

*Panu Profesorowi Lechowi Wojtczakowi, mojemu wieloletniemu
Szefowi, z najlepszymi życzeniami*

JOLANTA BARAŃSKA

*Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

WAPŃ JAKO PIERWOTNY I WTÓRNY PRZEKAŹNIK INFORMACJI. UDZIAŁ Ca^{2+} W CYKLU KOMÓRKOWYM, SEKRECJI I ADHEZJI

WSTĘP

Zdolność do regulacji poziomu jonów wewnątrz ustroju stanowi fundamentalną właściwość żywych organizmów. Prawidłowe funkcjonowanie wielu komórek ssaków zależy od utrzymania w pozakomórkowych płynach ustrojowych prawie stałego stężenia jedno- i wielowartościowych kationów i anionów. Pośród tych jonów, jony wapnia pełnią funkcje specjalne, będąc niezbędnymi a jednocześnie groźnymi dla życia.

Regulacja stężenia wolnych jonów wapnia u ssaków przebiega na dwóch poziomach organizacji — komórki i ustroju. Procesy te nie są niezależne, odwrotnie, są ściśle ze sobą powiązane poprzez współzależności między płynami ustrojowymi a komórką, a także dzięki hormonom sterującym bezpośrednio lub pośrednio homeostazą Ca^{2+} na obu tych poziomach (FERRANTE i TRIGGLE 1993).

Na poziomie komórki, poczynając od drożdży a kończąc na człowieku, wapń pełni funkcje wtórnego przekaźnika, kontrolując tak różne życiowe procesy, jak poziom cyklicznych nukleotydów, wydzielanie hormonów i neurotransmiterów, czy wzrost, podział i różnicowanie. Daje także sygnał do fizjologicznej, programowanej śmierci komórki — apoptozy (RADZISZEWSKA 1995). Kiedy jednak naturalne procesy regulacyjne zawodzą, na przykład przy niedotlenieniu, wewnątrz komórki zostaje zalane przez

Ca^{2+} powodując zaburzenia osmotyczne, destrukcję i śmierć (nekroza).

Stężenie Ca^{2+} wewnątrz komórki jest niskie i w komórce niepobudzonej wynosi około 10^{-7} M. Natomiast w pozakomórkowych płynach ustrojowych poziom tego jonu jest wysoki, dziesięć tysięcy razy wyższy niż w komórce niepobudzonej, rzędu 10^{-3} M. W zależności od stanu fizjologicznego komórki stężenie Ca^{2+} zmienia się i w komórce pobudzonej osiąga wartość 10^{-6} M (BARAŃSKA 1993). Poziom Ca^{2+} w komórce nie może jednak przekroczyć pewnego krytycznego stężenia, gdyż jak powiedziano powyżej, jon ten w wysokich stężeniach jest cytotoksyczny. Ta konieczność utrzymania określonego poziomu Ca^{2+} jest możliwa jedynie dzięki skomplikowanemu układowi pomp, wymienniczy i kanałów, poprzez które nadmiar Ca^{2+} jest usuwany z komórki na zewnątrz lub magazynowany w wewnątrzkomórkowych organellach (FAMULSKI 1989, KUŹNICKI 1989).

Na poziomie ustroju wchłanianie i wydzielanie Ca^{2+} jest kontrolowane przez trzy hormony: parathormon, kalcitoninę i witaminę D. Hormony te powodują, że stężenie wolnych jonów wapnia w płynach ustrojowych ssaków jest prawie stałe (1–1,3 mmola/l); poziom ten jest regulowany przez sam wapń. Nieznaczny spadek stężenia Ca^{2+} we krwi jest wyczuwany przez gruczoły przytarczyczne, które reagują wzmożo-

Wykaz skrótów używanych w tekście: AC — cyklaza adenylationowa; er — retikulum endoplazmatyczne (siateczka śródplazmatyczna); CaM — kalmodulina; Ca^{2+}_o — zewnątrzkomórkowe jony wapnia; $[\text{Ca}^{2+}]_c$ — stężenie jonów wapnia w cytosolu; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia; $[\text{Ca}^{2+}]_o$ — zewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia; DAG — 1,2-diacylglicerol; DBHQ — 2,5-di-tertbutylohydrochinon; EGF — naskórkowy czynnik wzrostowy; InsP_3 — trisfosfoinozytol; InsP_3R — receptor trójfosfoinozytolu; m — błona komórkowa; PKA — kinaza białkowa A; PKC — kinaza białkowa C; $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ — fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; PTH — parathormon; RianR — receptor rianodinowy.

nym wydzielaniem parathormonu. Hormon ten stymuluje wydzielanie wapnia z kości, zwiększa resorpcję wapnia z kanalików nerkowych, a także aktywuje analog witaminy D, który zwiększa wchłanianie Ca^{2+} w jelicie (BROWN 1991).

