

Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi z wdzięcznością za wieloletnią współpracę, dzięki której $\Delta G = RT \ln([A_2]/[A_1]) + zF\Delta V$ znaczy więcej

SŁAWOMIR PIKUŁA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, Warszawa

ATPaza Z BŁON SARKOPLAZMATYCZNEGO RETIKULUM, TRANSPORTUJĄCA JONY WAPNIA

*„I was always led in research by my conviction that the primitive basic functions of living matter are brought about by ions, ions being the only powerful tools which life found in the sea water where it originated”
Albert Szent-Györgyi, Studies from the Institute of Medical Chemistry, University of Szeged, 1941*

AKTYWNY TRANSPORT JONÓW

Różnice pomiędzy składem chemicznym środowiska pozakomórkowego a cytoplazmą i wnętrzem organelli komórkowych wynikają z przebiegu procesów życiowych, ale stanowią również ich podstawę. Różnice te powstają dzięki właściwości błon biologicznych, polegającej na selektywnym transporcie różnorodnych substancji chemicznych, a zatem na utrzymywaniu równowagi pomiędzy procesami nieskrępowanego kontaktu wymienionych środowisk i zachowania ich odrębności. Transport bardzo wielu związków chemicznych i substancji organicznych przez błony biologiczne zachodzi wbrew ich elektrochemicznemu gradientowi i dlatego wymaga wydatku energii. Pierwotnym źródłem tej energii jest światło dla organizmów fotosyntetyzujących lub procesy oddechowe dla organizmów heterotroficznych. W komórkach organizmów eukariotycznych wykorzystanie obu źródeł energii prowadzi do powstania elektrochemicznego gradientu stężeń protonów (siła protonomotoryczna — $\Delta\mu_{\text{H}^+}$) w płaszczynie poprzecznej błon wyspecjalizowanych organelli komórkowych, mitochondriów i chloroplastów (NICHOLLS i współaut. 1992, DE MEIS 1993, SKULACHEV 1994). Oba składniki $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, chemiczny gradient stężeń protonów i elektryczny potencjał błonowy, mogą bezpośrednio służyć jako siła napędowa transportu różnych

substancji w płaszczynie poprzecznej błon. W błonie plazmatycznej, gdzie znajdują się ważne systemy transportu odpowiedzialne za przeżycie komórki, energia w takiej formie nie jest wykorzystywana w sposób bezpośredni. Dlatego też w mitochondriach $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ulega zamianie na chemiczny związek przejściowy, adenozyntrojfosforan (ATP), w wyniku działalności syntazy ATP (powszechnie określanej mianem ATPazy typu F_0F_1). ATP jest transportowany z mitochondriów do cytoplazmy przez translokazę nukleotydów adeninowych zależną od potencjału transmembranowego, która katalizuje elektrogenną wymianę ATP/ADP/AMP (APRILLE 1993). Zmagazynowana w ATP energia jest przekształcana z powrotem w elektrochemiczny gradient stężeń jonów w płaszczynie poprzecznej błon, dzięki czemu zachodzi przez nie aktywny transport substancji. W błonach endosomów, lizosomów i pęcherzyków wydzielniczych ATP jest zużywany na powtórne wytworzenie $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ w wyniku działania ATPazy typu V (FILLINGAME 1996), enzymów przypominających mitochondrialną ATPazę typu F_0F_1 . W płaszczynie poprzecznej błony plazmatycznej, dzięki hydrolizie ATP i uwolnionej w ten sposób energii, wytwarza się elektrochemiczny gradient stężeń jonów, przeważnie jednak nie H^+ , a raczej Na^+ , K^+ i Ca^{2+} . W procesie tym biorą

udział hydrolazy ATP, ATPazy typu P, różniące się w znaczny sposób od ATPaz typu V i F_0F_1 (NICHOLLS i współaut. 1992, DE MEIS 1993, INESI 1994, FILLINGAME 1996). Różnice te dotyczą nie tylko struktury wymienionych białek, ale przede wszystkim mechanizmu katalizowanej przez nie reakcji. W przypadku ATPaz typu P w cyklu katalitycznym enzymów tej klasy zachodzi autofosforylacja białka, zjawisko nie znane wśród innych typów ATPaz. Powstanie gradientu stężeń kationów (na przykład Na^+) w płaszczyźnie poprzecznej błony wymaga bezpośredniego zużycia energii zmagazynowanej w ATP, w tym przypadku przez Na^+, K^+ -ATPazę, i transport jonów określany jest mianem pierwotnego transportu czynnego. Mechanizm tego typu transportu zakłada istnienie pojedynczego białka wytwarzającego elektrochemiczny gradient stężeń nieorganicznego kationu (INESI 1994, ANDERSEN i VILSEN 1995). Elektrochemi-

czny gradient stężeń jonów jest wykorzystywany jako siła napędowa wielu procesów transportowych (wtórny transport czynny). We wszystkich przypadkach transport związków organicznych, istotnych dla przeżycia komórki, takich jak aminokwasy czy glukoza, lub produktów końcowych ich metabolizmu, których komórka musi się pozbyć, odbywa się z udziałem specyficznych białek transportujących.

