

JOLANTA BARAŃSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,
Zakład Biochemii Komórki
WarszawaCa²⁺ JAKO WTÓRNY PRZEKAŹNIK INFORMACJI

Badania ostatnich dwudziestu lat wykazały kluczową rolę Ca²⁺ jako wtórnego przekaźnika informacji w komórkach eukariotycznych (Famulski 1989, Kuźnicki 1988, 1989, Kuźnicki i Kordowska 1992, Daris 1992). Stężenie wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ reguluje tak różne procesy, jak poziom cyklicznych nukleotydów, wydzielanie hormonów oraz neurotransmiterów, proliferację i różnicowanie.

Stężenie Ca²⁺ wewnątrz komórki jest niskie i wynosi w komórce niepobudzonej od 10⁻⁷ M do 10⁻⁸ M (Daris 1992). Natomiast w pozakomórkowych płynach ustrojowych poziom tego jonu jest wysoki — rzędu 10⁻³ M. W zależności od stanu fizjologicznego komórki stężenie Ca²⁺ zmienia się i w komórce pobudzonej osiąga wartość 10⁻⁶ M. Poziom Ca²⁺ w komórce nie może przekroczyć pewnego krytycznego stężenia, gdyż jon ten w wysokich stężeniach jest cytotoksyczny. Ta konieczność utrzymania określonego poziomu Ca²⁺ jest możliwa jedynie dzięki skomplikowanemu układowi pomp, wymiennicy i kanałów, poprzez które nadmiar Ca²⁺ jest usuwany z komórki na zewnątrz lub magazynowany w wewnątrzkomórkowych organellach.

Za aktywny transport Ca²⁺ na zewnątrz komórki odpowiada enzym błony plazmatycznej, Ca²⁺,Mg²⁺-ATPaza, zwana także pompą wapniową. ATPaza ta pompuje Ca²⁺ w stosunku stechiometrycznym ATP/Ca²⁺ = 1:1 (Carafoli 1992). Można ją także określić jako ATPazę Ca²⁺/H⁺, ponieważ transportuje jony wapnia na wymianę z jonami wodoru. Enzym ten jest aktywowany przez kalmodulinę, a także regulowany przez kinazy białkowe i fosfatazy (Famulski 1989, Carafoli 1992). Innym systemem, dzięki któremu Ca²⁺ wydostaje się na zewnątrz komórki jest tak zwany wymiennicz wapniowo-sodowy. Wymiennicz ten czerpie energię z elektrochemicznego gradientu jonów sodu utrzymywanego przez ATPazę

Wykaz skrótów używanych w tekście: DAG — 1,2-diacylglicerol; InsP₃ — trisfosfoinozytol, (inozytolo(1,4,5)trisfosforan); InsP₃R — receptor trisfosfoinozytolu; PLC — fosfolipaza C; PKC — kinaza białkowa C; PtdIns(4,5)P₂ — fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; RianR — receptor rianodinowy.

zależną od jonów sodu i potasu. Proces ten jest elektrogeny i w pewnych warunkach odwracalny (Famulski 1989, Kuźnicki 1989).

