

Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi z wyrazami szacunku

KRZYSZTOF ZABŁOCKI

*Istytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

CYKLICZNA ADP-RYBOZA — NOWA CZĄSTECZKA SYGNAŁOWA W METABOLIZMIE WAPNIA

Metabolizm wapnia w komórkach organizmów eukariotycznych od dawna wzbudza szerokie i uzasadnione zainteresowanie. Jon wapniowy należy do wtórnych przekaźników sygnału w wielu procesach fizjologicznych, które zachodzą w komórkach w odpowiedzi na zewnętrzne pobudzenie wywołane obecnością niektórych hormonów lub czynników wzrostowych albo zmianą pewnych parametrów fizycznych środowiska (BERRIDGE 1993). W wyniku takiej aktywacji komórki wzrasta przejściowo stężenie jonów wapniowych w cytosolu, co stanowi sygnał do rozpoczęcia szeregu procesów. Dzieje się to na skutek uwalniania jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów, jakimi są cysterny siateczki śródplazmatycznej oraz w wyniku otwierania się kanałów w błonie komórkowej selektywnie przepuszczających jony wapniowe ze środowiska okołokomórkowego. Szybkie przemieszczanie się jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych cystern oraz z przestrzeni pozakomórkowej do cytosolu jest możliwe dlatego, że ich stężenie w cytosolu jest 10–20 tys. razy niższe niż w magazynach wapniowych lub na zewnątrz komórek. Tak duża różnica stężeń istnieje dzięki specjalnym mechanizmom transportującym jony wapniowe wbrew gradientowi ich stężenia. Odbywa się to kosztem energii pochodzącej pośrednio lub bezpośrednio z hydrolizy ATP. Ze względu na to, że zmiany stężenia jonów wapniowych w cytosolu mają krytyczne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek, muszą one podlegać precyzyjnej kontroli. Możliwe jest to do osiągnięcia dzięki temu, że błony tworzące cysterny siateczki śródplazmatycznej oraz błona komórkowa stanowią bariery dla biernego przenikania jonów wapniowych, a aktywność kanałów błonowych przepuszczających Ca^{2+} do cytosolu podlega regulacji. Istnieją dwa znane sposoby

uwalniania jonów wapniowych z cystern siateczki śródplazmatycznej. Pierwszy z nich, dokładniej poznany i opisany, jest związany z metabolizmem lipidów błony komórkowej. Aktywacja receptora błonowego uruchamia ciąg zdarzeń prowadzących w konsekwencji do aktywacji fosfolipazy C i wzmożonej hydrolizy difosforanu fosfatydyloinozytolu. Jednym z produktów tej reakcji jest rozpuszczalny w wodzie i szybko dyfundujący w cytosolu trisfosforan inozytolu (IP_3). Związek ten wiąże się z receptorami zlokalizowanymi na powierzchni błon siateczki śródplazmatycznej. W konsekwencji powoduje to otwarcie kanałów wapniowych (zwanymi kanałami zależnymi od trisfosforanu inozytolu) i uwolnienie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych (BERRIDGE 1993). Drugi mechanizm polega na aktywacji tak zwanych receptorów rianodynowych (specyficznie wiążących alkaloid roślinny rianodynę) strukturalnie związanych z kanałami wapniowymi zlokalizowanymi w błonach siateczki śródplazmatycznej (CORONADO i współaut. 1994). Po raz pierwszy receptory te znaleziono i opisano w komórkach mięśni szkieletowych (typ 1 lub RyR1) i w komórkach mięśnia sercowego (typ 2 czyli RyR2). Uważa się, że receptory rianodynowe i sprzężone z nimi kanały wapniowe są odpowiedzialne za uwalnianie Ca^{2+} w czasie skurczu włókien mięśniowych. Sekwencje nukleotydów w genach kodujących białka RyR1 i RyR2 wykazują znaczny stopień homologii (60% lub nawet 75% uwzględniając konserwatywne podstawienia nukleotydów). Stwierdzono, że w komórkach receptory te mają budowę tetrameryczną, to znaczy są złożone z czterech podjednostek o masie około 560 kDa każda. Różnice funkcjonalne między tymi rodzajami receptorów rianodynowych dotyczą nieco innej wrażliwości na naturalne i sztuczne aktywatory (jony wapnia,

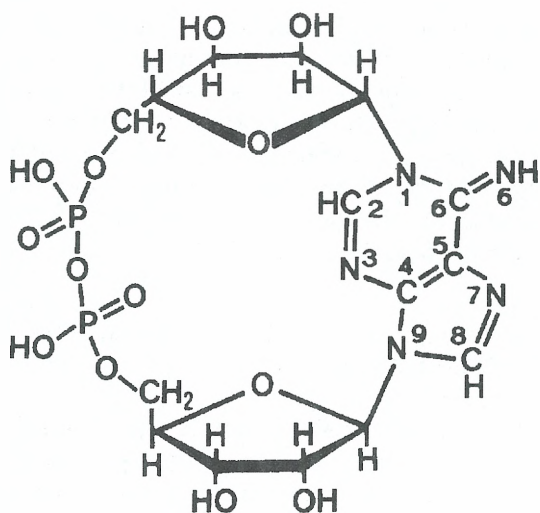
kofeina, ATP) oraz inhibitory (jony magnezu, czerwień rutenowa) (MEISNER i HENDERSON 1987, LAI i współaut. 1988). Analiza sekwencji aminokwasów sugeruje istnienie w cząsteczkach RyR1 i RyR2 kilku hipotetycznych miejsc wiązania jonów wapnia i kalmoduliny oraz miejsc potencjalnie podatnych na fosforylację przez kinazy białkowe. W 1992 roku pojawiły się informacje na temat trzeciego receptora rianodynowego (RyR3), który w przeciwieństwie do dwóch wcześniej opisanych występuje nie tylko w mięśniach szkieletowych (jak RyR1) lub w sercu i mózgu (jak RyR2), lecz także w komórkach wielu innych narządów, takich jak nerki, wątroba, śledziona. Stwierdzono, że wykazuje on 70% homologii w stosunku do RyR1 i RyR2, ale zakwestionowano jego wrażliwość na kofeinę (GIANNINI i współaut. 1992). Liczba receptorów typu RyR3 w komórkach jest przeciętnie