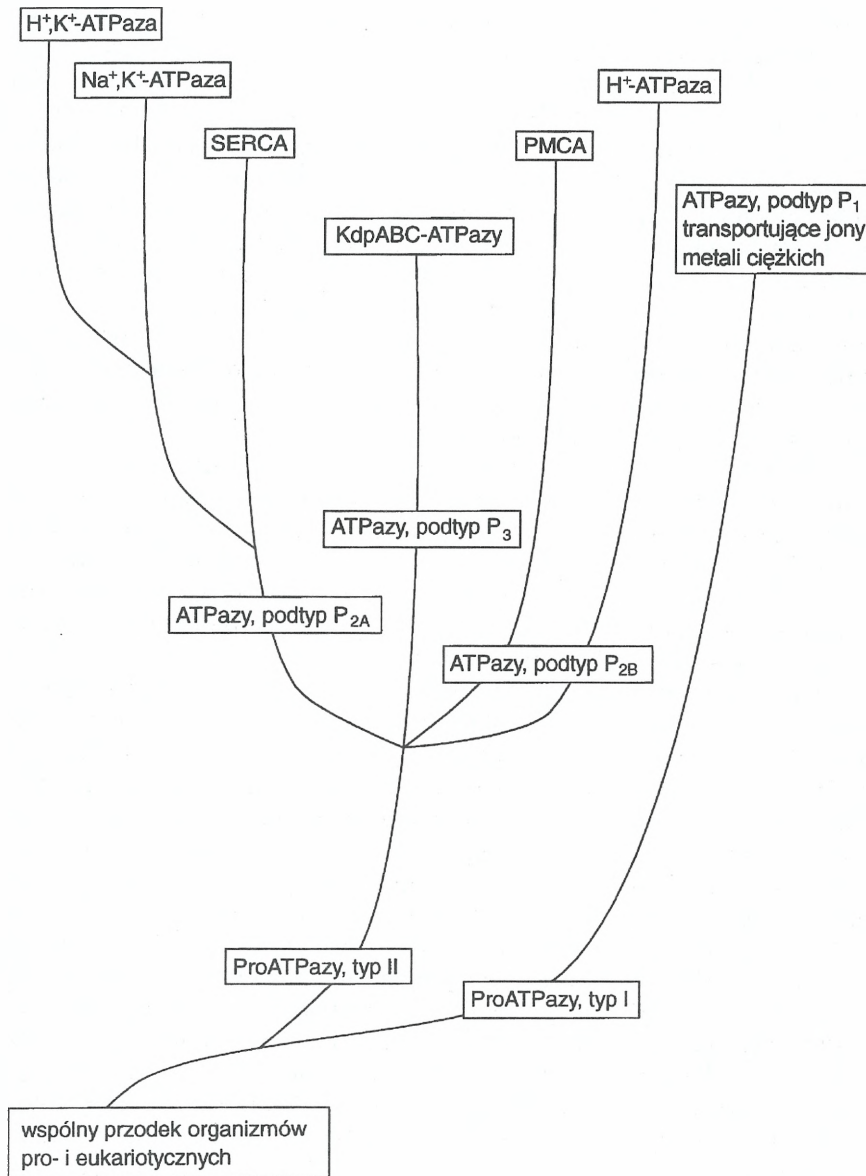
Opisany model, czerpiący z podstaw teorii chemiosmotycznej Mitchella (NICHOLLS i współaut. 1992, DE MEIS 1993, KRUPKA 1994, SKULACHEV 1994) zyskał powszechną akceptację między innymi ze względu na podobieństwa pomiędzy ATPazami, choć funkcje jakie pełnią te enzymy mogą być tak różne, jak produkcja kwasu w żołądku, uwalnianie neurotransmiterów czy synteza ATP w trakcie fotosyntezy (DE MEIS 1993, CARAFOLI 1994, CARAFOLI i STAUFFER 1994, MOLLER i współaut. 1996).

EWOLUCJA ATPaz TYPU P

Wszystkie żyjące na naszej planecie organizmy pochodzą prawdopodobnie od jednego wspólnego przodka. W wyniku procesu dywergencji wyewoluowały ostatecznie w trzy królestwa: Eubakteriae, Archaeobakteriae i Eukariota (IWABE i współaut. 1989, BROWN i DOOLITTLE 1995). W tym samym czasie ewoluowały białka odpowiedzialne za transport elektrolitów i metabolitów do i z komórki. Mimo że białka te wykorzystują różne źródła energii, a także różnią się mechanizmami transportu, wykazują zadziwiające podobieństwa w budowie. Podobieństwa te opierają się na istnieniu jednostki funkcjonalnej składającej się z ciasno upakowanych sześciu struktur α -helikalnych, które mogą stanowić całość lub część kanału błonowego. Wydaje się, że niektóre z rodzin białek transportujących powstały na drodze konwergencji, inne ze wspólnej cząsteczki prekursorowej na drodze dywergencji. Proces ten zachodził w różnym czasie w toku ewolucji (SAIER 1993).

Na podstawie budowy i mechanizmu działania można wyróżnić następujące rodziny białek transportujących: a) kanały jonowe zależne od potencjału błonowego; b) główne integralne białka błonowe (MIP, ang. major intrinsic protein, białko z komórek włóknistych soczewek ssaków, ChIP, białko tworzące porę dla wody w błonie ludzkich erytrocytów.); c) uniportery, symportery i antyportery (MFS, ang. major facilitator superfamily; APC, ang. transport proteins specific for amino acids, polyamines and choline; SSF, ang. sodium: solute symporter

family; SNF, ang. sodium:neurotransmitter symporters family); d) mitochondrialne białka nośnikowe; e) permeazy bakteryjne i f) systemy transportu wykorzystujące energię zmagazynowaną w ATP (ATPazy typu P, V, F_0F_1 , transportery należące do rodziny ABC, ang. ATP binding cassette) (SAIER 1993). W oparciu o dane zgromadzone na temat różnych ATPaz typu P, szczególnie transportujących jony Cu^+ , Cd^{2+} i Hg^{2+} (podtyp P_1) (LUTSENKO i KAPLAN 1995, SOLIOZ i VULPE 1996), przypuszcza się że proATPazy organizmów prokariotycznych powstały w trakcie ewolucji w celu regulacji stężenia jonów metali ciężkich w cytoplazmie komórek tych organizmów (MOLLER i współaut. 1996) (rys. 1). Większość występujących we współczesnych organizmach ATPaz typu P należy do podtypu P_2 , grupującego białka zdolne do transportu kationów o niższych masach atomowych (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Różna specyficzność tych enzymów w stosunku do transportowanych jonów jest związana prawdopodobnie ze zwiększoną liczbą domen transbłonowych ($M10-M11$), w porównaniu z podtypem P_1 ($M6$) (GREEN 1992, LUTSENKO i KAPLAN 1995, MOLLER i współaut. 1996). Trzeci podtyp P_3 (KdpABC-ATPazy) pod względem specyficzności w stosunku do transportowanych jonów metali przypomina podtyp P_2 z wyjątkiem tego, że enzymy tej grupy nie są zdolne do transportu kationów jako białka monomeryczne, a jedynie jako składnik bardziej skomplikowanego systemu katalitycznego (LUTSENKO i KAPLAN 1995, SOLIOZ i VULPE 1996).



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne ATPaz typu P.

ATPazy typu P istniały już we wczesnych etapach rozwoju organizmów żywych na naszej planecie, chociaż nie pełniły jeszcze w tym czasie kluczowej roli w utrzymaniu homeostazy kationów w cytoplazmie. U zarania ewolucji doszło do podziału enzymów tej grupy na białka transportujące jony metali ciężkich (typ I) i jony metali o niższych masach atomowych (typ II). Typ II w swej pierwotnej formie przetrwał do współczesnych czasów w postaci KdpABC-ATPaz organizmów prokariotycznych, takich jak Mg^{2+} -ATPaza *S. typhimurium* i Ca^{2+} -ATPaza *Synechococcus* PC-C7942. ATPazy te zalicza się do podtypu P₃. ATPazy SERCA, jakkolwiek w niewielkim stopniu przypominające Ca^{2+} -ATPazy współczesnych organizmów, ewoluowały prawdopodobnie przed powstaniem organizmów wielokomórkowych. Na^{+},K^{+} -ATPaza i H^{+},K^{+} -ATPaza pochodzą od ATPaz SERCA, z którymi tworzą wspólny podtyp P_{2A}. Enzymy te różnią się od ATPaz SERCA obecnością podjednostki β . ATPazy PMCA i H^{+} -ATPaza oddzieliły się wcześniej na drabinie ewolucyjnej od ATPaz SERCA, tworząc podtyp P_{2B}, o czym świadczą istotne różnice pomiędzy obiema grupami enzymów. W komórkach roślin i grzybów H^{+} -ATPazy przejęły od ATPaz typu F₀F₁ funkcję transportu protonów w płaszczyźnie poprzecznej błony plazmatycznej (MOLLER i współaut. 1996).