Badania lat ostatnich wykazały, że komórki gruczołu przytarczycznego oraz innych tkanek mają receptory zdolne do rozpoznawania i odpowiedzi na zewnątrzkomórkowy sygnał wapniowy. Zatem Ca^{2+} można uznać nie tylko za wtórny ale i pierwotny przekaźnik informacji (BROWN 1991).

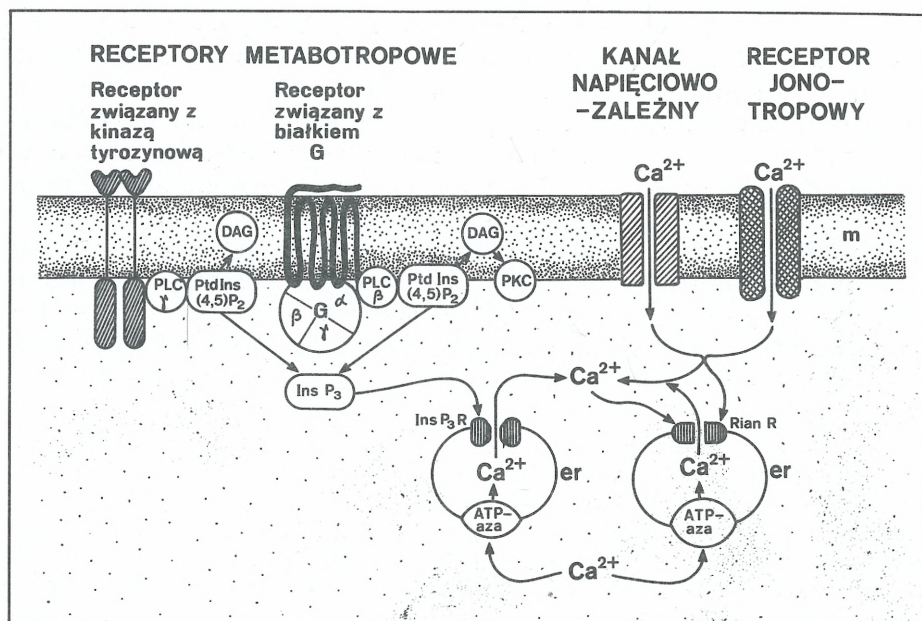
WAPŃ JAKO WTÓRNY PRZEKAŹNIK INFORMACJI

W cytosolu komórki niepobudzonej stężenie wolnych jonów wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) jest ściśle kontrolowane i utrzymywane na poziomie 50–100 nmoli/l. Wnikanie Ca^{2+} do komórki, jego magazynowanie i usuwanie jest wynikiem działania swoistych mechanizmów. Nadmiar Ca^{2+} z cytosolu komórki jest usuwany na zewnątrz przez dwa zasadnicze mechanizmy. Jednym z nich jest enzym błony komórkowej, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPaza, zwana także pompą wapniową (VETULANI 1995). ATPaza ta pompuje Ca^{2+} w stosunku stechiometrycznym $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+} = 1:1$. Innym systemem, dzięki któremu Ca^{2+} wydostają się na zewnątrz komórki jest tak zwany wymienniczek wapniowo-sodowy.

Regulacja poziomu Ca^{2+} w komórce zachodzi również dzięki wnikaniu Ca^{2+} z cytoplazmy do organelli wewnątrzkomórkowych, takich jak siateczka śródplazmatyczna, mitochondria i jądra (WIKTOREK i współaut. 1995). Organelle ta-

Artykuł ten przedstawia rolę wapnia jako wtórnego i pierwotnego przekaźnika informacji w tak różnych i istotnych procesach, jak cykl komórkowy, uwalnianie neuroprzekaźników, sekrecja pęcherzyków wydzielniczych, współdziałanie z cytoszkieletem, czy połączenia adhezyjne. Pokazując, że w procesach tych biorą udział jony wapnia uwalniane z wewnątrzkomórkowych magazynów, wnikające do komórki z przestrzeni pozakomórkowej, czy działające zewnętrznie na specyficzne receptory ilustruje mechanizmy, dzięki którym jony te mogą regulować przemiany metaboliczne komórek ustroju.

kie, jak mitochondria są ładowane Ca^{2+} za pomocą wymiennika protonowego. Wydaje się jednak, że odgrywają one małą rolę w warunkach fizjologicznych i zaczynają akumulować wapń, gdy jego stężenie w cytosolu przekroczy 5–10 $\mu\text{moli/l}$, a więc w stanach silnego pobudzenia lub patologii (VETULANI 1995). Zarówno jądro, jak i mitochondria są magazynami o małym powinowactwie (choć dużej pojemności) do Ca^{2+} . Główną rolę w utrzymywaniu homeostazy wapniowej w komórce odgrywa siateczka śródplazmatyczna (BERRIDGE 1993). Jony wapnia do wnętrza tej organelli są pompowane przez $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPazę (rys. 1). Enzym ten, występujący w siateczce sarkoplazmatycznej komórek mięśni i siateczce śródplazmatycznej komórek niemięśniowych, różni się szeregiem właściwości od ATPazy występującej w błonie komórkowej. Do wnętrza tych organelli jony wapnia są pompowane w stosunku stechiometrycznym



Rys. 1. Schemat mobilizacji Ca^{2+} w komórce.