stukrotnie mniejsza niż RyR1 w komórkach mięśni. Niemniej receptorom RyR3 przypisuje się znaczenie w regulacji stężenia jonów wapnia w cytosolu. Właściwością powszechnie uznawaną jako kluczową w regulacji aktywności kanałów wapniowych zależnych od receptorów rianodynowych jest ich aktywacja przez Ca^{2+} . Dzięki temu są one odpowiedzialne za zjawisko indukcji uwalniania wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych przez wzrastające stężenie jonów wapnia w cytosolu, tak zwane CICR (ang. calcium induced calcium release). Oznacza to, że powodują spotęgowanie sygnału wapniowego zapoczątkowanego otwarciem kanałów zależnych od receptorów wrażliwych na trisfosforan inozytolu. Receptorom i kanałom wrażliwym na rianodynę przypisuje się udział w powstawaniu oscylacji i fal wapniowych w komórce (GALIONE i współaut. 1991, SORRENTINO i VOLPE 1993).

CYKLICZNA ADP-RYBOZA — NOWY PRZEDSTAWICIEL RODZINY CYKLICZNYCH NUKLEOTYDÓW

W 1987 roku dokonano odkrycia, które rzuciło nowe światło pozwalające lepiej zrozumieć niektóre aspekty regulacji stężenia jonów wapnia w komórkach (CLAPPER i współaut. 1987). Ponieważ wiadomo było, że w czasie zapłodnienia jaja jeźowca dochodzi w ciągu kilkunastu minut do dwukrotnego uwolnienia jonów wapniowych z magazynów wewnętrznych oraz że drugi wyrzut nie jest następstwem jakiegokolwiek pobudzenia komórki przez znane czynniki zewnętrzne, szukano mechanizmu odpowiedzialnego za otwieranie kanałów wapniowych zlokalizowanych w błonach siateczki śródplazmatycznej. Wśród przetestowanych pod tym kątem substancji szczególne znaczenie miały dinukleotydy nikotynamidoadeninowe (NAD^+ , NADP^+), ponieważ ich stężenia ulegają dużym zmianom podczas zapłodnienia. Okazało się, że NAD^+ podany w stężeniu fizjologicznym, to znaczy w takim w jakim występuje w komórkach (50–100 μM), do homogenatu z jaj jeźowca stymuluje uwalnianie Ca^{2+} , ale proces ten rozpoczyna się z kilkuminutowym opóźnieniem. W tym samym homogenacie uwalnianie jonów wapniowych w odpowiedzi na podany IP_3 jest natychmiastowe. Wskazuje to, że NAD^+ musi ulec przekształceniom chemicznym zanim stanie się cząsteczką sygnałową zdolną do aktywacji uwalniania jonów wapniowych z wewnętrznych magazynów komórki. Podobne opóźnienie odpowiedzi na NAD^+ obserwuje się po mikroiniekcji tego nukleotydu do oocytów jeźowca. Jednakże, jeżeli NAD^+ preinkubuje się z frakcją cytosolową komórki, zawierającą jedynie enzymy rozpuszczalne, a następnie doda się zawie-

sinę izolowanych pęcherzyków siateczki śródplazmatycznej, obserwuje się natychmiastowy wpływ jonów wapniowych mimo, że oczyszczony preparat błonowy jest niewrażliwy na NAD^+ . Wskazuje to, że NAD^+ podlega całkowitemu przekształceniu w czynną pochodną w cytosolu komórki, a nie we frakcji błonowej. Pierwsze próby identyfikacji tego związku, polegające głównie na wyizolowaniu go za pomocą HPLC oraz badaniu widma absorpcyjnego w świetle UV wykazały, że modyfikacja NAD^+ dotyczy raczej nikotynamidowego, a nie adeninowego fragmentu cząsteczki (CLAPPER i współaut. 1987). Zostało to później potwierdzone wynikami pomiaru jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) (RUSINKO i LEE 1989). Te dane oraz dokładne pomiary masy cząsteczkowej, ustalenie, że produktem hydrolizy tego związku jest ADP-ryboza i wreszcie badanie z zastosowaniem krystalografii rentgenowskiej (LEE i współaut. 1994a) pozwoliły na zaproponowanie wzoru i struktury chemicznej poszukiwanej substancji. Wyjaśniono, że jest nim cykliczna ADP-ryboza (cADPR), związek powstający z NAD^+ w wyniku usunięcia reszty nikotynamidowej i wytworzenia wiązania N-glikozydowego między resztą rybozy a atomem azotu położonym w pozycji 1 reszty adeninowej (rys. 1.). Oba wiązania N-glikozydowe w cząsteczce cADPR są w konfiguracji β , podobnie jak w NAD^+ . Odkrycie cADPR powiększyło rodzinę cyklicznych nukleotydów, której dotychczas znanymi przedstawicielami były cykliczny adenosynomonofosforan (cAMP) i cykliczny guanosynomonofosforan (cGMP), oba zaliczane do wtórnych



Ryc. 1. Wzór strukturalny cyklicznej ADP-rybozy.

przekazników sygnału w komórce (WORONCZAK i BARAŃSKA 1993, LEE i współaut. 1995).