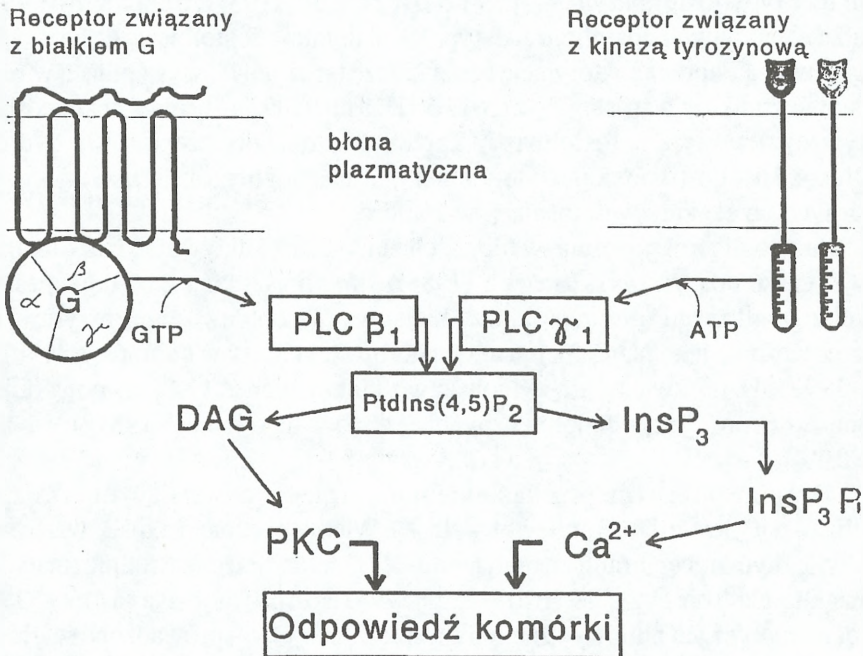
Poócz powyższych mechanizmów odpowiedzialnych za aktywny transport Ca^{2+} na zewnątrz komórki, regulacja poziomu tego jonu zachodzi również dzięki wnikaniu Ca^{2+} z cytoplazmy do organelli wewnątrzkomórkowych, takich jak siateczka śródplazmatyczna (retikulum endoplazmatyczne) i mitochondria. Główną rolę w utrzymaniu homeostazy wapniowej odgrywa jednak siateczka śródplazmatyczna (Berridge 1993, Poddana i Barańska 1991). Ca^{2+} do wnętrza tej organelli jest pompowany przez $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPazę. Enzym ten, występujący w retikulum sarkoplazmatycznym komórek mięśni i retikulum endoplazmatycznym komórek niemięśniowych, różni się szeregiem właściwości od ATPazy występującej w błonie plazmatycznej. Ca^{2+} do wnętrza tych organelli jest pompowany w stosunku stechiometrycznym $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+} = 1:2$ (Carafoli 1992). Zmagazynowany wapń wewnątrz retikulum jest związany z określonymi białkami wiążącymi wapń — kalsekwestryną i kalretikulina (Berridge 1993), a jego stężenie osiąga wysokie, milimolarne wartości. Z kolei, z wnętrza tych struktur jony wapnia są uwalniane do cytoplazmy poprzez kanały specyficznych receptorów (Berridge 1993, Poddana i Barańska 1991, Barańska 1992), których działanie zostanie omówione poniżej.

W odróżnieniu od procesów związanych z usuwaniem nadmiaru Ca^{2+} z cytoplazmy, mających na celu utrzymanie wapniowej homeostazy, zwiększenie poziomu Ca^{2+} w komórce powoduje kaskadę wydarzeń biochemicznych, prowadzących w efekcie do określonej odpowiedzi metabolicznej. I tak na przykład zgodny z gradientem stężeń ruch jonów wapnia do pobudzonych komórek nerwowych powoduje uwolnienie z nich neurotransmitera. Gdy w rezultacie przedłużonego czasu trwania potencjału czynnościowego więcej jonów wapnia napływa do zakończenia presynaptycznego, to powoduje to uwolnienie większej ilości neuroprzekaznika. Wnikanie Ca^{2+} do wnętrza komórek pobudliwych zachodzi z udziałem heterogennej klasy białek tworzących plazmatyczne kanały jonowe zależne od napięcia (Tsien i Tsien 1990). Jak dotąd w neuronach opisano cztery typy takich kanałów i określono je jako kanały T, L, N i P (Snutch i Reiner 1992). Kanały te są aktywowane przez depolaryzację i wykazują 1000-krotną preferencję wobec Ca^{2+} , w stosunku do Na^+ i K^+ . Różnią się one między sobą właściwościami biofizycznymi i farmakologicznymi (Daris 1992, Tsien i Tsien 1990, Snutch i Reiner 1992). Kanały jonowe przez które wnika Ca^{2+} do komórek niepobudliwych nie zostały jeszcze szczegółowo scharakteryzowane.