POMPY WAPNIOWE

Ca^{2+} -ATPazy (pompy wapniowe) są niezbędne w procesie usuwania Ca^{2+} z cytozolu zarówno przez błonę plazmatyczną na zewnątrz komórki, lub do przestrzeni wewnętrznej systemu kanalików i cystern błon endo(sarko)plazmatycznego retikulum (ER lub SR). Jakkolwiek Ca^{2+} -ATPazy z błony plazmatycznej i błon ER są bardzo do siebie podobne pod względem strukturalnym i pełnionej funkcji, istnieje efektywny mechanizm molekularny, który jest odpowiedzialny za to, że właściwe białka są wbudowywane w odpowiednie błony w trakcie procesu biogenezy (FOLETTI i współaut. 1995). Białka Ca^{2+} -ATPaz występujących w błonie plazmatycznej są kodowane przez cztery geny (*PMCA1*,

PMCA2, *PMCA3* i *PMCA4*), a w błonach wewnątrzkomórkowych przez trzy (*SERCA1*, *SERCA2* i *SERCA3*) (GROVER i KHAN 1992, WU i współaut. 1995). Izoformy *PMCA1* i 4 występują w większości komórek, podczas gdy izoformy *PMCA2* i 3 tylko w błonie komórek wyspecjalizowanych tkanek. Proces różnicowego składania (ang. alternative splicing) RNA prowadzi dodatkowo do zwiększenia liczby izoform enzymu (GROVER i KHAN 1992, CARAFOLI 1994, CARAFOLI i STAUFFER 1994). Izoformy te różnią się czułością na fosforylację przez zależną od cyklicznych nukleotydów kinazę białkową.

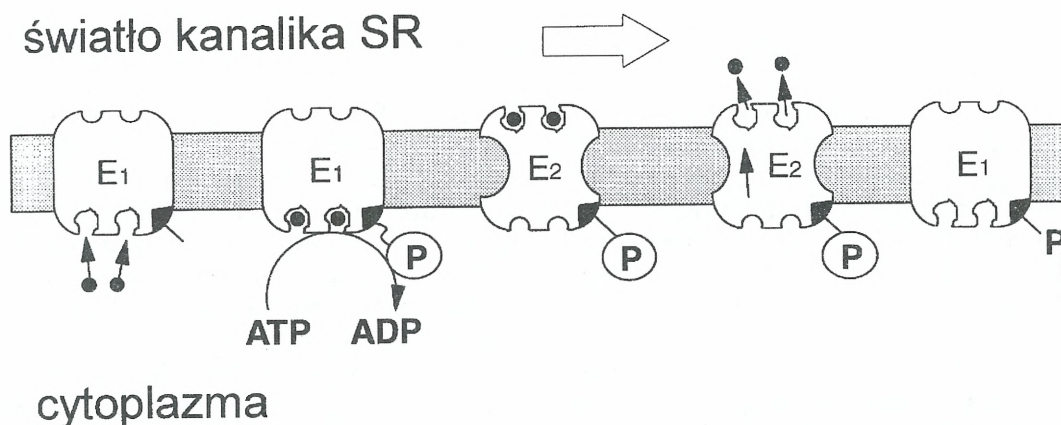
Pompy wapniowe z błony plazmatycznej są stymulowane przez kalmodulinę, podczas gdy

ATPazy kodowane przez geny *SERCA1* i *SERCA2* są stymulowane przez fosfolamban. Enzym będący produktem ekspresji genu *SERCA3* ulega fosforylacji przez zależną od cAMP kinazę białkową (GROVER i KHAN 1992, MacLennan i TOYOFUKU 1992). W przypadku genów rodziny *SERCA*, podobnie do *PMCA*, został także opisany proces różnicowego składania i wykazano, że ekspresja powstających izoform jest specyficzna dla tkanki i może ulegać zaburzeniu w wyniku transformacji nowotworowej. Zróżnicowanie tkankowe rozmieszczenia izoform Ca^{2+} -ATPaz oraz różne mechanizmy regulacji tych enzymów są odpowiedzialne za różnice w odpowiedzi komórek na pobudzenie oraz za ich różną plastyczność (GROVER i KHAN 1992).

Ca^{2+} -ATPaza z błony plazmatycznej, białko o masie cząsteczkowej 140 kDa, jest odpowiedzialna za regulację stężenia Ca^{2+} w komórce, a zatem jest zaangażowana w szeregu procesach, w których niewielkie zmiany stężenia Ca^{2+} ogrywają kluczową rolę (CARAFOLI 1994, CARAFOLI i STAUFFER 1994). Aktywność enzymu jest regulowana na wiele sposobów, oprócz kalmoduliny, między innymi przez anionowe fosfolipidy, fosforylację przez kinazy białkowe, a także proces oligomeryzacji cząsteczek enzymu (CARAFOLI 1994). C-końcowy rejon cząsteczki ATPazy, oddziałując z domoną położoną w pobliżu centrum aktywnego enzymu, obniża jego aktywność w stanie spoczynkowym (CARAFOLI i STAUFFER 1994). Transportującą jony wapnia ATPazę z błon ER(SR), białko o masie cząsteczkowej 110 kDa, charakteryzuje funkcjonalny związek pomiędzy domeną katalityczną enzymu, zlokalizowaną w części łańcucha polipeptydowego ekspozowanej do cytoplazmy (miejsce autofosforylacji), a rejonem odpowiedzialnym za wiązanie Ca^{2+} , zanurzonym w dwuwarstwie lipidowej. Domeny

te są oddzielone od siebie o 4–5 nanometrów i na obie wpływa związanie specyficznego inhibitora ATPazy, tapsigarginy, z cząsteczką białka (ANDERSEN i VILSEN 1995, HUSSAIN i współaut. 1995, WALDRON i współaut. 1995, MARTONOSI 1996). Opisany związek funkcjonalny stanowi mechanistyczną podstawę procesu translokacji Ca^{2+} w płaszczyźnie poprzecznej błony (MARTONOSI i współaut. 1987, MARTONOSI 1996). Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych jest osiągana w wyniku zależnego od ATP transportu Ca^{2+} przez błonę SR (MELZER i współaut. 1995). Proces ten ma znaczenie uniwersalne, nie tylko w kontroli ruchliwości, a także metabolizmu komórek.