Jeżeli cADPR istotnie ma znaczenie w regulacji poziomu jonów wapnia w cytosolu w warunkach *in vivo*, jego stężenie w cytosolu musi być utrzymywane na poziomie dostosowanym do aktualnych potrzeb komórki. Stężenie tego nukleotydu w komórce jest, podobnie jak większości metabolitów, wypadkową procesów syntezy i degradacji. Ważne jest, że jeżeli cADPR jest przekaznikiem sygnału lub pełni funkcje regulatorowe, to w komórkach, w których występuje, muszą istnieć systemy jego wytwarzania i usuwania podlegające precyzyjnej kontroli. Enzym przekształcający NAD^+ w cADPR, nazywany cyklazą ADP-rybozy, wykryto i opisano po raz pierwszy dla homogenatu jaj jeżowca (CLAPPER i współaut. 1987), a wkrótce potem — dla wielu tkanek pochodzących z tak odległych grup, jak morskie bezkręgowce (*Aplysia californica* jeżowiec), owady (*Drosophila*), płazy (salamandra), ptaki (kurczak) i ssaki (LEE i współaut. 1994b). W celu detekcji i pomiaru ilościowego aktywności tego enzymu stosowano (i nadal stosuje się) test biologiczny, polegający na mierzeniu szybkości uwalniania jonów wapniowych z cystern siateczki śródplazmatycznej w preparatach przygotowanych z oocytów jeżowca inkubowanych w obecności badanego preparatu enzymatycznego i NAD^+ . Okazało się, że aktywność cyklazy w mózgu ssaka jest 200 razy wyższa niż w oocytach jeżowca, a najwyższą ze znalezionych, milion razy przekraczającą aktywność enzymu z jaj jeżowca, wykryto w gruczole obojnaczym morskiego mięczaka *Aplysia californica* (GLICK i współaut. 1991, HELLMICH i STRUMWASSER 1991, LEE i AARHUS 1993, LEE i współaut. 1994b). Enzym z *Aplysia* jako

jedyny z tej grupy, został otrzymany w postaci krystalicznej oraz zsekwencjonowany. Wykazuje on znaczny stopień homologii w stosunku do znanej wcześniej hydrolazy NAD^+ ssaków. Z wyjątkiem wspomnianego enzymu z *Aplysia*, a także enzymów występujących w oocytach jeżowca morskiego oraz w jądrach ssaków, cyklaza ADP-rybozy jest związana z błonami komórkowymi. Obie formy enzymu, błonowa i rozpuszczalna, katalizują tę samą reakcję, wykazując przy tym wysoką specyficzność substratową. Między innymi nie jest wykorzystywany jako substrat -NAD^+ ani ADP-ryboza. Brak aktywności enzymu w obecności ADP-rybozy wskazuje, że związek ten nie stanowi etapu pośredniego w reakcji przekształcenia NAD^+ w cADPR (RUSINKO i LEE 1989, LEE i AARHUS 1991, LEE 1994a). Degradacja cADPR, katalizowana przez hydrolazę, polega na rozerwaniu wiązania N-glikozydowego w pozycji 1 pierścienia purynowego, a jej produktem jest ADP-ryboza. Enzym ten jest związany z błonami i występuje we wszystkich tkankach, w których stwierdzono obecność cyklazy ADP-rybozy. Szczególnie dużą aktywność stwierdzono w mózgu (LEE i AARHUS 1993). Enzymu tego, jak dotąd, nie wyizolowano. Analiza sekwencji aminokwasowej cyklazy ADP-rybozy z *Aplysia* wykazała wysoki stopień homologii tego białka z antygenem powierzchniowym limfocytów określanym jako CD38, którego ekspresja jest związana z różnicowaniem komórek (STATES i współaut. 1992). Analiza hydrofobowości oraz występowanie w obu białkach 10 istotnych dla aktywności reszt cysteiny sugeruje, że ich struktury przestrzenne są podobne. Dzięki technikom rekombinacji DNA możliwe było zsyntetyzowanie zewnątrzkomórkowej domeny antygeny CD38 i zademonstrowanie, że fragment ten wykazuje zarówno aktywność cyklazy, jak i hydrolazy cADPR, przy czym, chociaż sumaryczna reakcja katalizowana przez ten enzym polega na przekształceniu NAD^+ w ADP-rybozę i nikotynamid, nie jest to aktywność hydrolazy NAD^+ , lecz dwie różne aktywności enzymatyczne (HOWARD i współaut. 1993, TAKASAWA i współaut. 1993). Przeciwciała przeciwko białku CD38 znosiły obie aktywności. Podobnie, dwie aktywności enzymatyczne stwierdzono w CD38 oczyszczonym z erytrocytów ludzkich oraz w enzymie klasyfikowanym jako hydrolaza NAD^+ izolowanym ze śledziony psa. Enzymy te stanowią jedne z nielicznych przykładów enzymów bifunkcyjnych, to znaczy takich, które są w stanie katalizować reakcje przebiegające według dwóch różnych mechanizmów (KIM i współaut. 1993, ZOCCHI i współaut. 1993). Wreszcie analiza RNA z wielu ludzkich tkanek wykazała, że ekspresja genów kodują-

cych białka o znacznym stopniu homologii z CD38 nie jest ograniczona do komórek krwi lecz jest wykrywalna w różnym nasileniu, praktycznie we wszystkich tkankach i liniach komórkowych, w których stwierdzono aktywność hydrolazy NAD^+ (TAKASAWA i współaut. 1993). Ze względu na to, że reakcja degradacji cADPR może maskować i utrudniać oznaczenie aktywności cykazy ADP-rybozy wydaje się prawdopo-

dobne, że enzymy dotychczas zaklasyfikowane jako hydrolazy ADP-rybozy lub hydrolazy NAD^+ są w istocie enzymami bifunkcyjnymi. A zatem, chociaż obecnie uznaje się istnienie zarówno monofunkcyjnych (np. cykazy z *Aplysia*), jak i bifunkcyjnych enzymów metabolizmu cADPR, wydaje się, że nie można wykluczyć dominującej roli tych drugich (LEE i współaut. 1995, OKAMOTO i współaut. 1995).