Wzrost poziomu wapnia w komórce jest nie tylko związany z wnikaniem tego jonu do jej wnętrza z przestrzeni pozakomórkowych. Pod wpływem różnorodnych bodźców następuje mobilizacja Ca^{2+} w komórce nawet w nieobecności tego jonu w środowisku zewnętrznym (Berridge 1993). Jest to spowodowane uwalnianiem Ca^{2+} do cytoplazmy z wewnątrzkomórkowych magazynów (Berridge 1993, Poddana i Barańska 1991, Barańska 1992). Proces ten, dość dobrze

poznany, jest związany z hydrolizą znajdujących się w błonie plazmatycznej fosfolipidów inozytoliowych, a dokładniej jednego z nich — fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu (PtdIns(4,5)P₂) (Berridge 1993, Poddana i Barańska 1991, Barańska 1992). Znana jest także sekwencja zdarzeń prowadząca od bodźca działającego na określony receptor do mobilizacji Ca²⁺ w komórce (rys. 1). Wiadomo zatem, że substancja sygnałowa działając na receptor przekazuje sygnał bądź poprzez białko G na specyficzną fosfolipazę C, bądź też receptor kinazo-tyrozynowy aktywuje bezpośrednio enzym z pominięciem białka G. Zaaktywowane fosfolipazy działają na PtdIns(4,5)P₂ powodując powstanie trisfosfoinozytolu (InsP₃) i 1,2-diacylglicerolu (DAG) jako produktów rozpadu tego fosfolipidu (rys. 1).

Omawiając dokładniej ten schemat trzeba nieco uwagi poświęcić białkom G, tworzącym funkcjonalny kompleks z niektórymi receptorami (jak np. receptory α -adrenergiczne, D₂-dopaminergiczne, czy metabotropowe dla glutaminianu).



Rys. 1. Przekształcenia wewnątrzkomórkowe prowadzące do powstania wtórnych przekazników informacji w komórce.

Sygnał zewnętrzny jest przekazywany albo przez receptory związane z trójpodjednostkowym białkiem G, lub przez receptory związane z kinazą tyrozynową na dwa typy fosfolipazy C: PLC β_1 i PLC γ_1 . Zaktywowany enzym hydrolizuje fosfolipid inozytoliowy fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan (PtdIns(4,5)P₂). W wyniku hydrolizy powstają wtórne przekazniki informacji: 1,2-diacylglicerol (DAG), oraz trisfosfoinozytol (InsP₃). Diacylglicerol aktywuje kinazę białkową C (PKC). InsP₃ łączy się z receptorem (InsP₃R) znajdującym się w błonie siateczki śródplazmatycznej (endoplazmatyczne retikulum) i uwalnia z wnętrza tej struktury Ca²⁺. Ca²⁺ jest także wtórnym przekaznikiem informacji w komórce i razem z PKC powoduje określoną odpowiedź komórki na działającą na nią sygnał.