Jony wapnia wnikają do komórki poprzez kanały napięciowo-zależne i receptory jonotropowe (komórki pobudliwe). Mobilizacja Ca^{2+} może zachodzić również w wyniku aktywacji receptorów metabotropowych (komórki niepobudliwe i pobudliwe). Ta aktywacja powoduje kaskadę reakcji chemicznych i uwolnienie Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów. Objasnienie symboli w wykazie stosowanych skrótów.

ATP/Ca²⁺ = 1:2. Zmagazynowany wapń wewnątrz siateczki 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 (BARAŃSKA 1992, BERRIDGE 1993) (rys. 1).

Zwiększenie stężenia Ca²⁺ w komórce powoduje kaskadę reakcji prowadzącą do określonej odpowiedzi metabolicznej. Wnikanie Ca²⁺ do wnętrza komórek pobudliwych zachodzi z udziałem heterogennej klasy białek tworzących plazmatyczne kanały jonowe zależne od napięcia typu L, P, Q, N, R i T, czy tak zwane kanały jonotropowe, jak na przykład receptor NMDA (rys. 1). Kanały napięciowo-zależne są aktywowane przez depolaryzację. Różnią się one między sobą właściwościami biofizycznymi i farmakologicznymi (bliższe szczegóły działania tych kanałów i ich właściwości farmakologicznych są opisane w VETULANI 1995). Kanały jonowe przez które wnika wapń 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 zewnętrznych bodźców następuje mobilizacja Ca²⁺ w komórce nawet w nieobecności tego jonu w środowisku zewnętrznym. Jest to spowodowane uwalnianiem Ca²⁺ do cytoplazmy z wewnątrzkomórkowych magazynów (BARAŃSKA 1992, 1993, 1995, BERRIDGE 1993). Właśnie ta obserwacja, że zewnętrzny bodziec może wywołać mobilizację Ca²⁺ w komórce nie dzięki napływowi tych jonów z przestrzeni pozakomórkowej a dzięki jonom znajdującym się we wnętrzu komórki pozwala uważać Ca²⁺ za wtórny przekaznik informacji.

Sekwencja zdarzeń prowadząca od bodźca działającego na określony receptor w błonie komórkowej do mobilizacji Ca²⁺ w komórce jest już dość dobrze poznana (rys. 1). Wiadomo zatem, że substancja sygnałowa działając na receptor (w odróżnieniu od kanałów napięciowo-zależnych, czy jonotropowych, ten typ receptorów nazywamy receptorami metabotropowymi) przekazuje sygnał bądź poprzez białko G na specyficzną fosfolipazę C typu β ; bądź też receptor kinazo-tyrozynowy aktywuje bezpośrednio fosfolipazę C typu γ — z pominięciem białka G (BARAŃSKA 1995, KAMIŃSKA-KACZMAREK 1995). Zaktywowane fosfolipazy działają na PtdIns(4,5)P₂ powodując powstanie trisfosfoinozytolu (InsP₃) i 1,2-diacylglicerolu (DAG) jako produktów rozpadu tego fosfolipidu (rys. 1).

InsP₃ i DAG to wtórne przekazniki informacji. DAG pozostaje w błonie plazmatycznej i aktywuje zależną od DAG i Ca²⁺ kinazę białkową C (PKC) (NISHIZUKA 1992). Drugim wtórnym przekaznikiem informacji powstającym z rozpadu PtdIns(4,5)P₂ jest InsP₃. Wiemy, że InsP₃ wiąże się ze specyficznymi receptorami (InsP₃R) znajdującymi się w błonie siateczki śródplazmatycznej i uwalnia Ca²⁺ do cytosolu (rys. 1). Receptory te są tetramerami, których podjednostki otaczają kanał, przez który Ca²⁺ z wnętrza siateczki śródplazmatycznej zostają uwolnione do cytosolu. InsP₃ wiążąc się z receptorem moduluje tetramer powodując otwieranie kanału (BARAŃSKA 1995, HENZI i MACDERMOTT 1992). Wykazano także, że w komórkach znajduje się jeszcze inny typ receptora wewnątrzkomórkowego, odpowiedzialnego za uwalnianie Ca²⁺. Jest on podobny do receptora rianodinowego mięśni szkieletowych. Ponieważ receptor ten, podobnie jak mięśniowy, wiąże alkaloid roślinny — rianodinę, jest on także nazywany receptorem rianodinowym (RianR). Otwieranie kanału tego receptora jest indukowane przez Ca²⁺, w tak zwanym procesie „calcium induced-calcium release” (rys. 1). Podczas gdy receptory InsP₃ są uniwersalne i występują we wszystkich dotychczas badanych typach komórek, receptory rianodinowe występują zasadniczo w komórkach pobudliwych, takich jak na przykład mięśnie gładkie, mięsień sercowy, czy neurony.