UDZIAŁ cADPR I RECEPTORÓW RIANODYNOWYCH W UWALNIANIU JONÓW WAPNIOWYCH Z MAGAZYNÓW WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Jak powiedziano wcześniej, enzymy katalizujące reakcje wytwarzania i degradacji cADPR występują powszechnie, a stymulacja wypływu wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych przez ten nukleotyd została zademonstrowana w wielu rodzajach komórek. W tych samych komórkach dochodzić może także do aktywacji kanałów wapniowych zależnych od IP_3 zlokalizowanych w siateczce śródplazmatycznej. Jednakże szereg faktów doświadczalnych przemawia za niezależnością tych dwóch mechanizmów uruchamiania wewnątrzkomórkowej puli wapniowej (DARGIE i współaut. 1990, WALSETH i LEE 1993).

1. Stymulacja wypływu jonów wapniowych z cystern siateczki śródplazmatycznej, spowodowana dodaniem cADPR do mikrosomów izolowanych z oocytów jeżowca, nie jest wrażliwa na heparynę, która jest silnym inhibitorem współzawodniczym receptorów zależnych od IP_3 .

2. W obecności wysokich stężeń IP_3 dochodzi do odwrażliwienia receptorów zależnych od tego związku. Objawia się to brakiem aktywacji wypływu jonów wapniowych w wyniku dalszego dodawania trisfosforanu inozytolu. W tych warunkach wrażliwość komórek na cADPR pozostaje niezmienną. Podobnie, odwrażliwienie receptorów i w konsekwencji nieotwieranie kanałów wapniowych zależnych od cADPR, następujące w wyniku podania do homogenatu z jaj jeżowca dużych stężeń tego związku, nie ma wpływu na uwalnianie jonów wapniowych w odpowiedzi na IP_3 . Brak krzyżowego odwrażliwienia był obserwowany nie tylko w jajach jeżowca, ale także w preparatach wielu rodzajów komórek ssaków.

3. Pochodne cADPR, na przykład 8-amino-cADPR, są inhibitorami współzawodniczymi blokującymi wpływ wapnia stymulowany tym nukleotydem, natomiast nie mają wpływu na stymulację kanałów wapniowych zależnych od IP_3 .

4. Wiązanie cADPR znakowanego radioaktywnym izotopem fosforu do receptorów znajdujących się w mikrosomach oocytów jeżowca jest współzawodniczo hamowane nie znakowanym cADPR, podanym w nanomolowych stężeniach, natomiast jest całkowicie niezależne od IP_3 lub heparyny.

Ponieważ wykazano, że receptory wrażliwe na IP_3 nie ulegają aktywacji w trakcie mobilizacji jonów wapniowych w obecności cADPR sugeruje się, że nukleotyd ten działa według innych mechanizmów. Szereg danych farmakologicznych wskazuje na podobną wrażliwość kanałów wapniowych stymulowanych przez cADPR oraz kanałów wapniowych aktywowanych jonami wapnia odpowiedzialnych za zjawisko CICR (GALIONE i współaut. 1991, LEE 1993).

1. Jony wapniowe, jony strontu lub kofeina, będąca aktywatorem CICR w niskich stężeniach, zwiększają efekt cADPR bez wpływu na odpowiedź komórek na IP_3 . W wysokich stężeniach kofeiny dochodzi do odwrażliwienia receptorów cADPR, podczas gdy aktywność kanałów zależnych od IP_3 jest nie zmieniona. W niskich, niewystarczających do zaindukowania wypływu jonów wapniowych stężeniach cADPR wzrasta wrażliwość mikrosomów na stymulujące działanie jonów wapniowych lub kofeiny.

2. Inhibitory CIRC (czerwień rutenowa lub prokaina) selektywnie hamują wpływ jonów wapniowych aktywowany przez cADPR, ale nie przez IP_3 .

3. Rianodyna aktywuje CICR i odwrażliwia komórki na cADPR, ale nie ma wpływu na stymulację wypływu jonów wapniowych przez IP_3 .

A zatem cADPR wykazuje właściwości modulatora CICR, co może oznaczać, że jest regulatorem kanałów wapniowych zależnych od receptorów rianodynowych. Ponieważ istnieje podobieństwo w działaniu i budowie kofeiny i cADPR, nie jest wykluczone, że stymulujący wpływ zarówno tego nukleotydu, jak i kofeiny

na uwalnianie jonów wapniowych polega na podobnych oddziaływaniach z tym samym białkiem receptorowym, z tym że efektywność cADPR jako aktywatora jest o pięć rzędów wielkości wyższa niż kofeiny. To przypuszczenie znalazło potwierdzenie w trakcie poszukiwań receptora cADPR. Stwierdzono bowiem, że 8-azydo-cADPR, fotoreaktywna pochodna nukleotydu, wiąże się selektywnie z białkami o masie 100 kDa i 140 kDa w preparacie mikrosomów izolowanych z jaja jeżowca. To oddziaływanie jest niezależne od obecności IP₃ i nukleotydów adeninowych, natomiast jest całkowicie blokowane przez cADPR w nanomolowych stężeniach i co więcej, kofeina w stężeniach milimolowych uniemożliwia związanie się pochodnej cADPR z białkiem 100 kDa. Najprawdopodobniej białko to jest odpowiedzialne za aktywację wypływu jonów wapniowych przez kofeinę i przynajmniej częściowo przez cADPR (WALSETH i współaut. 1993). Obserwacje te są wszakże niezgodne z wcześniejszą koncepcją głoszącą, że cADPR stymuluje wypływ jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych poprzez aktywację receptorów rianodynowych, których masa, jak wcześniej stwierdzono, wynosi około 560 kDa. Istnieją trzy możliwe wyjaśnienia tej rozbieżności. Jedno z nich zakłada, że białka 100 kDa i 140 kDa stanowią nowe odmiany receptorów rianodynowych, chociaż jak dotąd nie pokazano, że mają one zdolność do wiązania rianodyny. Druga możliwość, częściowo potwierdzona doświadczalnie i najbardziej prawdopodobna głosi, że cADPR oddziałuje z receptorami rianodynowymi nie bezpośrednio, lecz po uprzednim związaniu z mniejszymi białkami (WALSETH i LEE 1993). Wreszcie nie jest wykluczone, że białka 100 kDa i 140 kDa są produktami degradacji receptorów rianodynowych. Prowadzone w kilku laboratoriach badania wpływu cADPR na przewodnictwo kanałów wapniowych zależnych od receptorów rianodynowych wbudowanych w sztuczne błony, nie doprowadziły do jednoznacznych konkluzji. Wykazano, że istnieją zasadnicze różnice w odpowiedzi receptorów RyR1 i RyR2 na cADPR w sztucznych błonach w porównaniu z obser-

