koagulacji, mineralizacji i w apoptozę [9,20,21].

W świetle najnowszych wyników badań dotyczących udziału AnxA6 w regulacji funkcjonowania mitochondriów [22,23], w niniejszym artykule przeglądowym zebrano dane świadczące o lokalizacji białek z rodziny aneksyn w mitochondriach oraz przedstawiono krytyczny przegląd poglądów na możliwe funkcje aneksyn w mitochondriach.

Mitochondria są bardzo ważnymi organellami w komórce, w których zachodzą podstawowe dla przeżycia komórki procesy, takie jak wytwarzanie energii lub integracja szlaków metabolicznych, w których uczestniczą białka, lipidy i węglowodany. Tworzą bardzo dynamiczną sieć i podlegają procesom fuzji błon, podziału, transportu oraz eliminacji z komórki na drodze mitofagii. Mitochondria pełnią również ważną funkcję w procesie programowanej śmierci komórki oraz w homeostazie wapnia. Jako takie w ostatnich latach zostały uznane za jedne z ważniejszych organelli, których nieprawidłowe działanie prowadzi do rozwoju poważnych stanów chorobowych takich jak choroby neurodegeneracyjne, nowotwory i cukrzyca [24]. Dodatkowo stwierdzono, że bardzo ważny mechanizm obronny organizmu, kardioprotekcja, wiąże się z transportem specyficznych białek do mitochondriów z udziałem białka szoku cieplnego Hsp90. Badania proteomiczne wykazały, że wśród białek transpor-

towanych specyficznie do mitochondriów w mięśniu sercowym należą winkulina, kinaza pirogronianowa i AnxA6 [25].

W następnym rozdziale niniejszego artykułu przeglądowego przedstawiono dane świadczące o obecności aneksyn w mitochondriach (Tab. 1) [22,25-39].

ANEKSYNY MITOCHONDRIÓW

ANEKSYNA A1 (ANXA1)

Biologiczna aktywność AnxA1 i jej lokalizacja w komórce w dużej mierze zależą od modyfikacji potranslacyjnych białka. Zwłaszcza modyfikacje w obrębie unikatowej dla wszystkich aneksyn, domeny N-końcowej, wpływają na strukturę cząsteczki aneksyny i funkcje tego białka w komórce [19,40].

W komórkach mięśni gładkich pochodzących od pacjentów ze zmianami miażdżycowymi stwierdzono zaburzenia funkcjonowania mitochondriów i towarzyszące temu zmiany zawartości AnxA1. Wyniki wcześniej prowadzonych badań wskazywały na udział komórek mięśni gładkich w rozwoju miażdżycy, a także zidentyfikowały AnxA1 jako białko przeciwzapalne. Badacze, którzy wywołali doświadczalnie delecję genu kodującego AnxA1 w komórkach mięśni gładkich zaobserwowali wzrost produkcji cytokin prozapalnych w tych komórkach i zaburzenia organizacji mitochondriów, co potwierdza udział AnxA1 w regulacji procesów zapalnych [41]. Jakkolwiek czynnik martwicy nowotworów (TNF α , ang. *tumour necrosis factor alpha*), którego działaniu towarzyszy stress oksydacyjny i aktywacja fosfolipazy A₂ w komórkach L929, nie towarzyszył wzrostowi zawarości AnxA1 w komórkach [42].

AnxA1 wykryto bezpośrednio, z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, w mitochondriach komórek β wysepek Langerhansa trzustki szczura oraz w komórkach wątroby szczura. W komórkach β , oprócz błony mitochondriów, AnxA1 zlokalizowano w formie związanej z błoną plazmatyczną, siateczką śródplazmatyczną (ER) oraz błoną granuli wydzielniczych zawierających insulinę, co mogłoby świadczyć o udziale AnxA1 w wydzie-

laniu insuliny [26]. W przypadku mitochondriów wątroby szczura AnxA1 występowała w formie ufosforylowanej na resztach tyrozylowych przez niezidentyfikowaną kinazę tyrozynową i białkową kinazę C [27]. Rola tej fosforylacji nie została określona.

Nowe światło na funkcje AnxA1 w mitochondriach rzuciły wyniki badań zespołu kierowanego przez profesor Anitę Draeger [28]. Badacze ci wykazali, że AnxA1 jest białkiem rozpoznającym rejony błony plazmatycznej wzbogacone w ceramidy, tzw. platformy ceramidowe. Ceramidy uczestniczą w wielu ważnych procesach w komórce, takich jak proliferacja, różnicowanie, zahamowanie wzrostu i apoptoza. W

Tabela. 1. Aneksyny zidentyfikowane w mitochondriach.

Aneksyna	Białko, lipid, komórka, narząd, organizm	Piśmiennictwo
AnxA1	wysepki Langerhansa, trzustka szczura	[26]
	wątroba szczura	[27]
	ceramidy w błonach mitochondriów	[28]
AnxA2	prohibityna (p32) i prohibiton (p37) w mitochondriach	[29]
AnxA5	serce świni	[30]
	wątroba szczura (kardiolipina, mitoplasty)	[31,32]
	makrofagi J774	[33]
AnxA7	mięśnie <i>Xenopus leavis</i> (dorosłe osobniki)	[34]
AnxA6	białko Drp1	[22]
	jądra i sperma ssaków	[35]
	ameloblasty i odontoblasty siekaczy szczura	[36]
	wątroba ssaków	[37,38]
	tęczówka pstrąga tęczowego	[39]
	kardioprotekcja wywołana przez zahamowanie aktywności kinazy syntazy glikogenu w wyizolowanym sercu ssaka	[25]

trakcie apoptozy produkcji ceramidów towarzyszyły zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej. Wykazano, że rejon błony plazmatycznej wzbogacone w ceramidy i ulegające inwaginacji mają fizyczny kontakt z zewnętrzną błoną mitochondrialną, dzięki czemu mogą bezpośrednio dostać się do mitochondriów, zmienić przepuszczalność błony mitochondrialnej i wywołać apoptozę [28]. Dalsze badania wykazały, że ceramidy tworzą w błonie mitochondrialnej pory o średnicy około 10 nm, które umożliwiają transfer praktycznie wszystkich białek rozpuszczalnych pomiędzy cytoplazmą a przestrzenią międzybłonową w mitochondriach. Tworzenie takich kanałów jest hamowane przez białka antyapoptotyczne jak białko Bcl-xL a stymulowane przez białka Bax [43].