Badania w mikroskopie konfokalnym prowadzone na komórkach wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi ujawniły, że siateczka śródplazmatyczna stanowi ciągłą strukturę. Badania z użyciem technik cytoimmunologicznych wykazały, że w neuronach Purkinjego receptory InsP₃ występują jedynie w błonach gładkiej siateczki śródplazmatycznej, tworząc mikrodomeny. Nie ma ich natomiast w błonach szorstkiego retikulum (MIYAZAKI 1995).

Mobilizacja Ca²⁺ w komórce jest procesem dwustopniowym. Uwolnienie Ca²⁺ z siateczki śródplazmatycznej powoduje w następnej fazie wnikanie tego jonu do wnętrza komórki z przestrzeni pozakomórkowych. Jak sugerował PUTNEY, ta druga faza jest spowodowana nagłym opróżnieniem magazynów z Ca²⁺ i destabilizacją błony komórkowej w miejscach, gdzie odległość błony od siateczki śródplazmatycznej jest niewielka (PUTNEY i BIRD 1993). W tych właśnie miejscach następowałoby ewentualne otwieranie kanałów i wnikanie Ca²⁺ z przestrzeni pozakomórkowych do wnętrza komórki. Istnieje jednak wiele innych hipotez tłumaczących, w jaki sposób informacja o opróżnieniu siateczki śródplazmatycznej z jonów wapnia dociera do błony komórkowej; między innymi postuluje się utwo-

rzenie w siateczce specjalnego czynnika tak zwanego CIF (Ca^{2+} influx factor) dyfundującego do błony komórkowej po opróżnieniu siateczki (MAKOWSKA i DUSZYŃSKI 1996).

Jak każdy wtórny przekaźnik informacji, wapń wchodzi w interakcję ze specyficznymi, docelowymi makrocząsteczkami, inicjując kaskadę reakcji powodujących zmianę metabolicznych funkcji komórki. Komórki zawierają liczne białka mające zdolność wiązania jonów wapnia; często są to enzymy aktywowane przez to połączenie. W większości komórek najbardziej znanym białkiem wiążącym Ca^{2+} jest kalmodulina (BRAUN i SCHULMAN 1995). Jest to cytosolowe białko termostabilne (17 kDa), wiążące 4 jony wapnia. Ten kompleks aktywuje liczne kinazy białkowe fosforylujące różne biał-

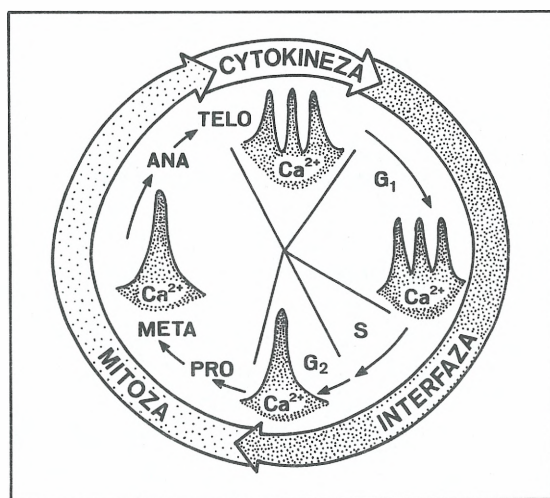
ka: specyficzne (np. kinazę lekkiego łańcucha miozyny) i wielofunkcyjne (np. kinazę białkową I i II zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny (CaM)). Ca^{2+} /CaM kinaza II wydaje się być białkiem uniwersalnym, została bowiem znaleziona we wszystkich dotychczas badanych typach komórek. Wśród listy licznych substratów tej kinazy wymienić można tak różne, jak na przykład: Ca^{2+} -ATPazę, syntazę NO, białko CREB regulujące transkrypcję (w komórkach PC12), czy białka cytoszkieletu. Aktywacja kalmoduliny wydaje się być zatem jedną z głównych funkcji Ca^{2+} jako wtórnego przekaźnika informacji, choć jony wapnia są również konieczne do pełnej aktywacji licznych izoform PKC, czy działania białek ułatwiających adhezję — kadheryn.