Pełna maszyna molekularna procesu transportu Ca^{2+} zawiera się jedynie w cząsteczce Ca^{2+} -ATPazy (MACLENNAN i współaut. 1985, MARTONOSI i współaut. 1987, MACLENNAN i TOYOFUKU 1992, DE MEIS i współaut. 1996, MARTONOSI 1996). Aktywny transport Ca^{2+} jest stechiometrycznie związany z hydrolizą ATP. W cyklu katalicznym Ca^{2+} -ATPazy można wyróżnić następujące fazy: związanie dwóch jonów wapnia do miejsc w cząsteczce enzymu o wysokim powinowactwie w konformacji E_1 , po którym następuje fosforylacja grupy karboksylowej β reszty kwasu asparaginowego (w pozycji 351 łańcucha polipeptydowego ATPazy) w centrum aktywnym enzymu (ufosforylowany pośrednik, E-P) i powstanie przejściowej formy Ca^{2+} - E_1 -P. Zmiana konformacji enzymu z formy E_1 do E_2 (Ca^{2+} - E_1 -P) prowadzi do translokacji i uwolnienia Ca^{2+} do wnętrza kanalik SR (MARTONOSI 1995, 1996) (rys. 2). Przejście enzymu z formy E_1 w formę E_2 charakteryzuje się zmianami struktury drugorzędowej białka, powstaniem nowych struktur α -helikalnych i zmianami w zawartości struktur β (MARTONOSI 1996).



Rys. 2. Schemat reakcji składających się na cykl katalityczny Ca^{2+} -ATPazy z błon SR. Hydroliza ATP prowadzi do autofosforylacji białka enzymatycznego i transportu dwóch jonów wapnia w płaszczyźnie poprzecznej błony. Szczegółowe wyjaśnienia zamieszczono w tekście artykułu.

Ca^{2+} -ATPaza W REGULACJI STĘŻENIA JONÓW WAPNIA W KOMÓRCIE

Komórki zużywają energię między innymi na obniżenie stężenia Ca^{2+} w cytozolu do bardzo niskich wartości. Zewnątrzkomórkowy Ca^{2+} , wchodzący do komórki przez kanały wapniowe w błonie plazmatycznej, jest z powrotem transportowany na zewnątrz przez zależną od kalmoduliny Ca^{2+} -ATPazę lub wymienniczą $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Pula jonów wapnia, która wchodzi do komórki, jest bardzo szybko usuwana przez Ca^{2+} -ATPazę, która ma zdolność akumulacji Ca^{2+} w wyspecjalizowanych przedziałach ER (lub SR), wbrew gradientowi stężeń tego jonu, kosztem rozkładu wysokoenergetycznego wiązania fosforanowego w cząsteczce ATP (MARTONOSI i współaut. 1987, DE MEIS 1993, CARAFOLI 1994). W wyniku akumulacji Ca^{2+} jego stężenie w ER może wzrosnąć 10 000-krotnie; jakkolwiek kation ten nie występuje w formie wolnej, lecz przede wszystkim związanej z białkami wiążącymi Ca^{2+} (MILNER i współaut. 1992). Podobną zdolnością akumulacji charakteryzują się inne organelle komórkowe, jądro i mitochondria, lecz proces ten jest w przypadku tych organeli mniej wydajny.

Stymulacja komórek przez hormony, czynniki wzrostu i neurotransmitery, które są związane przez specyficzne receptory błonowe, prowadzi do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Uruchamiana jest wtedy kaskada zdarzeń prowadząca od zmian konformacyjnych receptora po związaniu ligandu, poprzez białka G aż do aktywacji fosfolipazy C- β . Ten ostatni enzym hydrolizuje 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu. Powstający (1,4,5)-trisfosforan inozytolu (InsP_3) wiąże się z receptorem dla tego związku zlokalizowanym w błonach ER. Receptor InsP_3 został oczyszczony (składa się on z czterech homologicznych peptydów o m. cz. 250 kDa każdy), a jego sekwencja jest poznana. Zrekonstruowany do błony lipidowej wykazuje cechy kanału. W komórce związanie ligandu z receptorem InsP_3 powoduje uwolnienie Ca^{2+} do cytoplazmy (< 30 msek). Podtrzymywanie stymulacji komórki prowadzi do autodegeneracji receptora i proces ten może być odpowiedzialny za regulację odpowiedzi komórki na pobudzenie. Wydaje się, że stymulacja komórki jest

związana z oscylacją wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , a częstość oscylacji, ale nie amplituda, zależy od stężenia ligandu (hormonu) (GROVER i KHAN 1992, BERRIDGE 1995, MELZER i współaut. 1995).

Kiedy w organizmie kręgowca włókno mięśnia szkieletowego ulegnie pobudzeniu przez impuls nerwowy, powstający potencjał błonowy ulega w ciągu milisekund rozprzestrzenieniu z miejsca pobudzenia wzdłuż całego włókna. Fala potencjału, docierając do systemu błon poprzecznych kanalików komórki mięśniowej, powoduje wypływ Ca^{2+} z cystern terminalnych SR, bowiem w komórkach mięśni szkieletowych występuje wyspecjalizowana forma kanału uwalniającego Ca^{2+} z systemu błon SR, będącego jednocześnie receptorem alkaloidu roślinnego, rianodyny (MELZER i współaut. 1995). Wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie jest bezpośrednią przyczyną skurczu mięśnia, gdyż Ca^{2+} wiążąc się z troponiną C inicjuje w ten sposób skurcz mięśnia. Proces kończy się w wyniku obniżenia stężenia Ca^{2+} w cytozolu komórki mięśniowej, dzięki działaniu Ca^{2+} -ATPazy, która katalizuje transport Ca^{2+} do wnętrza błon SR kosztem energii zmagazynowanej w ATP (MARTONOSI i współaut. 1987, MELZER i współaut. 1995). Od momentu odkrycia enzymu 30 lat temu znacznie wzrosła liczba danych na temat struktury i funkcji enzymu. Gen kodujący izoformę ATPazy z błon SR mięśni szkieletowych szybkich (*SERCA1*), a także geny kodujące inne izoformy enzymu, zostały sklonowane oraz przeprowadzono funkcjonalną ekspresję wymienionych białek w komórkach COS-1 (ANDERSEN i SORENSEN 1996). Dzięki zebranym informacjom zaproponowano model kinetyczny opisujący mechanizm transportu Ca^{2+} (DE MEIS 1993, INESI 1994, KRUPKA 1994, HAO i HARVEY 1995, MINTZ i GUILLAIN 1995, CANET i współaut. 1996) oraz wykazano istnienie ścisłych zależności pomiędzy transportem Ca^{2+} a strukturą ATPazy (ANDERSEN i VILSEN 1995, MARTONOSI 1995, 1996) (rys. 3). Wiedzę tę zdobyto między innymi dzięki otrzymaniu i analizie rentgenograficznej kryształów Ca^{2+} -ATPazy.