wowanymi w homogenacie z jaj jeżowca. Dotyczy one przede wszystkim wrażliwości na jony wapniowe, cADPR i obecność kalmoduliny oraz wskazują, że w układzie sztucznej błony kanały wapniowe zależne od RyR1 i RyR2 są aktywowane nie tylko przez cADPR, lecz także przez ATP, NAD⁺ (w tych warunkach nie metabolizowane) i ADP-rybozę. Ponieważ w układzie sztucznej błony jedynym białkiem był RyR, uzyskane wyniki nie są sprzeczne z hipotezą, że aktywacja kanałów wapniowych przez cADPR wymaga dodatkowych białek (np. wspomnianych 100 kDa i 140 kDa). Nie można także wykluczyć, że receptory RyR1 i być może RyR2 nie są aktywowane przez cADPR (SITSAPESAN 1995). Jak dotąd większość wyników dotyczących wpływu cADPR na uwalnianie wapnia uzyskano używając oocytów jeżowca. Nie stwierdzono jednak, że w komórkach tych występują opisane wcześniej w innych tkankach receptory rianodynowe, natomiast wykryto w nich białko o masie 380 kDa wykazujące powinowactwo do przeciwciał anti-RyR. Podsuwa to myśl, że za zjawisko aktywacji CICR przez cADPR mogłyby odpowiadać receptory charakteryzujące się wrażliwością na czynniki farmaceutyczne podobną do stwierdzonej w przypadku znanych dziś receptorów rianodynowych, lecz nie będące RyR1 ani RyR2. Z drugiej jednak strony, istnieją dowody na udział RyR2 w aktywowanej przez cADPR mobilizacji jonów wapniowych w neurosekrecyjnych komórkach linii P12 (CLEMENTI 1996).

Warte odnotowania są doniesienia o podobnych mechanizmach mobilizacji jonów wapniowych w komórkach roślinnych. Wykazano bowiem, że cADPR aktywuje wypływ jonów wapniowych z wakuol oraz mikrosomów izolowanych z buraka. Badania testujące krzyżowe odwrażliwianie kanałów wapniowych z zastosowaniem IP₃ i cADPR oraz wrażliwość badanych systemów na czynniki farmakologiczne wskazują, że cADPR aktywuje receptory analogiczne do receptorów rianodynowych komórki zwierzęcej. Jednakże jak dotąd nie ma przekonujących dowodów na istnienie takich receptorów u roślin (ALLEN i współaut. 1995, MUIR i SANDERS 1996).

cADPR JAKO WTÓRNY PRZEKAŹNIK SYGNAŁU

Obecny stan wiedzy pozwala uznać, że cADPR jest czynnikiem stymulującym opróżnianie wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych związanych ze zjawiskiem CICR bez względu na to, jakie receptory uczestniczą w tym procesie. Jego działanie polega prawdopodobnie na zwiększaniu wrażliwości na jony wa-

pniowe kanałów aktywowanych przez te jony. Jednakże sam fakt stymulacji wypływu jonów wapniowych do cytosolu nie jest wystarczający do uznania cADPR za wtórny przekaźnik sygnału. Konieczne jest powiązanie zmian stężenia cADPR ze stanami pobudzenia komórki. A zatem istotne jest ustalenie, jakie czynniki wpły-

wają na zmianę szybkości wytwarzania i/lub degradacji cADPR i w konsekwencji jego zawartości w komórkach. Właściwości cyklazy ADPR występującej w oocytach jeżowca wydają się wskazywać, że jej aktywność podlega regulacji i może brać udział w przekazywaniu sygnału. Stwierdzono bowiem, że do aktywacji wypływu jonów wapniowych z pęcherzyków mikrosomalnych (z dodatkiem frakcji rozpuszczalnej, ponieważ w komórkach jajowca jeżowca cyklaza cADPR jest enzymem cytosolowym) oprócz NAD^+ konieczne jest także cGMP. Przy czym bezpośredni wpływ cGMP na badany enzym był wykluczony, ponieważ antagonistą cADPR (8-amino-cADPR) całkowicie blokował efekt cGMP (GALIONE i współaut. 1993). Obserwacja ta wskazuje, że czynniki aktywujące receptory błonowe związane z cyklazą guanylową mogą stymulować wytwarzanie cADPR poprzez zwiększanie stężenia cGMP w komórce i w rezultacie aktywację kinazy białkowej zależnej od tego nukleotydu, fosforylującej (i przez to aktywującej) cyklazę cADPR. Ponadto wytwarzanie cGMP podlega stymulacji przez tlenek azotu znany jako aktywator cytosolowej formy cyklazy guanylowej. Tlenkowi azotu przypisuje się istotne znaczenie między innymi w relaksacji mięśni gładkich naczyń krwionośnych, co powoduje w efekcie zwiększenie przepływu krwi. Stymuluje on syntezę cGMP, w konsekwencji aktywację kinazy białkowej zależnej od cGMP (LOWENSTEIN i SNYDER 1992). Jednakże charakter zmian metabolizmu wapnia wywołanych obecnością tlenu azotu zależy od rodzaju komórek. Na przykład w komórkach jelita grubego tlenek azotu powoduje wrażliwy na rianodynę wzrost stężenia jonów wapniowych w cytosolu spowodowany opróżnianiem cystern siateczki śródplazmatycznej, podczas gdy w mięśniach gładkich i w fibroblastach tlenek azotu obniża stężenia jonów wapniowych w cytosolu (LEE 1994b).