ANEKSYNA A2 (ANXA2)

Bardzo podobna pod względem budowy do AnxA1, AnxA2 również występuje w komórkach w formie związanej z błoną plazmatyczną i błoną endosomów. Partnerem AnxA2 jest białko z rodziny S100, białko p11. Nie jest ono niezbędne do wiązania AnxA2 z błonami, tak jak w przypadku AnxA1 [44,45]. W komórkach nowotworowych, w których ryzyko uszkodzenia błony plazmatycznej rośnie, a także ze względu na stres oksydacyjny, w komórkach nowotworowych dochodzi do wzmoczonej ekspresji genów kodujących aneksyny, w tym AnxA2, żeby kompensować w ten sposób skutki możliwych uszkodzeń [46].

Wiązanie AnxA2 z błoną wczesnych endosomów związane jest z wysokim powinowactwem tego białka do cholesterolu [44,47], za co odpowiada charakterystyczna dla AnxA2 domena N-końcowa [48]. Wyniki badań na komórkach pochodzących od pacjentów z chorobą Niemann-Picka typu C (NPC1) lub liniach komórkowych, w których wywołano doświadczalnie gromadzenie się cholesterolu w przedziale późnych endosomów/lizosomów, wykazały przemieszczenie AnxA2 do błon przedziału magazynującego cholesterol w sposób zależny od zmian stężenia Ca^{2+} [49]. Wykazano także, że AnxA2, podobnie jak AnxA1, ulega fosforylacji na reszcie tyrozylowej 23 (Y23), co wydaje się mieć znaczenie dla wiązania białka z błoną endosomów [45]. Białkiem partnerskim AnxA2 jest białko p11 (S100A10), a tworzący się tetramer (AnxA2₂p11₂) pełni wiele funkcji w organizmie, zarówno w stanie normy, jak i patologii, uczestnicząc między innymi w procesie fibrylizacji, w regulacji przepuszczalności błon dla jonów, w oddziaływaniach cytoszkieletu z błoną plazmatyczną, w regulacji transportu receptorów LDL w komórce, a także w regulacji procesów redoks [50,51].

Jednymi z białek partnerskich AnxA2 w komórce są białka mitochondrialne prohibityna (p32, ang. *prohibitin*) i prohibiton (p37, ang. *prohibitone*), występując powszechnie w świecie organizmów żywych. Białka te miałyby pełnić funkcję w regulacji długości życia komórki, a także jako białka opiekuńcze [29]. Czy ich oddziaływanie z AnxA2 może świadczyć, że aneksyna ta występuje również w mitochondriach? Odpowiedź na to pytanie wymaga dalszych badań.

ANEKSYNA A5 (ANXA5)

W komórkach ssaków AnxA5, białko cytoplazmatyczne lub związane z błoną plazmatyczną, zostało również zidentyfikowane na terenie jądra komórkowego i w formie związanej z błoną mitochondriów [30,52]. Ta ostatnia lokalizacja wydaje się nie dotyczyć AnxA5 w komórkach układu nerwowego oraz mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego [53].

Jedną z najważniejszych właściwości AnxA5, tego najmniejszego przedstawiciela z rodziny aneksyn, jest zdolność wiązania się w sposób zależny od stężenia jonów wapnia z ujemnie naładowanymi cząsteczkami fosfatyloseryny i tworzenia dwuwymiarowych, regularnych struktur na powierzchni błony. Dzięki tej właściwości wysunięto przypuszczenie, że AnxA5 uczestniczy w naprawie błon biologicznych, tworząc w miejscach uszkodzenia błony rodzaj warstwy ochronnej [54]. Wyniki doświadczeń z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych wskazują, że AnxA5 wpływa na wrażliwość komórek (β -lymfocytów) na czynniki wywołujące apoptozę tych komórek [55].

Obserwacje poczynione na makrofagach linii J774 potwierdziły wcześniejsze obserwacje innych linii komórkowych, że AnxA5 wiąże się błonami pęcherzyków uczestniczących w procesie endocytozy, a także błoną mitochondriów [33]. Wydaje się, że za wiązanie AnxA5 z mitochondriami odpowiadają rejon błony szczególnie bogate w cząsteczki kardiolipiny. Dodatkowo wykazano z wykorzystaniem sztucznych błon lipidowych oraz mitochondriów wyizolowanych z wątroby szczura, a także techniki EPR, że AnxA5 wpływa lokalnie na zmiany płynności błony mitochondrialnej, co może zmieniać jej właściwości i zaburzać prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów [31,32].

Podsumowując, wydaje się, że AnxA5 może uczestniczyć w regulacji funkcjonowania mitochondriów w komórkach, a co za tym idzie w rozwoju chorób związanych z zaburzeniami właściwego działania sieci mitochondrialnej. Na przykład choroba Wilsona związana z nieprawidłowym transportem jonów miedzi w organizmie, wiąże się także ze spadkiem zawartości białek macierzy mitochondrialnej (np. cytochromu b5), apoptozą, a także wzrostem zawartości AnxA5 w komórkach [56].

ANEKSYNA A7 (ANXA7)

AnxA7 występuje w komórce w dwóch izoformach. Różni się od innych aneksyn tym, że w aminowym końcu cząsteczki białka znajduje się domena zbudowana ze 167 reszt aminokwasowych (większa izoforma), o hydrofobowym charakterze. Reszta cząsteczki (299 reszt aminokwasowych) to przede wszystkim cztery, powtarzające się domeny wiążące jony wapnia i cząsteczki lipidów, których sekwencja jest zachowana w ewolucji. Analiza struktury białka pozwoliła stwierdzić, że AnxA7 wiąże się z błonami biologicznymi, gdzie może tworzyć zależne od potencjału błony kanały jonowe wykazujące selektywność w stosunku do jonów wapnia, wiąże się także z GTP i jest białkiem uczestniczącym w fuzji błon. Wyniki badań z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych wskazują, że AnxA7 współdziała

z receptorem IP_3 w uwalnianiu jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej [57], a także uczestniczy w procesie rozwoju różnego typu nowotworów. Zaskakująco, w przypadku takich nowotworów jak glioblastomy melanomy i nowotwór prostaty, jest supresorem nowotworów, podczas gdy w wypadku nowotworów wątroby, układu pokarmowego i raka piersi stymuluje rozwój nowotworu [58].