UDZIAŁ Ca^{2+} W CYKLU KOMÓRKOWYM

Przechodzenie komórek przez cykl komórkowy jest złożonym procesem regulowanym przez liczne czynniki zewnętrzne i wewnętrzne. Po zadziałaniu czynników wzrostowych i ich interakcji z odpowiednimi receptorami błony komórkowej ulega uruchomieniu kaskada reakcji biochemicznych przenosząc sygnał do jądra komórkowego. W jądrze następuje transkrypcja genów tak zwanej wczesnej i późnej odpowiedzi. Ekspresja tych genów jest częścią programu genetycznego odpowiedzialnego za wyjście komórek ze stanu spoczynkowego i doprowadzenie do podziału.

W zdolnych do podziału komórkach eukariotycznych wyróżnić można dwa główne etapy: mitozę i cytokinezę (rys. 2). W wyniku mitozy (składającej się z profazy, metafazy, anafazy i telofazy) następuje podział jądra; w cytokinezie następuje podział cytoplazmy. Potomna komór-

ka wchodzi w tak zwaną interfazę — etap pośredni między jednym a drugim podziałem. Interfaza składa się z fazy G_1 , w której komórka syntetyzuje wiele potrzebnych jej składników dla powielenia materiału genetycznego i rośnie, oraz fazy S i G_2 (rys. 2). W fazie S następuje synteza DNA oraz białkowych składników chromosomów — histonów. Po ukończeniu replikacji DNA, komórki wchodzi w fazę G_2 . Faza G_2 , w której następuje intensywna synteza białek, ale nie histonów, kończy się z rozpoczęciem następnego podziału. Nie dzielące się komórki pozostają w tak zwanej fazie G_0 , odpowiadającej początkowemu etapowi fazy G_1 . Niektóre komórki, jak na przykład erytrocyty, czy komórki nerwowe po osiągnięciu dojrzałości nie ulegają podziałom, podczas gdy na przykład komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego i skóry dzielą się przez cały okres swego życia.



Rys. 2. Mobilizacja Ca^{2+} w czasie cyklu komórkowego.

Podstawowe mechanizmy regulacyjne w cyklu komórkowym są wspólne dla wszystkich komórek eukariotycznych. Cykl komórkowy jest regulowany przez cykliny, białka nagromadzające się kolejno w czasie interfazy (cyklina C, D, E — faza G₁, cyklina A, B — faza S) i ulegające odpowiednio kolejnym degradacjom. Cykliny wchodzą w kompleksy z kinazami serynowo-treoninowymi, tak zwanymi kinazami cyklino-zależnymi (cdk) i stanowią regulatorową podjednostkę tych kompleksów. W komórkach ssaków wykryto kilkanaście kinaz cyklino-zależnych. Ich aktywacja i wynikająca z tego fosforylacja właściwych substratów zmienia się periodycznie w cyklu komórkowym (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1993, 1996).

Podobnie jak cykliny i kinazy cyklino-zależne, które pojawiają się w cyklu komórkowym periodycznie, także na różnych, ściśle określonych etapach cyklu następuje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺. Badania prowadzone na zapłodnionych jajach jeźowca oraz hodowanych komórkach ssaków wykazały, że mobilizacja Ca²⁺ w czasie trwania cyklu komórkowego zachodzi czterokrotnie: i) w późnej fazie G₁, przed rozpoczęciem fazy S; ii) przy końcu fazy G₂, przed rozpoczęciem mitozy; iii) w mitozie, między metafazą a anafazą; iiiii) w czasie cytokinezy (WHITAKER i PATEL 1990, WHITFIELD i współaut. 1995) (rys. 2).

W fazie G₁ następuje inicjacja syntezy cyklin oraz akumulacja i powielenie materiału genetycznego. Jest interesujące, że komórki hodowane aby wejść w fazę G₁ wymagają obecności zewnątrzkomórkowych jonów wapnia: w przypadku na przykład hepatocytów, fibroblastów i limfocytów w stężeniach rzędu 1,0–1,5 mM, a w przypadku komórek nabłonkowych jelita i skóry rzędu 0,05–0,10 mM (WHITFIELD i współaut. 1995). Przy stężeniach niższych nie dochodzi do replikacji DNA, bowiem poziom akumulacji materiału genetycznego (jak np. DNA-polimerazy α) jest za niski. Zbyt wysokie stężenie pozakomórkowych jonów wapnia prowadzi również do zatrzymania podziału. Następuje ono w wyniku komplikacji omówionych szerzej w rozdziale traktującym o wapniu jako pierwotnym przekazniku informacji.