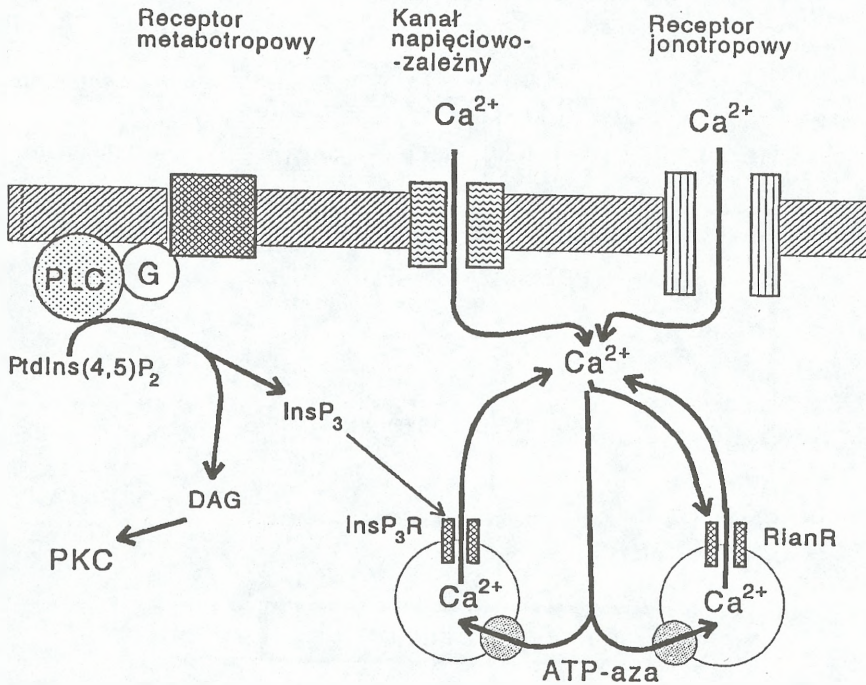
Białka G tworzą rodzinę homologicznych wielopodjednostkowych białek wiążących i hydrolizujących GTP. Składają się z trzech podjednostek α , β i γ , i charakteryzują ogromną różnorodnością (Berridge 1993, Hepler i Gilman 1992). W ciągu ostatnich dwóch lat udało się oczyścić do homogenności wiele podjednostek α , a także $\beta\gamma$ tych białek (Hepler i Gilman 1992). Zaktywowanie białka G powoduje dysocjację podjednostki α od kompleksu $\beta\gamma$. Następnie od podjednostki α odłącza się związana z nią cząsteczka GDP, a przyłącza GTP. Najnowsze badania wykazały, że nie tylko podjednostka α białka G, lecz także kompleks $\beta\gamma$ jest zdolny do aktywowania określonych form izomerycznych fosfolipazy C. Po końcowej reakcji aktywacji, GTP jest hydrolizowany poprzez GTPazę związaną z podjednostką α , po czym następuje reasocjacja i połączenie z powrotem wszystkich trzech podjednostek białka G w formę nieaktywną.

Fosfolipaza C hydrolizująca $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ należy także do rodziny enzymów posiadających liczne formy izomeryczne (Liscovitch 1992). Wyróżniamy obecnie trzy typy fosfolipazy C — β , γ i δ (Berridge 1993, Rhee i Choi 1992). Białka G aktywują fosfolipazę C typu β , natomiast fosfolipaza C typu γ jest aktywowana poprzez fosforylację przez kinazę tyrozynową występującą w receptorach czynników wzrostu (Pozin i Williams 1992). Rysunek 1 przedstawia aktywację dwu typów fosfolipazy C przez dwa rodzaje receptorów i hydrolizę $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ do trisfosfoinozytolu (InsP_3) i diacyloglicerolu (DAG) — dwóch wtórnych przekaźników informacji w komórce.

Diacyloglicerol pozostaje w błonie plazmatycznej i aktywuje kinazę białkową C. Od czasu odkrycia Nishizuka (1984), który opisał kinazę białkową zależną od diacyloglicerolu (nazwaną kinazą białkową C), lipidowi temu przypisuje się duże znaczenie jako naturalnemu aktywatorowi tej kinazy w komórce (Nishizuka 1992). DAG zwiększa powinowactwo kinazy wobec Ca^{2+} , co powoduje jej pełną aktywność już w fizjologicznych stężeniach tego jonu (Nishizuka 1984, 1992).

Drugim wtórnym przekaźnikiem informacji powstającym z rozpadu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ jest trisfosfoinozytol — InsP_3 . Wiemy obecnie, że InsP_3 wiąże się ze specyficznymi receptorami znajdującymi się w błonie siateczki śródplazmatycznej i uwalnia Ca^{2+} do cytosolu (Berridge 1993, Poddana i Barańska 1991). Badania dotyczące budowy i funkcji receptora InsP_3 były prowadzone w głównej mierze na neuronach Purkinje'go w mózdzku (Poddana i Barańska 1991, Gill 1989). Neurony te mają wyjątkowo duże ilości receptorów tego typu (Henzi i MacDermott 1992). Receptor ten jest tetramerem, którego podjednostki otaczają kanał, przez który Ca^{2+} z wnętrza siateczki śródplazmatycznej zostaje uwolniony do cytosolu. InsP_3 wiążąc się z receptorem moduluje tetramer powodując otwieranie kanału (Poddana i Barańska 1991, Gill 1989, Henzi i MacDermott 1992). Badania prowadzone w pracowni Snydera pozwoliły poznać nie tylko własności tego białka receptorowego, ale i jego budowę (Ferris i Snyder 1992).