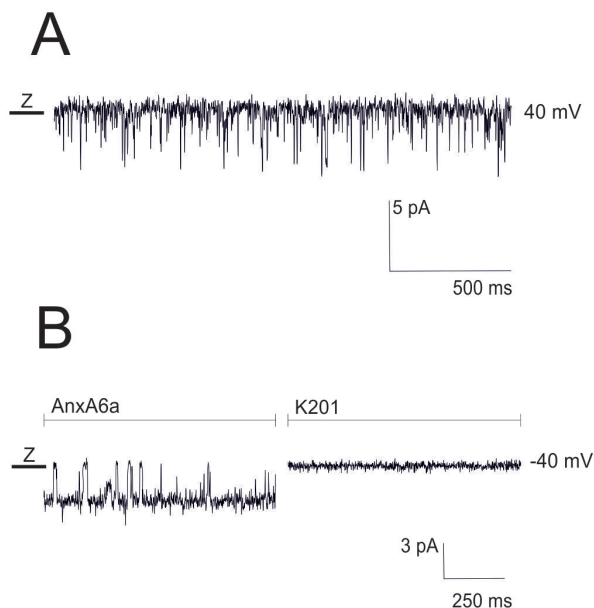
Dwadzieścia lat temu wykazano, że AnxA7 w różnych tkankach *Xenopus laevis*, z wyjątkiem mięśni szkieletowych, zlokalizowana jest w formie związanej z błonami organelli komórkowych, takimi jak jądro i mitochondria. Jaką funkcję mogłaby pełnić AnxA7 w mitochondriach pozostaje kwestią otwartą, jakkolwiek wielu badaczy podkreśla zdolność białka do zmiany przepuszczalności błon biologicznych dla jonów, a więc możliwość regulacji stężenia jonów wapnia w mitochondriach [34].

ANEKSYNA A6 (ANXA6)

AnxA6 jest nietypowym przedstawicielem rodziny aneksyn. W przeciwieństwie do innych aneksyn jest zbudowana z ośmiu powtarzających się domen, tworzących rdzeń cząsteczki. Analiza bioinformatyczna pozwoliła na wysunięcie przypuszczenia, że AnxA6 mogła powstać w trakcie ewolucji z połączenia genów kodujących aneksynę A5 (AnxA5) i aneksynę A10 (AnxA10) [1,59]. Organizacja rdzenia AnxA6 pozwała białku na wiązanie się z dwoma różnymi błonami jednocześnie, np. błoną plazmatyczną i błoną pęcherzyka transportującego [59]. Sprawia to, że AnxA6 jest uznawana za białko, które uczestniczy w reorganizacji struktury błony plazmatycznej i błon wewnątrzkomórkowych poprzez wpływ na homeostazę cholesterolu w komórce i organizację szkieletu podbłonowego [60,61]. Należy w tym miejscu podkreślić, że zaburzenia transportu i składowania cholesterolu w komórkach mogą wpływać również na funkcjonowanie mitochondriów i organizację sieci mitochondrialnej, jak opisano w fibroblastach pobranych od pacjentów, u których zdiagnozowano chorobę Niemann-Picka typu C, charakteryzującą się ponadnormatywną zawartością cholesterolu w przedziale późnych endosomów/lizosomów i zahamowaniem transportu zwrotnego lipidu do błony plazmatycznej [62].

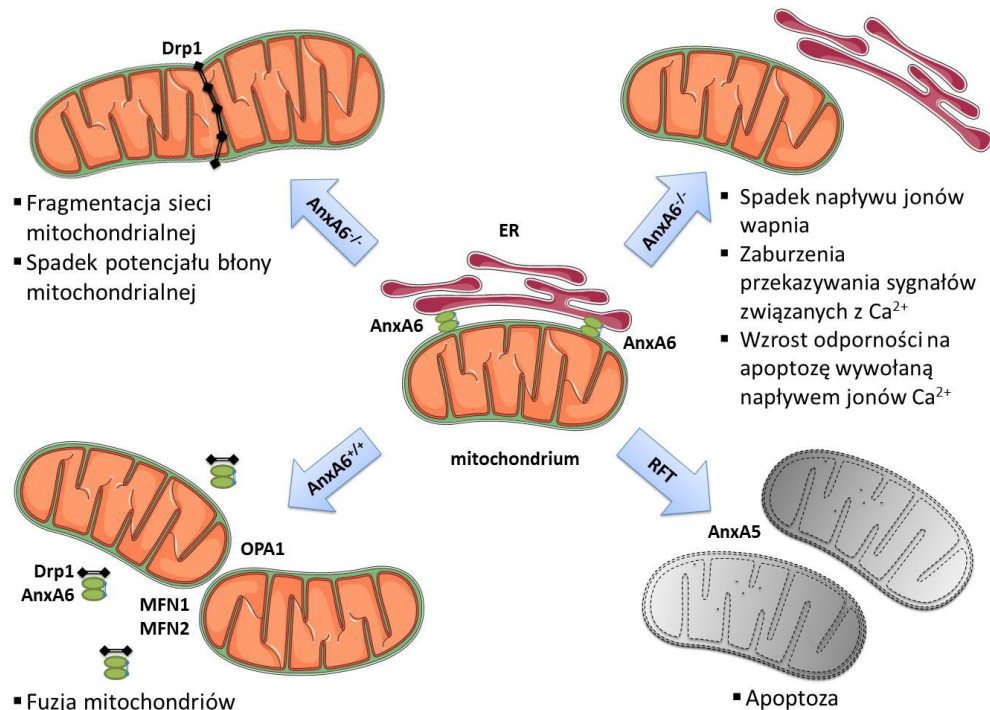
AnxA6 występuje w komórkach w dwóch izoformach różniących się tylko sześcioma resztami aminokwasowymi. Odgrywa rolę w organizacji szkieletu komórki, w transporcie cholesterolu, w transporcie pęcherzykowym i w różnych szlakach przekazywania sygnałów, w których uczestniczą białka Ras, Ras/MAPK i FAK/PI3K [63] oraz w naprawie uszkodzeń błon biologicznych [64].

AnxA6 występuje w formie związanej z błoną wczesnych endosomów, ale można ją także zaobserwować w formie związanej z błonami późnych i recyrkulujących endosomów. Poprzez oddziaływanie z aktyną może uczestniczyć w przebudowie szkieletu komórki [65], jak również w transporcie cholesterolu z przedziału późnych endosomów do aparatu Golgi'ego i błony plazmatycznej [8,66] oraz w zależnym od cholesterolu wiązaniu się fosfolipazy A_2 (cPLA₂) z błonami aparatu Golgi'ego [67], a także w procesie recyklingu integryno do błony komórkowej [68].