W późnej fazie G₁, gdy komórka jest już naszykowana do syntezy DNA następuje pierwsza z czterech mobilizacji Ca²⁺ w komórce (rys. 2). Jony wapnia zostają uwolnione do cytosolu z wewnątrzkomórkowych magazynów i wnikają do jądra poprzez pory jądrowe, lub są pompowane do otoczki jądrowej przez Ca²⁺-ATPazę. Oscylacje Ca²⁺ w cytosolu utrzymują się aż do rozpoczęcia fazy S, kiedy to wzrasta poziom wapnia w jądrze i powstały jądrowy

kompleks Ca²⁺/CaM aktywuje transport białek koniecznych do replikacji DNA do wnętrza jądra. Kompleks ten wiąże się ponadto z białkami, na przykład z białkiem 68 kDa współdziałającym z DNA polimerazą α. W komórkach T51B wątroby szczura, blokery kompleksu Ca²⁺/CaM zatrzymują cykl komórkowy w fazie S, pokazując jak istotne jest jego znaczenie dla replikacji DNA i rozpoczęcia mitozy (WHITFIELD i współaut. 1995).

Następny wzrost stężenia Ca²⁺ w cytoplazmie następuje przy końcu fazy G₂, przed rozpoczęciem mitozy (rys. 2). Powstający teraz kompleks Ca²⁺/CaM wydaje się być konieczny do aktywacji fosfatazy cdc25, defosforylującej tyrozynę i treoninę w podjednostce katalitycznej kinazy związanej z cykliną A lub B (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1993). Dzięki temu ujawnia się aktywność katalityczna tych podjednostek. Prowadzi to do rozpadu otoczki jądrowej, kondensacji chromosomów i utworzenia wrzeciona kariokinetycznego zapoczątkowując mitozę. Kolejne podwyższenie [Ca²⁺]_c następuje między metafazą a anafazą. Kompleks Ca²⁺/CaM bierze teraz udział w degradacji cyklin przez ich ubikwitynację i fosforylację oraz aktywuje proteazy. Ostatni wzrost [Ca²⁺]_c następuje w cytokinezie (rys. 2), wskazując na rolę tego jonu w procesach związanych z podziałem cytoplazmy.

Grupa badaczy z pracowni Whitakera wykazała, że w zapłodnionym jaju jeźowca wraz z cykliczną mobilizacją Ca²⁺ w tych samych punktach cyklu następował wzrost poziomu InsP₃ (CLAPA i współaut. 1994). Proces ten nie był spowodowany dodatkiem jakiegokolwiek zewnętrznego agonisty. Badania wykazały ponadto, że wzrost InsP₃ nie jest skorelowany z pojawianiem się w komórce określonych kinaz cyklino-zależnych, użycie bowiem specyficznych inhibitorów cyklin (jak np. emetyny) nie miało wpływu na poziom tego związku. Był on natomiast wyraźnie skorelowany ze zwiększeniem [Ca²⁺]_c, wskazując na uwalnianie Ca²⁺ z magazynów siateczki śródplazmatycznej przez znajdujące się w błonie tej organelli receptory InsP₃.

Do podobnych wniosków doszli Short i współautorzy (1993). Badacze ci poddawali znajdujące się w fazie G₀ hodowane komórki mięśni gładkich DDT₁MF działaniu tapsigarginy i 2,5-di-tert-butylhydrochinonu (DBHQ). Oba związki są specyficznymi inhibitorami Ca²⁺-ATPazy siateczki śródplazmatycznej, nie działają natomiast na Ca²⁺-ATPazę błony komórkowej. Zahamowanie enzymu prowadzi do wycieku Ca²⁺ z wnętrza tej organelli, z puli odpowiadającej na działanie InsP₃, choć proces ten odbywa się bez udziału InsP₃. Należy dodać, że tapsigargina hamuje enzym nieodwracalnie,

a DBHQ — odwracalnie. Toteż po usunięciu DBHQ ze środowiska pula wapniowa magazynu siateczki śródplazmatycznej napełniała się ponownie Ca^{2+} i 14 godzin później komórki wchodziły w fazę S cyklu komórkowego. Zjawisko to nie występowało w komórkach traktowanych tapsigarginą. Natomiast, gdy po usunięciu tego inhibitora komórki były traktowane przez 6 go-

dzin wysokimi stężeniami surowicy co powodowało wzmoczoną syntezę nowych cząsteczek Ca^{2+} -ATPazy, wtedy po następnych 14 godzinach komórka wchodziła w fazę S. A więc wykazano, że dla wzrostu i podziału komórki są konieczne jony wapnia i że są one zmagazynowane i uwalniane z cystern siateczki śródplazmatycznej.