KRYSZTAŁY Ca^{2+} -ATPazy

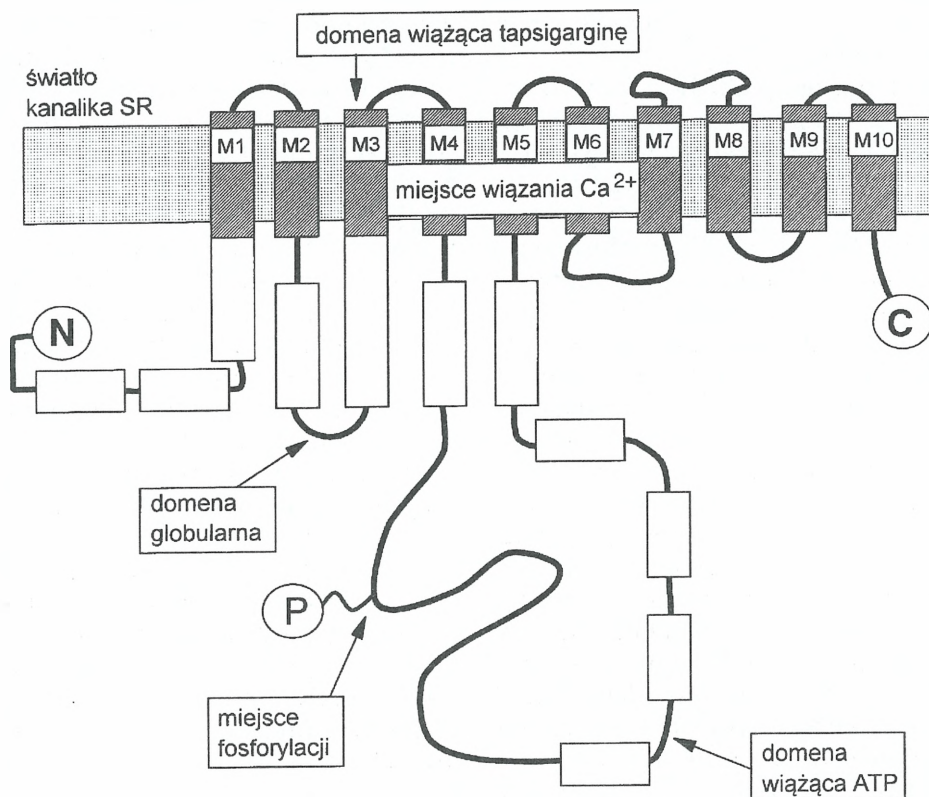
Precyzyjna wiedza na temat struktury makromolekuł: białek, kwasów nukleinowych, złożonych lipidów i cukrów stanowi podstawę dla zrozumienia ich funkcji. Metody krystalografii

czne stanowią nadal jedno z podstawowych narzędzi, które pozwala uzyskać taką wiedzę (MARTONOSI i współaut. 1991). Do chwili obecnej poznano atomową strukturę ponad 500

skryształizowanych białek. Jednak tylko kilka z nich to integralne białka błonowe, takie jak składniki centrów fotosyntetycznych bakterii purpurowych, kompleks białek fotosystemu II z chloroplastów roślin wyższych, białka fotosystemu I z ciepłolubnych cyjanobakterii, bakteriorodopsyna, poryna i maltoporyna z *E. coli* oraz syntaza prostaglandyny H ssaków (MARTONOSI i współaut. 1991).

W przypadku Ca^{2+} -ATPazy z błon SR mięśni szkieletowych stwierdzono, że dwa różniące się od siebie typy kryształów białka powstają w błonach SR w wyniku stabilizacji enzymu w jednej z dwóch form konformacyjnych E₁ lub E₂ (MARTONOSI i współaut. 1991). Typ o symetrii P2, indukowany przez jony wanadowe w środowisku pozbawionym Ca^{2+} , jest zbudowany z łańcuchów dimerów ATPazy układających się w prawoskrętną helisę. Odpowiada on strukturze i oddziaływaniom enzymu w konformacji E₂. W obecności 0,1 mM CaCl_2 lub stechiometrycznych stężeń jonów metali z grupy lantanowców (w środowisku o pH 8,0) w SR powstają kryształy o symetrii P1, które są zbudowane z monomerów ATPazy w konformacji E₁. Jakkolwiek

analiza tych kryształów okazała się użyteczna dla określenia makroskopowego kształtu cząsteczki enzymu i charakteru oddziaływań pomiędzy białkami w błonie, rozdzielczość w tym przypadku stanowiła granicę nie do przekroczenia. Nie można było zatem odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób Ca^{2+} są transportowane przez ATPazę na poziomie molekularnym (MARTONOSI i współaut. 1991). Stąd konieczne było otrzymanie właściwych trójwymiarowych kryształów ATPazy, rosnących w roztworze do wymiarów, które pozwoliłyby na ich analizę z zastosowaniem metody dyfrakcji promieni X. By uzyskać takie właśnie kryształy białka należało spełnić między innymi następujące wymagania: a) znaleźć warunki przeprowadzenia białka błonowego w formę rozpuszczalną, najbardziej zbliżone do warunków naturalnych czyli najlepiej naśladujące środowisko błonowe w celu zachowania aktywności enzymu (PIKUŁA i współaut. 1988, 1994), b) zapobiec inaktywacji enzymu, spowodowanej procesami denaturacji, oksydacji i proteolizy, c) stworzyć warunki, w których specyficzne oddziaływania pomiędzy hydrofilowymi rejonami cząsteczek ATPazy bę-

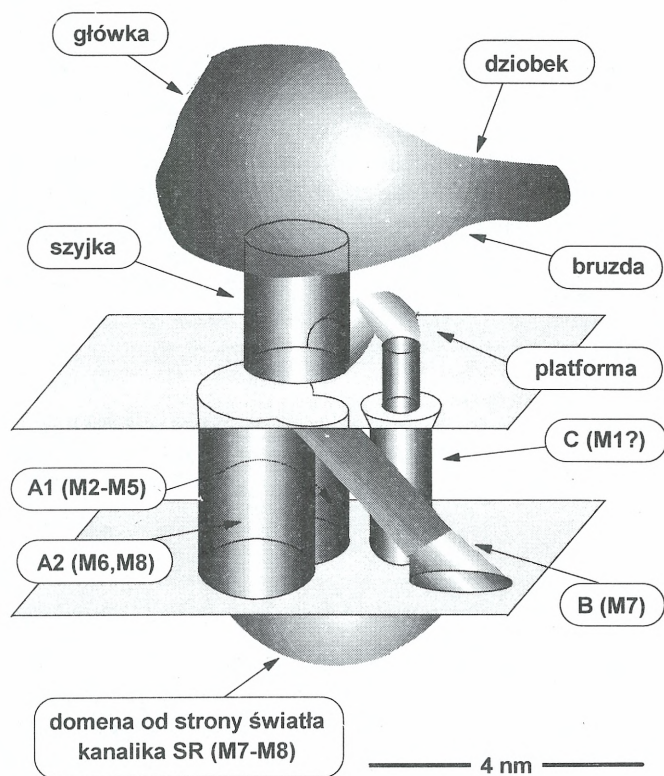


Rys. 3. Model przedstawiający rozmieszczenie domen funkcjonalnych w cząsteczce Ca^{2+} -ATPazy z błon SR, opracowany na podstawie przewidywań struktury drugorzędowej białka w oparciu o sekwencję aminokwasową enzymu.