Rycina 1. Aktywność aneksyny A6 jako kanału jonowego *in vitro* (B). Wpływ K201 (B) na aktywność AnxA6a; z - oznacza stan zamknięty kanału. Badania elektrofizjologiczne własności kanałów jonowych stworzonych przez AnxA6 i jej fragment zawierający koniec aminowy (AnxA6a) wykonano przy użyciu techniki czarnych błon lipidowych (BLM) (dr A. Sekrecka Belniak, dane nieopublikowane). Technika ta umożliwia pomiar prądów jonowych płynących przez pojedyncze białko kanałowe. Zapis pracy pojedynczego kanału tworzy charakterystyczny obraz jego aktywności. Doświadczenia były wykonywane z zastosowaniem techniki czarnych błon lipidowych (BLM) opisaną przez Zampighi'ego i wsp. [80]. Technika BLM polega na utworzeniu sztucznej dwuwarstwy lipidowej na otworze o średnicy 250 μ m znajdującym się pomiędzy dwiema komorami wypełnionymi odpowiednimi roztworami. Układ doświadczalny składał się z: 1) uchwytu na kuwetę, 2) teflonowej kuwety pomiarowej z otworem o średnicy 250 μ m (Warner Corporation Corp.), 3) mieszadeł magnetycznych, 4) mostków agarozowych zawierających 3 M KCl, 5) elektrod Ag/AgCl. Uchwyt z kuwetami i elektrodami umieszczony był w klatce Faradaya w celu wyeliminowania zakłóceń elektromagnetycznych. Cały układ doświadczalny ustawiony był na stole antywibracyjnym, by zabezpieczyć go przed drganiami mechanicznymi. Komory układu napełniano roztworem zawierającym 10 mM bufor cytrynianowy, pH 4,6; 0,1 mM EGTA oraz 150 mM lub 450 mM KCl odpowiednio dla strony cis i trans. Dwuwarstwę lipidową tworzący przez naniesienie na otwór małej ilości mieszaniny lipidów z azolektyny zawieszonych w n-dekanie (25 mg/ml), które w środowisku wodnym spontanicznie dążyły do utworzenia dwuwarstwy lipidowej. Podczas powstawania dwuwarstwy lipidowej mierzono jej pojemność elektryczną oraz przewodnictwo. Błony lipidowe charakteryzujące się pojemnością w zakresie 80-190 pF oraz oporem pomiędzy 10 a 50 G Ω uznawano za odpowiednie do przeprowadzenia doświadczeń. Komory naczynka pomiarowego, rozdzielone błoną lipidową połączone były przez elektrolityczny mostek agarozowy z elektrodą pokrytą chlorkiem srebra. AnxA6 dodawano do komory trans naczynka pomiarowego. Rekonstrukcja, czyli wbudowanie się białka kanałowego w sztuczną błonę lipidową następowała po spontanicznej fuzji białka z dwuwarstwą lipidową. Zmiany natężenia prądu jonowego, w zakresie pA, przepływającego przez układ mierzono przy użyciu wzmacniacza Bilayer Membrane Amplifier (BLM-120, BioLogic). Częstotliwość próbkowania sygnału wynosiła 100 kHz. Następnie sygnał filtrowano z częstotliwością 500 Hz. Konwersję sygnału elektrycznego z analogowego na cyfrowy umożliwiał konwerter PowerLab 2/20, ADInstruments. Do zapisu danych wykorzystywano oprogramowanie Chart v5.2.7 (PowerLab, ADInstruments). Analizę danych wykonano przy użyciu oprogramowania pClamp9.0 (Axon Laboratory).

W komórkach o podwyższonej zawartości LDL lub cholesterolu AnxA6 ulega przemieszczeniu do przedziału późnych endosomów, gdzie współuczestniczy w kierowaniu cząsteczek cholesterolu do lizosomów, skąd podlega on recyklingowi do błony plazmatycznej [69,70]. W komórkach z zaburzonym transportem cholesterolu, jego zawartość w błonach aparatu Golgi'ego spada. Odpowiednie stężenie cholesterolu jest niezbędne do przyłączenia cPLA₂ i utrzymania



Rycina 2. Udział wybranych białek z rodziny aneksyn w regulacji dynamiki sieci mitochondrialnej. AnxA6^{-/-} – w wyniku braku funkcjonalnego genu *AnxA6* dochodzi do spadku ilości połączeń z siateczką śródplazmatyczną, co powoduje zaburzenia w przekazywaniu sygnałów związanych ze zmianami wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Ponadto brak AnxA6 powoduje uwolnienie wcześniej związanego białka Drp1, prowadząc do intensywnego podziału mitochondriów i powodując fragmentację sieci mitochondrialnej. AnxA6^{+/+} – przy nadprodukcji AnxA6 dochodzi do związania białka Drp1, co prowadzi do zahamowania procesu podziału mitochondriów oraz nadmiernej aktywności procesu ich łączenia się przy udziale białek mitochondrialnych OPA1, MFN1 oraz MFN2. RFT – nagromadzenie uszkodzeń mitochondriów wywołanych reaktywnymi formami tlenu prowadzi do apoptozy. Jednym z białek uczestniczących w tym procesie jest także AnxA5. Objasnienia na rycinie: AnxA5 – aneksyna A5; AnxA6 – aneksyna A6; Drp1 – ang. *Dynamain related protein 1*; MFN1 – mitofuzyna 1; MFN2 – mitofuzyna 2, OPA1 – ang. *Optic atrophy 1*, RFT – reaktywne formy tlenu. Inne wyjaśnienia w tekście pracy. Schemat opracowano na podstawie informacji zawartych w pracach [22,23].

prawidłowego transportu kaweoliny do błony plazmatycznej. Zaburzenia tego procesu powodują nagromadzenie się kaweoliny oraz powstawanie kaweoli z podwyższoną zawartością AnxA6. Powyższe obserwacje wskazują na udział AnxA6 w transporcie EGFR [66,67]. Zatem obok zdolności AnxA6 do oddziaływania z szkieletem aktynowym białko bierze udział w regulacji transportu endocytarnego, tworzeniu mikrodomen błonowych oraz hamowaniu przekazywania sygnału pochodzącego od EGFR [71].

Przypuszczenie o udziale aneksyn, w tym AnxA6, w transporcie jonów wapnia przez błony biologiczne uzyskało poparcie badaczy zajmujących się wczesnymi etapami mineralizacji, zachodzącymi w pęcherzykach macierzy pozakomórkowej, wydzielanymi do środowiska przez komórki kompetentne w mineralizacji [72-74]. Zaobserwowano, że inhibitor kanałów tworzonych przez aneksyny, pochodna 1,4-benzotriazepiny (K-201), powoduje znaczne obniżenie stężenia Ca²⁺ w komórkach [75]. Wcześniej opisano, że w makrofagach, w których wywołano stres oksydacyjny można zaobserwować dysocjację AnxA6 z błony plazmatycznej do cytoplazmy, co wiązało się znacznym wzrostem [Ca²⁺]_{wew.} [76].