Wykazano także, że w neuronach znajduje się jeszcze inny typ receptora wewnątrzkomórkowego; odpowiedzialnego za uwalnianie Ca²⁺. Jest on podobny do receptora rianodinowego mięśni szkieletowych (Gill 1989). Otwieranie kanału tego receptora jest indukowane przez Ca²⁺, w tak zwanym procesie „calcium induced – calcium release” (Berridge 1993, Henzi i MacDermott 1992). Ponieważ receptor ten, podobnie jak mięśniowy, wiąże alkaloid roślinny — rianodinę, jest on także nazywany receptorem rianodinowym. W tkance nerwowej dokładnie opisano i scharakteryzowano powyższe dwa typy receptorów, tak pod względem morfologicznym, jak i funkcjonalnym (Berridge 1993, Henzi i MacDermott 1992). W neuronach oba typy receptorów występują w siateczce śródplazmatycznej. Ze względu na heterogenność budowy tej organelli wydaje się, że zawiera ona dwie różne, oddzielone od siebie pule zmagazynowanego wapnia, uwalniane do cytoplazmy bądź przez receptor rianodinowy, bądź trisfosfoinozytowy (Henzi i MacDermott 1992). Rysunek 2 ilustruje przebieg działania

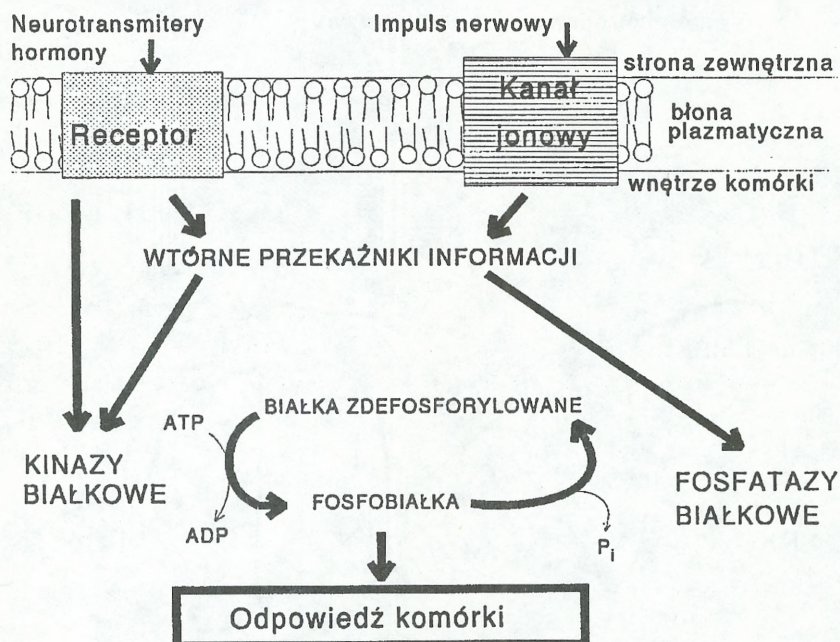


Rys. 2. Schemat aktywacji receptorów trisfosfoinozytowego (InsP₃R) i rianodinowego (Rian R) w endoplazmatycznym retikulum neuronów.