Na rysunku zaznaczono dziesięć segmentów transmembranowych (M1-M10), a także te domeny w cząsteczce białka enzymatycznego, w obrębie których mutacje punktowe reszt aminokwasowych prowadziły do utraty przez ATPazę zdolności do wiązania Ca^{2+} lub transportu kationów (oznaczono jako miejsce wiązania jonów wapnia) (MACLENNAN i współaut. 1985, STOKES i współaut. 1994, ANDERSEN i VILSEN 1995). Szczegółowe wyjaśnienia zamieszczono w tekście artykułu.

dą przeważały nad oddziaływaniami hydrofobowymi prowadzącymi do agregacji cząsteczek enzymu (TAYLOR i współaut. 1988). W wyniku długoterminowej stabilizacji aktywności ATPazy po rozpuszczeniu enzymu w obecności właściwego detergentu (PIKUŁA i współaut. 1988) zaobserwowano powstawanie trójwymiarowych struktur krystalicznych enzymu (TAYLOR i współaut. 1988). Stwierdzono, że za powstawanie krystalicznych struktur enzymu jest odpowiedzialny wywołany przez Ca^{2+} proces oligomeryzacji cząsteczek ATPazy (KERESZTES i współaut. 1989).

Opierając się na powyższych kryteriach otrzymano kryształ białka, których analiza pozwoliła na zrekonstruowanie kształtu cząsteczki enzymu z rozdzielczością 1,4 nm (TOYOSHIMA i współaut. 1993, STOKES i współaut. 1994) (rys. 4), potwierdzającego istnienie hydrofilowego kanału w białku, przez który Ca^{2+} są transportowane do wnętrza kanalików SR. Model ten został potwierdzony także z zastosowaniem innych metod (BAYLE i współaut. 1995). Analiza krystalograficzna nie pozwala jednak ściśle odpowiedzieć na pytanie, jaki jest molekularny mechanizm działania takiego kanału.



Rys. 4. Model cząsteczki Ca^{2+} -ATPazy opracowany na podstawie danych uzyskanych w wyniku obserwacji mikroskopowych i analizy rentgenograficznej kryształów białka.

W części cząsteczki ATPazy znajdującej się w błonie wyróżniono trzy makrodomeny: A1-A2, B oraz C. Fragment łańcucha polipeptydowego znajdujący się od strony światła kanalików SR łączy domeny A i B. Domena A1 przechodzi w szyjkę, wiążącą część ATPazy zanurzoną w dwuwarstwie lipidowej błony z hydrofilową główką, wyeksponowaną po cytoplazmatycznej stronie błon SR. W główce tej jest zlokalizowane centrum aktywne enzymu. Domena A2 łączy się z domeną B i niewielkim fragmentem łańcucha polipeptydowego, eksponowanego po stronie ekstracytoplazmatycznej błony. Oznaczenia M1-M10 odpowiadają domenom transmembranowym zaznaczonym na rysunku 3 (TOYOSHIMA i współaut. 1993, STOKES i współaut. 1994).

KANAŁ WAPNIOWY W CZĄSTECZCE Ca^{2+} -ATPazy

Ca^{2+} -ATPaza wiąże dwa jony wapnia z wysokim powinowactwem ($K_D = 10^{-7}$ M) od strony cytoplazmatycznej błony do miejsc wiążących na swojej cząsteczce, zlokalizowanych prawdopodobnie w domenie transbłonowej białka (MARTONOSI 1996). Wiązanie dwóch kationów jest sekwencyjne i kooperatywne. Na tym etapie oba kationy mogą łatwo wymieniać się z pulą Ca^{2+} w cytoplazmie. Fosforylacja enzymu przez ATP blokuje tę wymianę. Kontrowersje budzi nadal sposób translokacji jonów wapnia przez błonę. Jedna grupa badaczy (INESI 1994) przypuszcza, że dwa Ca^{2+} przechodzą przez kanał w cząsteczce białka zgodnie z mechanizmem sekwencyjnym, pierwszy jon, który wchodzi do

kanału, jako pierwszy osiąga wnętrze kanalików SR. Inni badacze (JENCKS 1995) uważają, że kolejność, w jakiej oba kationy opuszczają kanał w cząsteczce białka, jest nie do odróżnienia. Różnice pomiędzy obiema grupami poglądów mogą wynikać z zastosowanych technik badawczych (MARTONOSI 1996).

Zgodnie ze standardowym modelem katalitycznym enzymu E1-E2 miejsca wiążące Ca^{2+} w cząsteczce enzymu oscylują pomiędzy miejscami o wysokim i niskim powinowactwie, w związku z powyższym wysokie stężenie Ca^{2+} w świetle kanalików SR powinno hamować zależną od Ca^{2+} fosforylację enzymu. Ponieważ jednak zaobserwowano (JENCKS 1995), że nie ma różnic pomię-

dzy poziomem fosforylacji enzymu przez ATP w pęcherzykach SR, które zakumulowały w swoim wnętrzu Ca^{2+} a pęcherzykami opróżnionymi z kationów powstało przypuszczenie, że w cząsteczce enzymu istnieją niezależne miejsca wiązania Ca^{2+} położone po stronie cytoplazmatycznej błony i po stronie wewnętrznej kanalikula SR. Zgodnie z tą koncepcją początkowo dwa Ca^{2+} wiążą się po stronie cytoplazmatycznej błony do miejsc o wysokim powinowactwie do tego kationu, a następnie po fosforylacji enzymu przez ATP są przenoszone na stronę wewnętrzną, gdzie wiążą się do miejsc o niskim powinowactwie. Stąd są uwalniane do światła kanalikula SR (JENCKS 1995). W świetle opisanej hipotezy trudno jednak pogodzić istnienie czterech miejsc wiążących Ca^{2+} w cząsteczce białka, bez jednoczesnego założenia, że miejsca te będą ze sobą wzajemnie oddziaływały (MARTONOSI 1996).

Inny kontrowersyjny problem stanowi struktura kanału w cząsteczce białka (DE MEIS i współaut. 1996). W oparciu o przewidywaną na podstawie sekwencji enzymu strukturę drugorzędową ATPazy (dziesięć domen transmembranowych M1-M10) i dzięki zastowaniu techniki mutacji punktowych reszt aminokwasowych stwierdzono, że domeny M4, M5, M6, M8 mogłyby tworzyć kanał wapniowy w cząsteczce enzymu, domena M1 miałaby być częścią miejsca wiążącego kationy o wysokim powinowac-

twie do Ca^{2+} (MACLENNAN i TOYOFUKU 1992, ANDERSEN i VILSEN 1995), a domena M3 odpowiadać za wrażliwość na tapsigarginę (HUSSAIN i współaut. 1995, WALDRON i współaut. 1995).