Na rycinie 1 przedstawiono wyniki doświadczenia, z którego wynika, że aktywność AnxA6 (N-końcowego fragmentu białka zawierającego cztery domeny wiążące jony wapnia) jako kanału jonowego ulega zahamowaniu *in vitro* w obecności K-201 (Sekrecka-Belniak i wsp., dane nieopublikowane).

Wyniki niedawno prowadzonych badań wykazały, że pochodna K-201 działa nie tylko na kanały jonowe tworzone przez cząsteczki aneksyn. Związek ten stabilizuje także stan zamknięty receptora rianodynowego typu 2 (kanału wapniowego siateczki śródplazmatycznej), zwiększając powinowactwo kalstabin-2 (białka wiążącego FK506) do tego receptora [77]. W świetle tych obserwacji trudno jest stwierdzić, czy hamujący wpływ K-201 na aktywność kanałową aneksyny jest specyficzny. Podobny efekt do K-201 uzyskano w przypadku zastosowania techniki siRNA umożliwiającej wyciszenie ekspresji genu kodującego AnxA5 w komórkach [75]. Analiza proteomiczna pęcherzyków macierzy pochodzącej z tkanki chrzęstnej 17-dniowych embrionów kurzych wykazała, obok aneksyn, obecność następujących kanałów jonowych: VDAC, TRPV4 i CLIC4. Zahamowanie procesu mineralizacji w obecności takich związków jak pochodna 1,4 benzothiazepiny (K-201) i jony cynku wskazuje, że to aneksyny mogłyby być odpowiedzialne za transport jonów wapnia do światła pęcherzyków macierzy pozakomórkowej [78,79] (Ryc. 1 [80]).

Wyniki szeroko zakrojonych badań pozwalają stwierdzić, że zaburzenia poziomu i funkcjonowania AnxA6 towarzyszą rozwojowi szeregu poważnych chorób, w tym nowotworów, w których AnxA6 może odgrywać rolę zarówno promotora, jak i supresora nowotworu [63]. Niedawno stwierdzono, że mechanizm kardioprotekcji w odpowiedzi na niedotlenienie, a potem stres oksydacyjny, może polegać na transporcie szeregu białek do mitochondriów w mięśni

sercowym z udziałem białka szoku cieplnego Hsp90, takich jak m.in. winkulina, kinaza pirogronianowa i AnxA6 [25].

Pod koniec XX wieku AnxA6 wykryto w mitochondriach komórek wątroby [37] w formie związku z błoną grzebieni mitochondrialnych [38], w jądrach i spermie ssaków [35], w tkance zębowej szczura [36] oraz w tęczęwce oka ryb [39]. Sądzono w tym okresie, że AnxA6 może uczestniczyć w regulacji wewnątrzmitochondrialnej homeostazy wapnia.

Nowe światło na związki funkcjonalne pomiędzy AnxA6 a mitochondriami rzuciły badania dotyczące oddziaływań pomiędzy AnxA6 i białkiem Drp1.

Białko Drp1 (ang. *dynamamin-related protein 1*) należy do rodziny dynamin (GTPaz). Uczestniczy w kontroli bardzo ważnych z punktu widzenia organizacji sieci mitochondrialnej procesów takich jak podział mitochondriów (ang. *mitochondrial fission*), a także likwidowanie połączenia błonowego pomiędzy powstającymi mitochondriami potomnymi. Wykazano, że w podziale mitochondriów ważną rolę odgrywają miejsca połączenia mitochondriów z błonami ER, a także białko MFN2 (ang. *mitofusin-2*) wchodzące w skład większego kompleksu białek łączących ER z mitochondriami [81]. Białko Drp1 oddziałuje także z wieloma innymi białkami, na przykład Fis1 (ang. *mitochondrial fission protein 1*), MIEF1 (ang. *mitochondrial elongation factor 1*) i INF2 (ang. *ER-localized inverted formin 2*) [23,82-85] uczestnicząc w utrzymywaniu delikatnej równowagi pomiędzy podziałem mitochondriów, a ich fuzją, dynamicznego procesu, który determinuje prawidłowe funkcjonowanie całej komórki [86,87].

Ostatnio przedstawiono wyniki doświadczeń, świadczących, że aneksyny, przede wszystkim AnxA6, mogą współuczestniczyć w regulacji biogenezy, organizacji sieci mitochondrialnej i funkcji mitochondriów (Ryc. 2). W fibroblastach pochodzących od myszy *ANXA6*^{-/-} stwierdzono obniżenie zdolności pobierania jonów wapnia przez mitochondria i jednocześnie podwyższenie $[Ca^{2+}]_{wew}$. Towarzyszyła temu fragmentacja mitochondriów, zaburzenia tempa oddychania komórkowego i obniżenie potencjału błony mitochondrialnej. Zaobserwowano, że AnxA6 wiąże się z białkiem Drp1, a fragmentacja mitochondriów w komórkach *ANXA6*^{-/-} ulegała zahamowaniu w obecności inhibitora aktywności dynamin, mdvi-1. W komórkach *ANXA6*^{+/+} podwyższone $[Ca^{2+}]_{wew}$ wpływało na rozpad kompleksu AnxA6-Drp1, translokację AnxA6 do błony plazmatycznej i wzrost fragmentacji mitochondriów [22].

PODSUMOWANIE

Wyniki szeregu badań przeprowadzonych w niezależnych laboratoriach naukowych na świecie pozwalają na wyciągnięcie wniosków na temat obecności przedstawicieli rodziny aneksyn w formie związanej z błoną mitochondriów, ich udziału w regulacji funkcjonowania mitochondriów oraz organizacji sieci mitochondrialnej. Przypuszcza się, że aneksyny w mitochondriach rozpoznają rejony błony wzbogacone w określone lipidy, takie jak kardiolipina, ceramid lub fosfatydylloseryna. Oddziałują także z białkami, takimi jak Drp1, które reguluje organizację sieci mitochondrialnej. Czy aneksyny, ze względu na swoje zdolności do zmiany przepuszczalności błon biologicznych dla jonów, szczególnie Ca^{2+} , mogą uczest-

niczyć w regulacji wewnątrzmitochondrialnej homeostazy jonowej, pozostaje kwestią otwartą dla przyszłych badań.