Obecnie przyjmuje się hipotezę, że aktywacja cyklazy guanylowej przez tlenek azotu powoduje wzmożoną fosforylację cyklazy ADPR, katalizowaną przez kinazę białkową zależną od cGMP. W efekcie wzrasta szybkość przekształcania NAD^+ w cADPR. Hamujący wpływ inhibitorów kinazy białkowej zależnej od cGMP na uwalnianie jonów wapniowych indukowane tlenkiem azotu potwierdza tę koncepcję. Ponadto analogi cADPR blokujące uwalnianie jonów wapnia cofają działanie tlenu azotu. Wyniki badań uzyskane z użyciem oocytów jeżowca zostały w znacznym stopniu potwierdzone w doświadczeniach z komórkami pochodzącymi z innych zwierząt, co pozwala przypuszczać, że zaproponowany mechanizm regulacyjny ma znaczenie uniwersalne (WILLMOTT i współ-

aut. 1996). Zagadką pozostaje enzymatyczna rola antygenów CD38 na powierzchni limfocytów. Jedną z hipotez postuluje istnienie receptorów cADPR zlokalizowanych w błonach komórkowych, przypominających receptory purynergiczne dla ATP lub receptor cyklicznego AMP u *Dictyostelium*. Domeny katalityczne CD38 zwrócone na zewnątrz komórek mogłyby wykorzystywać pozakomórkowy NAD^+ jako substrat do syntezy cADPR. Nukleotyd ten mógłby uczestniczyć w autokrynnej bądź parakrynnej stymulacji komórek. Koncepcja ta jest zgodna z obserwacją, że cADPR podany do hodowli limfocytów B indukuje ich podziały. Jednakże rola cADPR jako czynnika pozakomórkowego, a także spekulacje na temat regulacji enzymatycznej aktywności CD38 (np. przez fosforylację/defosforylację) wymagają dalszej weryfikacji doświadczalnej. W przypadku komórek, w których tlenek azotu ogranicza mobilizację jonów wapniowych sugeruje się, że związek ten może aktywować enzymy degradujące cADPR. Wyniki doświadczeń z użyciem wnikańcych przez błonę komórkową analogów cGMP wskazują, że w fibroblastach takie działanie tlenu azotu nie wiąże się z aktywacją cyklazy guanylowej (LEE i współaut. 1995).

Ustalenie roli cADPR w regulacji metabolizmu wapniowego i wyjaśnienie znaczenia NAD^+ w tym procesie zwróciło uwagę na możliwy udział innych dinukleotydów (np. NADP^+) w omawianych zjawiskach. Ostatnie dwa lata przyniosły szereg odkryć na tym polu. W 1996 roku doniesiono (VU i współaut. 1996), że cyklaza cADPR z *Aplysia californica* jest w stanie wykorzystywać jako substrat NADP^+ zamiast NAD^+ i wytwarzać ufosforylowaną pochodną cADPR (2-P-cADPR). Podobny wynik uzyskano dla bifunkcyjnego enzymu ze śledziony psa, przy czym enzym ten wykazuje wyższe powinowactwo do NADP^+ niż NAD^+ , a K_m dla NADP^+ jest niższe niż komórkowe stężenie tego dinukleotydu. Co więcej, 2-P-cADPR aktywuje uwalnianie jonów wapniowych z pęcherzyków mikrosomalnych otrzymanych z mózgu szczura. Wykazano, że związek ten nie wykazuje krzyżowego odwrażliwienia kanałów wapniowych w stosunku do trisfosforanu inozytolu, natomiast aktywuje kanały wrażliwe na prokainę oraz ulegające odwrażliwieniu przez cADPR. Sugeruje to, że cADPR i jego ufosforylowana pochodna oddziałują z tymi samymi receptorami w błonach siateczki śródplazmatycznej (VU i współaut. 1996). W tym samym czasie ukazały się prace, w których udowodniano, że 2-P-cADPR nie jest jedynym metabolitem NADP^+ zaangażowanym w metabolizm wapniowy (AARHUS i współaut. 1995). Wykazano, że w warunkach