Agonista oddziałuje na znajdujący się w błonie plazmatycznej receptor metabotropowy. Sygnał poprzez białko G jest przekazywany na fosfolipazę C (PLC), która hydrolizuje fosfolipid PtdIns(4,5)P₂ powodując powstanie diacylglicerolu (DAG) i trisfosfoinozytola (InsP₃). InsP₃ łączy się z receptorem trisfosfoinozytowym (InsP₃R) w błonie endoplazmatycznego retikulum powodując otwarcie kanału i uwolnienie Ca²⁺ do cytosolu. Aktywacja kanałów napięciowo-zależnych i jonowych kanałów receptorowych powoduje wnikanie zewnętrznego Ca²⁺ do wnętrza komórki. Ca²⁺ aktywuje receptor rianodinowy (RianR) powodując także uwolnienie Ca²⁺, z prawdopodobnie innej puli tej organelli. Do wnętrza tych struktur jony wapnia są pompowane przez Ca²⁺,Mg²⁺-ATPazę (ATP).

InsP₃ i Ca²⁺ na oba receptory. Uwolnienie Ca²⁺ przez InsP₃ aktywuje kanał rianodinowy. Opróżnienie magazynów wewnątrzkomórkowych aktywuje kanały znajdujące się w błonie plazmatycznej komórki, co powoduje dopływ zewnętrznego Ca²⁺ do jej wnętrza. Zwiększenie zawartości Ca²⁺ w cytosolu działa hamująco na oba receptory. Kanały ich zamykają się, a jony Ca²⁺ wchodzą do organelli poprzez układ ATPazy. Powoduje to zmniejszenie stężenia Ca²⁺ w cytoplazmie, ponowne otwarcie kanałów receptorowych siateczki śródplazmatycznej i uwolnienie Ca²⁺. Sądzi się, że ten proces może być przyczyną oscylacji wapnia w komórce (Ber ridge 1993, Henzi i MacDermott 1992).

Wzrost poziomu wapnia powoduje zawsze fosforylację określonych białek. Fosforylacja ta następuje jako wynik aktywacji przez wapń kinazy białkowej II (zależnej od Ca²⁺ i kalmoduliny) oraz kinazy białkowej C (zależnej od Ca²⁺, diacyloglicerolu i fosfatydyloseryny) (Hemmings i współaut. 1989). A zatem Ca²⁺, jako wtórny przekaźnik informacji, powodując fosforylację białek prowadzi do określonej odpowiedzi metabolicznej komórki (rys. 3). Uwalnianie neurotrans-



Rys. 3. Schemat regulacji funkcji komórki przez sygnały zewnątrzkomórkowe działające poprzez wtórne przekaźniki informacji na fosforylację i defosforylację białek.

mitterów przez napływ Ca²⁺ do neuronu presynaptycznego jest doskonałym przykładem ilustrującym w jaki sposób następuje przekazywanie informacji w komórce poprzez ten proces (Hemmings i współaut. 1989). Mianowicie, w uwalnianiu neurotransmiterów bierze udział synapsyna — białko wiążące się z pęcherzykiem synaptycznym. To połączenie unieruchamia pęcherzyk poprzez związanie go

z cytoszkieletem. Fosforylacja synapsyny powoduje odłączenie białka od pęcherzyka, który dzięki temu uzyskuje możliwość przesuwania się w kierunku szczeliny synaptycznej i uwolnienia do niej neurotransmiterów. Fosforylacja ta odbywa się poprzez zależną od Ca²⁺ i kalmoduliny kinazę białkową II. Pobudzenie komórki powoduje napływ jonów wapniowych do zakończenia presynaptycznego i aktywację przez Ca²⁺ tej kinazy. Ostatnio wykazano, że enzym ten stanowi integralną część błony pęcherzyka synaptycznego i do jego regulatorowego regionu wiąże się właśnie synapsyna (Benefenati i współaut. 1992). Zatem działający na komórkę zewnętrzny bodziec powoduje w niej wzrost poziomu wtórnego przekazywacza informacji — Ca²⁺, co prowadzi poprzez aktywację kinazy białkowej i fosforylację określonego białka do specyficznej odpowiedzi komórki.