PIŚMIENNICTWO

- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005) Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 449-461
- Bandorowicz-Pikula J, Woś M, Pikula S (2012) Do annexins participate in lipid messenger mediated intracellular signaling? A question revisited. *Mol Membr Biol* 29: 229-242
- Bandorowicz-Pikula J, Woś M, Pikula S (2012) Udział aneksyn w przekazywaniu sygnałów, regulacji struktury błony komórkowej i naprawie jej uszkodzeń. *Postępy Biochem* 58: 135-148
- Domon M, Nasir MN, Matar G, Pikula S, Besson F, Bandorowicz-Pikula J (2012) Annexins as organizers of cholesterol- and spingomyelin-enriched membrane microdomains in Niemann-Pick type C disease. *Cell Mol Life Sci* 69: 1773-1785
- Domon MM, Besson F, Tylki-Szymanska A, Bandorowicz-Pikula J, Pikula S (2013) Interaction of AnxA6 with isolated and artificial lipid microdomains; importance of lipid composition and calcium content. *Molec Biosyst* 9: 668-676
- Sztolszterner ME, Dobrzyn A, Pikula S, Tylki-Szymanska A, Bandorowicz-Pikula J (2012) Impaired dynamics of late endosome/lysosome compartment in human Niemann-Pick type C skin fibroblasts carrying mutation in *NPC1* gene. *Molec BioSyst* 8: 1197-1205
- Reverter M, Rentero C, de Muga SV, Alvarez-Guaita A, Mulay V, Cairns R, Wood P, Monastyrskaya K, Pol A, Tebar F, Blasi J, Grewal T, Enrich C (2011) Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-SNARE trafficking, assembly, and function. *Mol Biol Cell* 22: 4108-4102
- Musiol A, Gran S, Ehrhardt C, Ludwig S, Grewal T, Gerke V, Rescher U (2013) Annexin A6-balanced late endosomal cholesterol controls influenza a replication and propagation. *MBio* 4: e00608-613
- Poeter M, Radke S, Koese M, Hessner F, Hegemann A, Musiol A, Gerke V, Grewal T, Rescher U (2013) Disruption of the annexin A1/S100A11 complex increases the migration and clonogenic growth by dysregulating epithelial growth factor (EGF) signaling. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1700-1711
- Konopka-Postupolska D, Clark G, Hofmann A (2011) Structure, function and membrane interactions of plant annexins: an update. *Plant Sci* 181: 230-241
- Laohavisit A, Davies JM (2011) Annexins. *New Phytol* 189: 40-53
- Morgan RO, Martin-Almedina S, Iglesias JM, Gonzalez-Florez MI, Fernandez MP (2004) Evolutionary perspective on annexin calcium-binding domains. *Biochim Biophys Acta* 1742: 133-140
- Hofmann A, Osman A, Leow CY, Driguez P, McManus DP, Jones MK (2010) Parasite annexins - new molecules with potential for drug and vaccine development. *Bioessays* 32: 967-976
- Morgan RO, Martin-Almedina S, Garcia M, Jhoncon-Kooyip J, Fernandez MP (2006) Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1238-1249
- Kodavali PK, Dudkiewicz M, Pikula S, Pawłowski K (2014) Bioinformatics analysis of bacterial annexins - putative ancestral relatives of eukaryotic annexins. *Plos One* 9: e85428
- Bandorowicz-Pikula J (2007) Aneksyny, białka uczestniczące w organizacji i prawidłowym funkcjonowaniu błon biologicznych - od *Arabidopsis thaliana* do *Homo sapiens*. *Postępy Biochem* 54: 143-153
- Creutz CE (1992) The annexins and exocytosis. *Science* 258: 924-931
- Sigismund S, Confalonieri S, Ciliberto A, Polo S, Scita G, Di Fiore PP (2012) Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiol Rev* 92: 273-366
- Tebar F, Gelabert-Baldrich M, Hoque M, Cairns R, Rentero C, Pol A, Grewal T, Enrich C (2014) Annexins and endosomal signaling. *Methods Enzymol* 535: 55-74