podwyższonego pH, NADP^+ zostaje przekształcany w pochodną powodującą niezwykle silne, porównywalne z efektem cADPR uwalnianie jonów wapniowych z mikrosomów z oocytów jeżowca. Szczegółowe badania pozwoliły na ustalenie, że związkiem tym jest produkt przekształcenia reszty amidu kwasu nikotynowego w cząsteczce NADP^+ w resztę kwasu nikotynowego (NAADP^+ , nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate czyli fosforan dinukleotydu nikotyniano-adeninowego). Uwalnianie jonów wapnia indukowane przez ten aktywator nie podlega odwrażliwieniu w wyniku preinkubacji mikrosomów z oocytów jeżowca z cADPR lub trisfosforanem inozytolu, co sugeruje istnienie trzeciej drogi wypływu wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych. Ponadto w obecności tio-NADP^+ (inhibitora aktywowanego przez NAADP^+ wypływu jonów wapniowych z cystern siateczki śródplazmatycznej) dochodzi do zahamowania stymulowanego przez NAADP^+ uwalniania jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych, podczas gdy efekty cADPR i trisfosforanu inozytolu nie ulegają zmianie. Inhibitory receptorów IP_3 i rianodynowych nie obniżają efektywności NAADP^+ . Co więcej, wirowanie mikrosomów z oocytów jeżowca w gradiencie Perkolu pozwoliło na wyizolowanie osobnej puli pęcherzyków, utworzonych przez błony siateczki śródplazmatycznej wrażliwych na NAADP^+ ale nie na cADPR ani trisfosforan inozytolu. Sugestia na temat roli NAADP^+ jako cząsteczki sygnałowej w warunkach *in vivo* została wzmocniona odkryciem, że związek ten może powstawać w wyniku wymiany reszty amidu kwasu nikotynowego na kwas nikotynowy. Reakcja ta zachodzi w obecności kwasu nikotynowego w warunkach obniżonego pH i jest katalizowana przez cyklazę ADPR z *Aplysia californica* a także przez CD38. A zatem, enzymy o aktywności cyklazy cADPR wykazują także zdolność do katalizowania reakcji syntezy NAADP^+ , a wybór drogi zależy od kwasowości środowiska i obecności kwasu nikotynowego. Co prawda, zarówno stężenie kwasu nikotynowego, jak i zakres

kwasowości, optymalne do syntezy NAADP^+ , nie mieszczą się w granicach fizjologicznych, występujących w cytosolu komórek w normalnych warunkach. Jednakże, ponieważ bardzo znaczący efekt NAADP^+ obserwowano już przy stężeniu 30 nM, nie wyklucza się znaczenia tego aktywatora, gdyż osiągnięcie tak niskiego stężenia w komórce wymaga aktywności enzymu dalekiej od maksymalnej. Ponadto można domniemywać, że cyklaza z *Aplysia* znajduje się w przedziałach komórkowych o obniżonym pH. Podobnie endocytoza białek CD38 obserwowana w wyniku aktywacji limfocytów skłania do doświadczalnej weryfikacji sugestii, że antygeny te są transportowane do pęcherzyków błonowych, których wnętrze wykazuje niskie pH (AARHUS i współaut. 1995, PEREZ-TERZIC 1995, AARHUS i współaut. 1996).

Pytanie o znaczenie fizjologiczne NAADP^+ jest ciągle bez ostatecznej odpowiedzi. Ostatnio wykazano, że preinkubacja zarówno izolowanych mikrosomów, jak i całych oocytów jeżowca w obecności tego dinukleotydu powoduje odwrażliwienie jego specyficznych receptorów, lecz nie wpływa na uwalnianie jonów wapnia przez cADPR lub IP_3 . Co więcej, stwierdzono, że krótko po zapłodnieniu dochodzi do odwrażliwienia kanałów wapniowych aktywowanych NAADP^+ . Może to świadczyć, że zapłodnienie przejściowo aktywuje receptory wrażliwe na ten związek. Przedstawione fakty wskazują na wielką złożoność i wielorakość systemów uruchamiania puli wapniowej w komórkach eukariotycznych. Przynajmniej w przypadku oocytów jeżowca postuluje się istnienie co najmniej trzech niezależnych dróg uwalniania jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych: 1. aktywowana IP_3 , 2. aktywowana cADPR i 3. zależna od NAADP^+ . Ta ostatnia jednak, aby być w pełni uznana, wymaga doświadczalnej weryfikacji polegającej na udowodnieniu, że w oocytach jeżowca (a może też w innych komórkach) *in vivo* dochodzi do biosyntezy i co niezmiernie ważne, degradacji NAADP^+ .

CYCLIC ADP-RIBOSE, A NEW SIGNALLING MOLECULE IN CALCIUM METABOLISM

Summary

Cyclic ADP-ribose (cADPR) is a new member of the cyclic nucleotides family. It is believed to be a signalling molecule stimulating calcium efflux from intracellular calcium stores in a wide variety of eucariotic cells. This compound interacts with receptors exhibiting pharmacological properties typical of calcium channels activated by ryanodine and responsible for the calcium induced calcium release (CICR) phenomenon. cADPR is formed from NAD^+

and decomposed to ADP-ribose in the reactions catalyzed by mono- or bifunctional enzymes exhibiting the activities of either ADP-ribose cyclase or cADPR hydrolase, respectively or both. The rate of cADPR synthesis depends on the cyclic GMP level. Additionally, the regulatory role of NADP^+ derivatives, especially nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP^+), in calcium release is postulated.