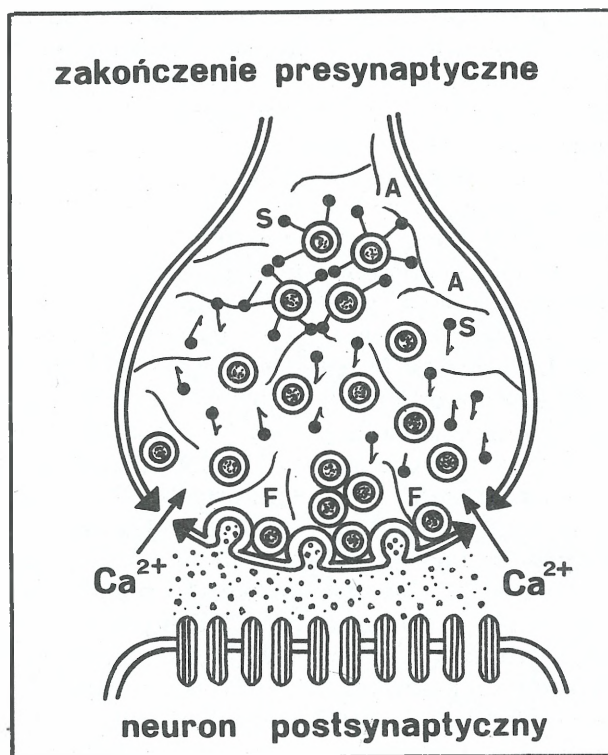
ROLA Ca^{2+} W WYDZIELANIU NEUROPRZEKAŹNIKÓW I PEŁCZERZYKÓW WYDZIELNICZYCH. WSPÓLDZIAŁANIE Z CYTOSZKIELETEM

Uwalnianie neuroprzeakaźników z neuronów i pęcherzyków wydzielniczych z komórek sekcyjnych jest od dłuższego czasu w centrum uwagi badaczy. Zainteresowanie tym przedmiotem wzrosło szczególnie, gdy odkryto, jak ważną rolę odgrywa tu cytoszkielet i współdziałające z nim białka (TRIFARO i VITALE 1993). Proces egzocytozy, dzięki któremu następuje wydzielanie pozostaje pod kontrolą Ca^{2+} i wymaga podwyższonego wewnątrzkomórkowego stężenia tych jonów. Rola Ca^{2+} w tym procesie wydaje się być związana z regulacją dynamicznych zmian struktury cytoszkieletu, a szczególnie sieci włókien aktynowych.

Uwolnienie neuroprzeakaźników zachodzi w następstwie napływu Ca^{2+} do zakończeń neuronów presynaptycznych (rys. 3). Potencjał czynnościowy dociera do zakończenia (kolbki) presynaptycznej i powoduje zmianę potencjału tej błony. Zjawisko to uczynnia wrażliwe na zmiany napięcia kanały wapniowe w błonie komórkowej. Jony wapnia z otaczającego płynu tkankowego dostają się do zakończeń aksonu i wywołują kaskadę reakcji chemicznych. Wyprodukowane neurotransmitery są gromadzone w zakończeniach presynaptycznych w tak zwanych pęcherzykach synaptycznych. Użycie mikroskopu elektronowego pokazało grona pęcherzyków synaptycznych w tak zwanej strefie aktywnej, zgrupowane tuż przy błonie komórkowej oddzielającej zakończenie aksonu od szczeliny synaptycznej (TRIFARO i VITALE 1993). Pęcherzyki te są już jak gdyby przygotowane do egzocytozy. Nieco dalej od błony komórkowej, nie stykając się z nią bezpośrednio, znajdują się unieruchomione pęcherzyki związane ze strukturami cytoszkieletu poprzez specjalne białko, synapsynę I (rys. 3). W fazie aktywnej komórki znajdują się też zależne od potencjału kanały wapniowe. Depolaryzacja błony powoduje otwarcie kanałów i wniknięcie Ca^{2+} do wnętrza zakończenia presynaptycznego. Powoduje to fuzję błony plazmatycznej pęcherzyków z błoną presynaptyczną i uwolnienie zawartości pęcherzyków do szczeliny synaptycznej (rys. 3). Uwol-

nione neuroprzeakaźniki dyfundują teraz do błony komórkowej neuronu postsynaptycznego i działając na receptory jego błony komórkowej powodują określoną odpowiedź metaboliczną. Sygnał od jednego do drugiego neuronu ma zatem w tym przypadku charakter impulsu chemicznego.

Jaki jest mechanizm działania Ca^{2+} w tym procesie? Wykazano, że wapń wniknąwszy do



Rys. 3. Uwalnianie neuroprzeakaźników z pęcherzyków synaptycznych (wg TRIFARO i VITALE 1993).