20. Emans N, Gorvel JP, Walter C, Gerke V, Kellner R, Griffiths G, Gruenberg J (1993) Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* 120: 1357-1369
21. Harder T, Gerke V (1993) The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J Cell Biol* 123: 1119-1132
22. Chlystun M, Campanella M, Law A-L, Duchen MR, Fatimathas L, Levine IP, Gerke V, Moss SE (2013) Regulation of mitochondrial morphogenesis by annexin A6. *PLoS One* 8: e53774.
23. Zhao J, Liu T, Jin S, Wang X, Qu M, Uhlén P, Tomilin N, Shupliakov O, Lendahl U, Nistér M (2011) Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J* 30: 2762-2778
24. Mishra P (2016) Interfaces between mitochondrial dynamics and disease. *Cell Calcium*, w druku, doi: 0.1016/j.ceca.2016.05.004
25. Nguyen T, Wong R, Wang G, Gucek M, Steenbergen C, Murphy E (2012) Acute inhibition of GSK causes mitochondrial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H2439-2445
26. Ohnishi M, Tokuda M, Masaki T, Fujimura T, Tai Y, Itano T, Matsui H, Ishida T, Konishi R, Takahara J, et al (1995) Involvement of annexin-I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 136: 2421-2426
27. Yoshii K, Sugimoto K, Tai Y, Konishi R, Tokuda M (2000) Purification, identification and phosphorylation of annexin I from rat liver mitochondria. *Acta Med Okayama* 54: 57-65
28. Babiychuk EB, Atanasoff AP, Monastyrskaya K, Brandenberger C, Studer D, Allemann C, Draeger A (2011) The targeting of plasmalemmal ceramide to mitochondria during apoptosis. *PLoS One* 6: e23706
29. Bacher S, Achatz G, Schmitz ML, Lamers MC (2002) Prohibitin and prohibitone are contained in high-molecular weight complexes and interact with alpha-actinin and annexin A2. *Biochimie* 84: 1207-1220
30. Pula G, Bianchi R, Ceccarelli P, Giambanco I, Donato R (1990) Characterization of mammalian heart annexins with special reference to CaBP33 (annexin V). *FEBS Lett* 277: 53-58
31. Megli FM, Selvaggi M, De Lisi A, Quagliariello E (1995) EPR study of annexin V-cardiolipin Ca-mediated interaction in phospholipid vesicles and isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1236: 273-278
32. Megli FM, Mattiazzi M, Di Tullio T, Quagliariello E (2000) Annexin V binding perturbs the cardiolipin fluidity gradient in isolated mitochondria. Can it affect mitochondrial function? *Biochemistry* 39: 5534-5542
33. Diakonova M, Gerke V, Ernst J, Liautaud JP, van der Vusse G, Griffiths G (1997) Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci* 110: 1199-1213
34. Srivastava M, Goping G, Caohuy H, McPhie P, Pollard HB (1996) Detection and localization of synxin (Annexin VII) in *Xenopus* adult and embryonic tissues using an antibody to the *Xenopus* N-terminal PGQM repeat domain. *Exp Cell Res* 229: 14-19
35. Feinberg JM, Rainteau DP, Kaetzel MA, Dacheux JL, Dedman JR, Weinman SJ (1991) Differential localization of annexins in ram germ cells: a biochemical and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem* 39: 955-963
36. Goldberg M, Feinberg J, Lecolle S, Kaetzel MA, Rainteau D, Lessard JL, Dedman JR, Weinman S (1991) Co-distribution of annexin VI and actin in secretory ameloblasts and odontoblasts of rat incisor. *Cell Tissue Res* 263: 81-89
37. Weinman JS, Feinberg JM, Rainteau DP, Gaspera BD, Weinman SJ. (1994) Annexins in rat enterocyte and hepatocyte: an immunogold electron-microscope study. *Cell Tissue Res* 278: 389-397
38. Rainteau D, Mansuelle P, Rochat H, Weinman S (1995) Characterization and ultrastructural localization of annexin VI from mitochondria. *FEBS Lett* 360: 80-84
39. Zaunreiter M, Brandstätter R, Donato R, Hermann A (2005) Localisation of annexins in the retina of the rainbow trout-light and electron microscopical investigations. *Brain Res* 1032: 1-10
40. Haigler HT, Schlaepfer DD, Burgess WH (1987) Characterization of lipocortin I and an immunologically unrelated 33-kDa protein as epidermal growth factor receptor/kinase substrates and phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* 262: 6921-6930
41. Viiri LE, Full LE, Navin TJ, Begum S, Didangelos A, Astola N, Berge RK, Seppälä I, Shalhoub J, Franklin IJ, Perretti M, Lehtimäki T, Davies AH, Wait R, Monaco C (2013) Smooth muscle cells in human atherosclerosis: proteomic profiling reveals differences in expression of Annexin A1 and mitochondrial proteins in carotid disease. *J Mol Cell Cardiol* 54: 65-72
42. Polla BS, Jacquier-Sarlin MR, Kantengwa S, Mariéthoz E, Hennes T, Russo-Marie F, Cossarizza A (1996) TNF alpha alters mitochondrial membrane potential in L929 but not in TNF alpha-resistant L929.12 cells: relationship with the expression of stress proteins, annexin I and superoxide dismutase activity. *Free Radic Res* 25: 125-131
43. Colombini M (2016) Ceramide channels and mitochondrial outer membrane permeability. *J Bioenerg Biomembr*, w druku
44. Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE (2004) Annexin-actin interactions. *Traffic* 5: 571-576
46. Lauritzen SP, Boye TL, Nylandsted J (2015) Annexins are instrumental for efficient plasma membrane repair in cancer cells. *Semin Cell Dev Biol* 45: 32-38
46. Morel E, Gruenberg J (2009) Annexin A2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation. *J Biol Chem* 284: 1604-1611
48. Zibouche M, Vincent M, Illien F, Gallay J, Ayala-Sanmartin J (2008) The N-terminal domain of annexin 2 serves as a secondary binding site during membrane bridging. *J Biol Chem* 283: 22121-22127
49. Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, Schuchman EH, Galione A, Platt FM (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med* 14: 1247-1255
50. Luo M, Hajjar KA (2013) Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond. *J Semin Thromb Hemost* 39: 338-346
51. Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D (2013) Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* 14: 6259-6305
52. Sun J, Bird CH, Salem HH, Bird P (1993) Association of annexin V with mitochondria. *FEBS Lett* 329: 79-83
53. Spreca A, Rambotti MG, Giambanco I, Pula G, Bianchi R, Ceccarelli P, Donato R (1992) Immunocytochemical localization of annexin V (CaBP33), a Ca²⁺-dependent phospholipid- and membrane-binding protein, in the rat nervous system and skeletal muscles and in the porcine heart. *J Cell Physiol* 152: 587-598
54. Bouter A, Carmeille R, Gounou C, Bouvet F, Degrelle SA, Evain-Brion D, Brisson AR (2015) Annexin-A5 and cell membrane repair. *Placenta* 36 Suppl 1: S43-49
55. Hawkins TE, Das D, Young B, Moss SE (2002) DT40 cells lacking the Ca²⁺-binding protein annexin 5 are resistant to Ca²⁺-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8054-8059
56. Lee BH, Kim JM, Heo SH, Mun JH, Kim J, Kim JH, Jin HY, Kim GH, Choi JH, Yoo HW (2011) Proteomic analysis of the hepatic tissue of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats according to the natural course of Wilson disease. *Proteomics* 11: 3698-3705
57. Lambert O, Cavusoglu N, Gallay J, Vincent M, Rigaud JL, Henry JP, Ayala-Sanmartin J (2004) Novel organization and properties of annexin 2-membrane complexes. *J Biol Chem* 279: 10872-10882
57. Watson WD, Srivastava M, Leighton X, Glasman M, Faraday M, Fossum LH, Pollard HB, Verma A. (2004) Annexin 7 mobilizes calcium from endoplasmic reticulum stores in brain. *Biochim Biophys Acta* 1742: 151-160
58. Guo C, Liu S, Greenaway F, Sun MZ. (2013) Potential role of annexin A7 in cancers. *Clin Chim Acta* 423: 83-89
59. Freye-Minks C, Kretsinger RH, Creutz CE (2003) Structural and dynamic changes in human annexin VI induced by a phosphorylation-mimicking mutation, T356D. *Biochemistry* 42: 620-630
60. Alvarez-Guaita A, Vilà de Muga S, Owen DM, Williamson D, Magenu A, García-Melero A, Reverter M, Hoque M, Cairns R, Cornely R, Tebar F, Grewal T, Gaus K, Ayala-Sanmartín J, Enrich C, Rentero C