LITERATURA

- AARHUS R., DICKEY D. M., GRAEFF R. M., GEE K. R., WALESETH T. F., LEE H. C., 1996. Activation and inactivation of Ca^{2+} release by NAADP⁺. *J. Biol. Chem.* 271, 8513-8516.
- AARHUS R., GRAEFF R. M., DICKEY D. M., WALESETH T. F., LEE H. C., 1995. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP⁺. *J. Biol. Chem.* 270, 30327-30333.
- ALLEN G. J., MUIR S. R., SANDERS D., 1995. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both insP_3 and cyclic ADP-ribose. *Science* 268, 735-737.
- BERRIDGE M. J., 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- CLAPPER D. L., WALESETH T. F., DARGIE P. J., LEE H. C., 1987. Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol triphosphate. *J. Biol. Chem.* 262, 9561-9568.
- CLEMENTI E., RICCIO M., SCIORATI C., NISTICO G., MELDOLESI J., 1996. The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 271, 17739-17745.
- CORONADO R., MORISSETTE J., SUKHAREVA M., VAUGHAN D. M., 1994. Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.* 266, C1485-C1504.
- DARGIE P. J., AGRE M. C., LEE H. C., 1990. Comparison of Ca^{2+} mobilizing activities of cyclic ADP-ribose and inositol triphosphate. *Cell. Regul.* 1, 279-290.
- GALIONE A., LEE H. C., BUSA W. B., 1991. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates and its modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 253, 1143-1146.
- GALIONE A., WHITE A., WILLMOTT N., TURNER M., POTTER B. V. L., WATSON S. P., 1993. cGMP mobilizes intracellular Ca^{2+} in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature* 365, 456-459.
- GIANNINI G., CLEMENTI E., CECI R., MARZIALI G., SORRENTINO V., 1992. Expression of a ryanodine receptor- Ca^{2+} channel that is regulated by TGF β . *Science* 257, 91-94.
- GLICK D. L., HELLMICH M. R., BEVSHAVEN S., TEMPST P., BAGLEY H., STRUMWASSER F., 1991. Primary structure of a molluscan egg-specific NAD-ase, a second messenger enzyme. *Cell Regul.* 2, 211-218.
- HELLMICH M. R., STRUMWASSER F., 1991. Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell. Regul.* 2, 193-202.
- HOWARD M., GRIMALDI J. C., BAZAN J. F., LUND F. E., SANTOS-ARGUMENTO L., PARKHOUSE R. M. E., WALESETH T. F., LEE H. C., 1993. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalysed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262, 1056-1059.
- KIM H., JACOBSON F. L., JACOBSON M. K., 1993. Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD glycohydrolases. *Science* 261, 1330-1333.
- LAI F. A., ERICSON H. P., ROUSSEAU E., LIV Q.-Y., MEISSNER G., 1988. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331, 315-319.
- LEE H. C., 1993. Potentiation of calcium- and caffeine-induced calcium release by cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 268, 293-299.
- LEE H. C., 1994a. Cyclic ADP-ribose: A calcium mobilizing metabolite of NAD⁺. *Moll. Cell. Biochem.* 138, 229-235.
- LEE H. C., 1994b. A signalling pathway involving cyclic ADP-ribose, cGMP and nitric oxide. *News Physiol. Sci.* 9, 134-137.
- LEE H. C., AARHUS R., 1991. ADP-ribosyl cyclase: An enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell. Regul.* 2, 203-205.
- LEE H. C., AARHUS R., 1993. Wide distribution of an enzyme that catalyses the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. *Biochim. Biophys. Acta* 1164, 68-74.
- LEE H. C., AARHUS R., LEVITT D., 1994a. The crystal structure of cyclic ADP-ribose. *Nature Struct. Biol.* 1, 143-144.
- LEE H. C., GALIONE A., WALESETH T. F., 1994b. Cyclic ADP-ribose. Metabolism and calcium mobilizing function. [W:] *Vitamins and Hormones*, Litwack G. (red.), Acad. Press, Orlando, FL 48, 199-258.
- LEE H. C., GRAEFF R., WALESETH T. F., 1995. Cyclic ADP-ribose and its metabolic enzymes. *Biochimie* 77, 345-355.
- LOWENSTEIN C. J., SNYDER S. H., 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70, 705-707.
- MEISSNER G., HENDERSON J. S., 1987. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotides and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 262, 3065-3073.
- MUIR S. R., SANDERS D., 1996. Pharmacology of Ca^{2+} release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants. *FEBS Lett.* 395, 39-42.
- OKAMOTO H., TAKASAWA S., TOHGO A., 1995. New aspects of the physiological significance of NAD poly ADP-ribose and cyclic ADP-ribose. *Biochimie* 77, 356-363.
- PEREZ-TERZIC C. M., CHINI E. N., SHEN S. S., DOUSA T. P., CLAPHAM D. E., 1995. Ca^{2+} release triggered by the nikotinate adenine dinucleotide phosphate in intact sea urchin eggs. *Biochem. J.* 312, 955-959.
- RUSINKO N., LEE H. C., 1989. Widespread occurrence in animal tissues of an enzyme catalysing the conversion of NAD⁺ into cyclic metabolite with intracellular Ca^{2+} -mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* 264, 11725-11731.
- SITSAPESAN R., MCGARRY S. J., WCGILLIAMS A. J., 1995. Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca^{2+} release. *Trends Pharm. Sci.* 16, 386-391.
- SORRENTINO V., VCGOLPE P., 1993. Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharm. Sci.* 14, 98-103.
- SCGTATES D. J., WALESETH T. F., LEE H. C., 1992. Similarities in amino acid sequences of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem. Sci.* 17, 495.
- TAKASAWA S., TOHGO A., NOGUCHI N., KOGUMA T., NATA K., SUGIMOTO T., YONEKURA H., OKAMOTO H., 1993. Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP. *J. Biol. Chem.* 268, 26052-26054.
- VU C. Q., LU P.-J., CHEN C.-S., JACOBSON M. K., 1996. 2-phospho-cyclic ADP-ribose, a calcium mobilizing agent derived from NADP. *J. Biol. Chem.* 271, 4747-4754.
- WALESETH T. F., AARHUS R., KERR J. A., LEE H. C., 1993. Identification of cyclic ADP-ribose-binding proteins by phosphoaffinity labelling. *J. Biol. Chem.* 268, 26686-26691.
- WALESETH T. F., LEE H. C., 1993. Synthesis and characterization of antagonist of cyclic ADP-ribose. *Biochim. Biophys. Acta* 1178, 235-242.
- WILLMOTT N., SETHI J. K., WALESETH T. F., LEE H. C., WHITE A. M., 1996. Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 3699-3705.
- WORONCZAK J. P., BARAŃSKA J., 1993. Cykliczna ADP-ryboza — modulator uwalniania Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych. *Post. Biochem.* 39, 210-211.
- ZOCCHI E., FRANCO L., GUIDA L., BENATTI V., BARGELLES A., MALAVASI F., LEE H. C., 1993. A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribocyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 196, 1459-1465.