Na podstawie obserwacji, że białko ze związanym jednym lub dwoma kationami zachowuje się różnie i w oparciu o strukturę krystaliczną enzymu (TOYOSHIMA i współaut. 1993), zaproponowano inne rozwiązanie, istnienie dwóch kanałów utworzonych przez domeny M2-M5 i M4-M6 i M8. Każdy z tych kanałów mógłby być związany z pojedynczym miejscem wiążącym Ca^{2+} , oscylującym pomiędzy stanem o wysokim i niskim powinowactwie do kationu (MARTONOSI 1996). Adaptując mechanizm działania kanałów wapniowych typu L, by wyjaśnić działanie kanału w cząsteczce ATPazy, zaproponowano, że w nieobecności ATP jon wapnia wiąże się z cząsteczką enzymu z wysokim powinowactwem ($K_D = 10^{-7}$ M). Jon ten może ulegać wymianie z innymi jonami w cytoplazmie. W wyniku fosforylacji drugi jon wapnia przyłączałby się do cząsteczki enzymu, obniżając powinowactwo białka do Ca^{2+} ($K_D = 10^{-3}$ M) i powodując zamknięcie kanału w cząsteczce ATPazy od strony cytoplazmatycznej błony (MINTZ i GUILLAIN 1995, CANET i współaut. 1996, DE MEIS i współaut. 1996, MARTONOSI 1996). Należy przypuszczać, że najbliższe lata przyniosą ostateczne określenie mechanizmu transportu jonów wapnia przez Ca^{2+} -ATPazę.

REGULACJA SYNTEZY Ca^{2+} -ATPazy PRZEZ JONY WAPNIA

Jednym z podstawowych problemów, jakie zaprzatają uwagę badaczy, jest odpowiedź na pytanie, w jaki sposób jest regulowana synteza Ca^{2+} -ATPazy w trakcie rozwoju osobniczego i w odpowiedzi na zróżnicowaną aktywność mięśni (NOZAIS i współaut. 1996). W ciągu kilku tygodni rozwoju osobniczego zawartość enzymu zmienia się z 1–2% do 80% wszystkich białek błon SR (MARTONOSI 1982, 1996). Zależna od rodzaju włókien mięśniowych synteza w komórkach właściwych izoform enzymu znajduje się pod kontrolą odpowiednich regionów regulatorowych genów i szerokiej gamy czynników transkrypcyjnych (FOLETTI i współaut. 1995, VERBOOMEN i współaut. 1995, NOZAIS i współaut. 1996). Jednym z takich czynników są jony wapnia. Wykazano bowiem, że w obecności związków zmieniających przepuszczalność błon dla Ca^{2+} , w komórkach mięśniowych wzrasta synteza Ca^{2+} -ATPazy (MARTONOSI 1996). Zaproponowano zatem, że regulacja ekspresji genów kodujących białka ATPaz przez jony wapnia odbywa się za pośrednictwem białek wiążących

Ca^{2+} w jądrze komórkowym, zarówno w trakcie rozwoju osobniczego, jak i w odpowiedzi na aktywność mięśni u osobników dorosłych (MARTONOSI 1996).

W ostatnich latach hipoteza ta znalazła poparcie w obserwacjach, że tapsigargina wywołuje wzrost syntezy Ca^{2+} -ATPazy w komórkach poddanych działaniu tego specyficznego inhibitora enzymu (HUSSAIN i współaut. 1995, WALDRON i współaut. 1995). Dodatkowo stwierdzono, że wzrostowi syntezy ATPazy towarzyszy wzrost syntezy innego białka, GRP78 (białko opiekuńcze, ang. chaperone protein) (MARTONOSI 1982). Ponieważ białka grupy, do której należy GRP78, oddziałują ze specyficznym dla mięśni szkieletowych czynnikiem transkrypcyjnym myoD (LASSAR i współaut. 1994), jest prawdopodobne, że wspólny wzrost syntezy Ca^{2+} -ATPazy i białka GRP78 jest odzwierciedleniem rzeczywistych procesów regulacyjnych zachodzących w komórce mięśniowej. Należy sądzić, że nowe informacje na temat roli innych mięśniowych czynników transkrypcyjnych oraz

dane dotyczące roli Ca^{2+} , jako wtórnego przekaźnika sygnałów w proliferacji i różnicowaniu się komórek (BERRIDGE 1995) pozwolą na

wyjaśnienie, w jaki sposób jony wapnia mogą regulować syntezę Ca^{2+} -ATPazy (MARTONOSI 1996).

Ca^{2+} -TRANSPORT ATPase OF SARCOPLASMIC RETICULUM

Summary

Recent advances toward our understanding of the mechanism of transport of calcium ions across sarcoplasmic reticulum membranes and structure-function relationships characteristic of Ca^{2+} -ATPase, are reviewed. The crucial role of the enzyme in maintenance of Ca^{2+} homeostasis within the muscle cell is characterized. The emphasis

is upon evolution of P-type ATPases, the three-dimensional reconstruction of Ca^{2+} -ATPase derived from the diffraction analysis of the protein crystals and based on predictions of the enzyme secondary structure, and upon the structure of Ca^{2+} channel formed within the Ca^{2+} -ATPase molecule.