Ca²⁺ AS THE SECOND MESSENGER

Summary

The intracellular concentration of free calcium ions fluctuates in response to a variety of stimuli and temporal and spatial distribution of calcium is an important factor in cellular signal transduction. Intracellular Ca²⁺ concentration can be elevated more than 100-fold above resting values by entry of Ca²⁺ across the plasma membranes or by its release from intracellular stores. Routes for Ca²⁺ entry include voltage-gated and receptor-gated ion channels. Activation of a variety of cell surface receptors results in the phospholipase C catalyzed hydrolysis of a plasma membrane phospholipid, phosphatidylinositol 4,5-diphosphate, with concomitant formation of inositol 1,4,5-triphosphate (InsP₃) and diacylglycerol. InsP₃ stimulates Ca²⁺ release from components of the endoplasmic reticulum. There are two Ca²⁺ stores in this organelle, one released by InsP₃, and the other released by Ca²⁺ itself in a process referred to as the Ca²⁺ induced Ca²⁺ release. These events are mediated by two types of receptor channels that span the membrane of the endoplasmic reticulum. An increase in the intracellular concentration of Ca²⁺ can trigger physiological responses as varied as muscle fiber concentration, cellular proliferation, secretion, metabolic adjustments, and changes in gene expression.

LITERATURA

- Barańska J., 1992. *Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce*. Monografie, Copyright by Polskie Towarzystwo Biochemiczne, wyd. I, 1–33.
- Benefenati F., Valtorta F., Rubenstein J. L., Gorelick F. S., Greengard P., Czernik A. J., 1992. *Synaptic vesicle-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I*. Nature 359, 417–420.
- Berridge, M. J., 1993. *Inositol trisphosphate and calcium signaling*. Nature 361, 315–3259.
- Carafoli E., 1992. *The Ca²⁺ pump of the plasma membrane*. J. Biol. Chem., 267, 2115–2118.
- Daris T. N., 1992. *What's new with calcium ?* Cell, 71, 557–564.
- Famulski K. S., 1989. *Transport jonów wapnia przez błonę komórkową* Post. Biochem. 35, 493–511.
- Ferris C. D., Snyder S. H., 1992. *Inositol phosphate receptors and calcium disposition in the brain*. J. Neurosci. 12, 1567–1574.
- Gill D. L., 1989. *Receptor kindships revealed*. Nature 342, 16–18.

- Hemmings H. C., Jr., Nairn A. C., McGuinness T. L., Huganir R. L., Greengard P., 1989. *Role of protein phosphorylation in neuronal signal transduction*. FASEB J. 3, 1583–1592.
- Henzi V., MacDermott A. B., 1992. *Characteristics and function of Ca^{2+} and inositol 1,4,5-triphosphate-releasable stores of Ca^{2+} in neurons*. Neuroscience 46, 251–273.
- Hepler J. R., Gilman A. G., 1992. *G proteins*. TIBS 17, 383–387.
- Kuźnicki J., 1988. *Transport i funkcje jonów wapnia u Eukariota*. Kosmos 37, 197–217.
- Kuźnicki J., 1989. *Transport i funkcja jonów wapnia u Eukariota*. [W:] *Fizjologia i farmakologia błony komórkowej*. B. Przewłocka (red.), 103–122. Ossolineum.
- Kuźnicki J., Kordowska J., 1992. *Białka wiążące wapń jako markery stanów patologicznych*. Kosmos 41, 105–121.
- Liscovitch M., 1992. *Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases*. TIBS 17, 393–399.
- Nishizuka Y., 1984. *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion*. Nature 308, 693–698.
- Nishizuka Y., 1992. *Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C*. Science 258, 607–614.
- Poddana H., Barańska J., 1991. *Udział polifosfoinozytoli w przetwarzaniu informacji w komórkach*. Post. Biochem. 37, 2–5.
- Pozin M. J., Williams L. T., 1992. *Triggering signaling cascades by receptor tyrosine kinases*. TIBS 17, 374–378.
- Rhee S. G., Choi K. D., 1992. *Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes*. J. Biol. Chem. 267, 12393–12396.
- Snutch T. P., Reiner P. B., 1992. *Ca^{2+} channels diversity of forms and function*. Current Opinion in Neurobiology 2, 247–253.
- Tsien R. W., Tsien R. Y., 1990. *Calcium channels, stores and oscillations*. Annu. Rev. Cell. Biol. 6, 715–760