- (2015) Evidence for annexin A6-dependent plasma membrane remodeling of lipid domains. *Br J Pharmacol* 172: 1677-1690
61. Cornely R, Pollock AH, Rentero C, Norris SE, Alvarez-Guaita A, Grewal T, Mitchell T, Enrich C, Moss SE, Parton RG, Rossy J, Gaus K (2016) Immunol Annexin A6 regulates interleukin-2-mediated T-cell proliferation. *Cell Biol*, w druku, doi: 10.1038/icc.2016.15
 62. Woś M, Szczepanowska J, Piłkuła S, Tyłki-Szymańska A, Zablocki K, Bandorowicz-Pikuła J (2016) Mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from patients with Niemann-Pick type C disease. *Arch Biochem Biophys* 593: 50-59
 63. Qi H, Liu S, Guo C, Wang J, Greenaway FT, Sun MZ (2015) Role of annexin A6 in cancer. *Oncol Lett* 10: 1947-1952
 64. Cornely R, Rentero C, Enrich C, Grewal T, Gaus K (2011) Annexin A6 is an organizer of membrane microdomains to regulate receptor localization and signalling. *IUBMB Life* 63: 1009-1017
 65. Monastyrskaya K, Babychuk EB, Hostettler A, Wood P, Grewal T, Draeger A (2009) Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca²⁺ entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 284: 17227-17242
 66. Cubells L, Vilà de Muga S, Tebar F, Wood P, Evans R, Ingelmo-Torres M, Calvo M, Gaus K, Pol A, Grewal T, Enrich C (2007) Annexin A6-induced alterations in cholesterol transport and caveolin export from the Golgi complex. *Traffic* 8: 1568-1589
 67. Cubells L, Vilà de Muga S, Tebar F, Bonventre JV, Balsinde J, Pol A, Grewal T, Enrich C (2008) Annexin A6-induced inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 is linked to caveolin-1 export from the Golgi. *J Biol Chem* 283: 10174-10183
 68. García-Melero A, Reverter M, Hoque M, Meneses-Salas E, Koese M, Conway JR, Johnsen CH, Alvarez-Guaita A, Morales-Paytuyvi F, Elmaghrabi YA, Pol A, Tebar F, Murray RZ, Timpson P, Enrich C, Grewal T, Rentero C (2016) Annexin A6 and late endosomal cholesterol modulate integrin recycling and cell migration. *J Biol Chem* 291: 1320-1335
 69. de Diego I, Schwartz F, Siegfried H, Dauterstedt P, Heeren J, Beisiegel U, Enrich C, Grewal T (2002) Cholesterol modulates the membrane binding and intracellular distribution of annexin 6. *J Biol Chem* 277: 32187-32194
 70. te Vruchte D, Lloyd-Evans E, Veldman RJ, Neville DC, Dwek RA, Platt FM, van Blitterswijk WJ, Sillence DJ (2004) Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem* 279: 26167-26175
 71. Woś M, Bandorowicz-Pikuła J (2014) Udział aneksyn w procesie endocytozy i przekazywaniu sygnałów, w których uczestniczą receptory EGF. *Postepy Biochem* 60: 55-61
 72. Kim HJ, Kirsch T (2008) Collagen/annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization. *J Biol Chem* 283: 10310-10317
 73. Grskovic I, Kutsch A, Frie C, Groma G, Stermann J, Schlötzer-Schrehardt U, Niehoff A, Moss SE, Rosenbaum S, Pöschl E, Chmielewski M, Rapp G, Abken H, Bateman JF, Cheah KS, Paulsson M, Brachvogel B (2012) Depletion of annexin A5, annexin A6, and collagen X causes no gross changes in matrix vesicle-mediated mineralization, but lack of collagen X affects hematopoiesis and the Th1/Th2 response. *J Bone Miner Res* 27: 2399-2412
 74. Minashima T, Small W, Moss SE, Kirsch T (2012) Intracellular modulation of signaling pathways by annexin A6 regulates terminal differentiation of chondrocytes. *J Biol Chem* 287: 14803-14815
 75. Wang W, Xu J, Kirsch T (2005) Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Exp Cell Res* 305: 156-165
 76. Hoyal CR, Thomas AP, Forman HJ (1996) Hydroperoxide-induced increases in intracellular calcium due to annexin VI translocation and inactivation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 271: 29205-29210
 77. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, van der Nagel R, Morales R, Sun J, Cheng Z, Deng SX, de Windt LJ, Landry DW, Marks AR. (2005) Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc Natl Acad Sci* 102: 9607-9612
 78. Wang W, Xu J, Kirsch T (2003) Annexin-mediated Ca²⁺ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 278: 3762-3769
 79. Ortlund E, Chai G, Genge B, WU LN, Wuthier RE, Lebioda L (2004) Crystal structures of chicken annexin A5 in complex with functional modifiers Ca²⁺ and Zn²⁺ reveal Zn²⁺ induced formation of non-planar assemblies. *Annexins* 1: 183-190
 80. Zampighi GA, Hall JE, Kreman M (1985) Purified lens junctional protein forms channels in planar lipid films. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8468-8472
 81. Friedman JR, Lackner LL, West M, Dibenedetto JR, Nunnari J, Voeltz G K (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334: 358-362
 82. Otera H, Wang C, Cleland M M, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191: 1141-1158
 83. Dikov D, Reichert A S (2011) How to split up: Lessons from mitochondria. *EMBO J* 30: 2751-2753
 84. Huang P, Galloway CA, Yoon Y (2011) Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PLoS One* 6: e20655
 85. Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN (2013) An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* 339: 464-467
 86. Otera H, Mihara K (2011) Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases* 2: 167-172
 87. Chan DC (2012) Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 46: 265-287

Annexins in mitochondria

Joanna Bandorowicz-Pikuła^{1,✉}, Marcin Woś¹, Anna Sekrecka-Belniak^{1,2}, Sławomir Piłkuła¹

¹Department of Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura Street, 02-093 Warsaw, Poland

²Chair of Physics, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 159 Nowoursynowska Street, 02-776 Warsaw, Poland

✉e-mail: j.bandorowicz-pikuła@nencki.gov.pl

Key words: annexins, mitochondria, mitochondrial morphogenesis

ABSTRACT

Annexins form a family of membrane- and calcium-binding proteins, widely distributed in vertebrates. Their interactions with membranes are regulated by changes of intracellular concentration of calcium ([Ca²⁺]_{in}), pH, and the presence of negatively charged phospholipids as well as cholesterol in membranes. As protein participating in membrane fusion and sensors of a [Ca²⁺]_{in}. Annexins may regulate various signaling pathways including pathways involving protein kinase C (PKC isoforms). They also participate in membrane repair mechanisms (along with actin cytoskeleton and S100 protein), in the vesicular transport (cholesterol enriched domains) as well in intracellular calcium homeostasis and regulation of mitochondrial function and mitochondrial network structure. The last possibility is a topic of present review commemorating 90th Birthday of Professor Lech Wojtczak.