LITERATURA

- ANDERSEN J. P., VILSEN B., 1995. *Structure-function relationships of cation translocation by Ca^{2+} - and Na^{+} - K^{+} -ATPases studied by site-directed mutagenesis*. FEBS Lett. 359, 101–106.
- ANDERSEN J. P., SORENSEN T., 1996. *Site-directed mutagenesis studies of energy coupling in the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*. Biochim. Biophys. Acta 1275, 118–122.
- APRILLE J. R., 1993. *Mechanism and regulation of the mitochondrial ATP-Mg/ P_i carrier*. J. Bioenerg. Biomembr. 25, 473–481.
- BAYLE D., WEEKS D., SACHS G., 1995. *The membrane topology of the rat sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPase by in vitro translation scanning*. J. Biol. Chem. 270, 25678–25684.
- BERRIDGE M. J., 1995. *Calcium signalling and cell proliferation*. BioEssays 17, 491–500.
- BROWN J. R., DOOLITTLE W. F., 1995. *Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 2441–2445.
- CANET D., FORGE V., GUILLAIN F., MINTZ E., 1996. *Ca^{2+} translocation across sarcoplasmic reticulum ATPase randomizes the two transported ions*. J. Biol. Chem. 271, 20566–20572.
- CARAFOLI E., 1994. *Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme*. FASEB J. 8, 993–1002.
- CARAFOLI E., STAUFFER T., 1994. *The plasma membrane calcium pump: Functional domains, regulation of the activity and tissue specificity of isoform expression*. J. Neurobiol. 25, 312–324.
- DE MEIS L., 1993. *The concept of energy-rich phosphate compounds: Water, transport ATPases, and entropic energy*. Arch. Biochem. Biophys. 306, 287–296.
- DE MEIS L., WOLOSKEWICZ H., ENGELENDER S., 1996. *Regulation of the channel function of Ca^{2+} -ATPase*. Biochim. Biophys. Acta 1275, 105–110.
- FILLINGAME R. H., 1996. *Membrane sectors of F- and V-type H^{+} -transporting ATPases*. Curr. Opin. Struct. Biol. 6, 491–498.
- FOLETTI D., GUERINI D., CARAFOLI E., 1995. *Subcellular targeting of the endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca^{2+} pumps: A study using recombinant chimeras*. FASEB J. 9, 670–680.
- GREEN N. M., 1992. *Evolutionary relationships within the family of P-type cation pumps*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 671, 104–112.
- GROVER A. K., KHAN I., 1992. *Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity*. Cell Calcium 13, 9–17.
- HAO M.-H., HARVEY S. C., 1995. *Active transport of ions across membranes: Energetic role of electrostatic and binding site asymmetry*. Biochim. Biophys. Acta 1234, 5–14.
- HUSSAIN A., GARNETT C., KLEIN M. G., TSAI-WU J. J., SCHNEIDER M. F., INESI G., 1995. *Direct involvement of intracellular Ca^{2+} transport ATPase in the development of thapsigargin resistance by chinese hamster lung fibroblast*. J. Biol. Chem. 270, 12140–12146.
- INESI G., 1994. *Teaching active transport at the turn of the twenty-first century: Recent discoveries and conceptual changes*. Biophys. J. 66, 554–560.
- IWABE N., NUMA K.-I., HASEGAWA M., OSAWA S., MIYATA T., 1989. *Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9355–9359.
- JENCKS W. P., 1995. *The mechanism of coupling chemical and physical reactions by the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum and other coupled vectorial systems*. Biosci. Rep. 15, 283–287.
- KERESZTES T., JONA I., PIKULA S., VEGH M., MULLNER N., PAPP S., MARTONOSI A., 1989. *Effect of calcium on the interactions between Ca^{2+} -ATPase molecules in sarcoplasmic reticulum*. Biochim. Biophys. Acta 984, 326–338.
- KRUPKA R. M., 1994. *The application of vectorial coupling theory to the calcium pump*. Biochim. Biophys. Acta 1193, 179–185.
- LASSAR A. B., SKAPEK S. X., NOVITCH B., 1994. *Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal*. Curr. Opin. Cell Biol. 6, 788–794.
- LUTSENKO S., KAPLAN J. H., 1995. *Organization of P-type ATPases: Significance of structural diversity*. Biochemistry 34, 15607–15613.
- MACLENNAN D. H., BRANDL C. J., KORCZAK B., GREEN N. M., 1985. *Amino-acid sequence of a Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence*. Nature (London) 316, 696–700.
- MACLENNAN D. H., TOYOFUKU T., 1992. *Structure-function relationships in the Ca^{2+} pump of the sarcoplasmic reticulum*. Biochem. Soc. Trans. 20, 559–562.
- MARTONOSI A., 1982. *The development of sarcoplasmic reticulum membranes*. Annu. Rev. Physiol. 44, 337–355.
- MARTONOSI A., 1995. *The structure and interactions of Ca^{2+} -ATPase*. Biosci. Rep. 15, 263–281.
- MARTONOSI A., 1996. *Structure-function relationships in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum: Facts, speculations and questions for the future*. Biochim. Biophys. Acta 1275, 111–117.
- MARTONOSI A., TAYLOR K. A., VARGA S., TING-BEALL H. P., 1987. *The molecular structure of sarcoplasmic reticulum*. [W:] J. R. HARRIS, R. W. HORNE (red.), Electron

- Microscopy of Proteins*, t. 6, *Membrane Structures*. Academic Press, London, 255–376.
- MARTONOSI A., TAYLOR K. A., PIKULA S., 1991. *The crystallization of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum*. [W:] H. MICHEL (red.), *Crystallization of Membrane Proteins*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, 167–182.
- MELZER W., HERRMANN -FRANK A., LUTTGAW H. Ch., 1995. *The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibers*. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 59–116.
- MILNER R. E., FAMULSKI K. S., MICHALAK M., 1992. *Calcium binding proteins in the sarcoplasmic/Xendoplasmic reticulum of muscle and nonmuscle cells*. *Molec. Cell. Biochem.* 112, 1–13.
- MINTZ E., GUILLAIN F., 1995. *How do Ca^{2+} ions through the sarcoplasmic reticulum membrane*. *Biosci. Rep.* 15, 377–385.
- MOLLER J. V., JUUL B., LE MAIRE M., 1996. *Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases*. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 1–15.
- NICHOLLS P., RAND R. P., FULLER N., BUTKO P., 1992. *Water, ions and membrane proteins: How would Darwin look at cytochromes and channels?* *Biochem. Soc. Trans.* 20, 583–589.
- NOZAIS M., LOMPR A.-M., D'ALBIS A., 1996. *Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} pump and metabolic enzyme expression in rabbit fast-type and slow-type denervated skeletal muscles. A time study*. *Eur. J. Biochem.* 238, 807–812.
- PIKULA S., MULLNER N., DUX L., MARTONOSI A., 1988. *Stabilization and crystallization of Ca^{2+} -ATPase in detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum*. *J. Biol. Chem.* 263, 5277–5286.
- PIKULA S., EPSTEIN L., MARTONOSI A., 1994. *The relationship between phospholipid content and Ca^{2+} -ATPase activity in the sarcoplasmic reticulum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1196, 1–13.
- SAIER M. H. Jr., 1993. *Convergence and divergence in the evolution of transport proteins*. *BioEssays* 16, 23–29.
- SKULACHEV P. V., 1994. *Chemiosmotic concept of the membrane bioenergetic: What is already clear and what is still waiting for elucidation?* *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 589–598.
- SOLIOZ M., VULPE C., 1996. *CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals*. *Trends Biochem. Sci.* 21, 237–241.
- STOKES D. V., TAYLOR W. R., GREEN N. M., 1994. *Structure, transmembrane topology and helix packing of P-type ion pumps*. *FEBS Lett.* 346, 32–38.
- TAYLOR K. A., MULLNER N., PIKULA S., DUX L., PERACCHIA C., VARGA S., MARTONOSI A., 1988. *Electron microscope observations on Ca^{2+} -ATPase microcrystals in detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum*. *J. Biol. Chem.* 263, 5287–5294.
- TOYOSHIMA Ch., SASABE H., STOKES D. L., 1993. *Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane*. *Nature (London)* 362, 469–471.
- VERBOOMEN H., MERTENS L., EGGERMONT J., WUYTACK F., VANDENBOSCH L., 1995. *Modulation of SERCA2 activity: regulated splicing and interaction with phospholamban*. *Biosci. Rep.* 15, 307–315.
- WALDRON R. T., SHORT A. D., GILL D. L., 1995. *Thapsigargin-resistant intracellular calcium pumps. Role in calcium pool function and growth of thapsigargin-resistant cells*. *J. Biol. Chem.* 270, 11955–11961.
- WU K. D., LEE W. S., WEY J., BUNGARD D., LYTTON J., 1995. *Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform transcripts*. *Am. J. Physiol.* 269, C775–C784.