U góry rysunku przedstawiono pęcherzyki synaptyczne związane ze strukturami cytoszkieletu poprzez białko, synapsynę I (I-S). Wniknięcie Ca^{2+} do zakończenia presynaptycznego powoduje aktywację kalmoduliny (CaM), a następnie aktywację zależnej od Ca^{2+} i CaM kinazy białkowej II. Enzym ten fosforyluje synapsynę. Ufosforylowana synapsyna (I) oddysocjuje od pęcherzyka, który uwolniony przesuwa się (dół rysunku) do szczeliny synaptycznej i uwalnia do niej neuroprzeakaźnik. A i F — białka cytoszkieletu: A — aktyna; F — fodryna.

zakończenia presynaptycznego wiąże się z kalmoduliną i w kompleksie z tym białkiem aktywuje zależną od Ca^{2+} i kalmoduliny kinazę białkową II ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ II), która fosforyluje synapsynę I. Mechanizm ten został udokumentowany w doświadczeniach, w których synapsyna I (ufosforylowana, lub nieufosforylowana), bądź kinaza $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ II były podawane w mikroińiekcjach do zakończeń presynaptycznych synaps kałamarnic. Ufosforylowana synapsyna I nabywa zdolność oddysocjowania zarówno od filamentów aktyny, tworzących sieć włókien białkowych, jak i pęcherzyków synaptycznych, które mogą teraz poruszać się i ulegać egzocytozie (BENEFENATI i współaut. 1992) (rys. 3).

Synapsyna I występuje w ośrodkowym układzie nerwowym i jest jednym z głównych substratów kinaz białkowych. Składa się z dwóch domen: domeny globularnej, N-końcowej, tak zwanej „głowy” (86 kDa), odpornej na trawienie kolagenazą i wydłużonej domeny C-terminalnej, tak zwanej „ogonowej”, wrażliwej na to trawienie (80 kDa). W cząsteczce tego białka znajdują się trzy miejsca ulegające fosforylacji. W części „głowej” jest to jedno miejsce fosforylowane zarówno przez zależną od cAMP kinazę białkową A, jak i kinazę $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ I. W części „ogonowej” dwa miejsca są fosforylowane przez kinazę $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ II (BENEFENATI i współaut. 1992). Synapsyna ponadto posiada dwa miejsca, którymi wiąże się do F-aktyny i dlatego pojedyncza cząsteczka tego białka może łączyć krzyżowo, tworząc mostki, dwa filamenty aktynowe. Globularna część „głowa” synapsyny jest związana z aktyną, ale może także wiązać się z mikrotubulami, które również występują w zakończeniu presynaptycznym. W odróżnieniu jednak od włókien aktynowych, mikrotubule nie osiągają zakończenia presynaptycznego. Część „ogonowa” synapsyny I jest związana bądź z pęcherzykiem synaptycznym, bądź z aktyną. Fosforylacja synapsyny, w jej części „ogonowej” przez kinazę $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ II umożliwia odłączenie się pęcherzyka synaptycznego od synapsyny i pośrednio od sieci włókien aktynowych cytoszkieletu, pozwalając na jego przesunięcie do strefy aktywnej neuronu.

W zakończeniach presynaptycznych występuje druga klasa białek cytoszkieletu tworzących filamenty — jest to tak zwana fodryna (kalspektyna) (rys. 3). Fodryna może wiązać pęcherzyk synaptyczny w strefie aktywnej z błoną komórkową. Wiązanie pęcherzyka z błoną odbywa się bądź bezpośrednio z udziałem tylko fodryny, bądź dodatkowo jeszcze poprzez syna-

psynę. Fodryna jest również substratem kinazy $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ II i jej fosforylacja także ułatwia egzocytozę pęcherzyka synaptycznego (TRIFARO i VITALE 1993).

Reorganizacja sieci wiązek włókien aktynowych w odpowiedzi na wniknięcie Ca^{2+} do zakończenia presynaptycznego może być także spowodowana aktywacją przez Ca^{2+} takich białek, jak żelzolina i scynderyna (TRIFARO i VITALE 1993). Białka te powodują depolimeryzację F-aktyny i mogą przez to ułatwiać uwalnianie pęcherzyków synaptycznych od sieci włókien aktynowych. Z kolei po uwolnieniu neuroprzekazników inne białka również aktywowane przez Ca^{2+} — profilina i kofilina — odbudowują sieć włókien aktynowych. A więc wapń w zakończeniu presynaptycznym powoduje nie tylko zmiany w fosforylacji i defosforylacji białek, ale jest również odpowiedzialny za zmiany struktury cytoszkieletu.

Neurony wyspecjalizowały się w szybkim uwalnianiu neuroprzekazników (mikrosekundy), podczas gdy uwalnianie pęcherzyków wydzielniczych z komórek sekrecyjnych jest procesem wolniejszym (milisekundy). Ponadto, w odróżnieniu od neuronów pęcherzyki wydzielnicze w komórkach sekrecyjnych są umiejscowione w znacznej odległości od błony komórkowej (250 nm), co sugerowało obecność fizycznej bariery oddzielającej je od tej błony. W niepobudzonych komórkach chromochłonnych (adrenalinotwórczych) barierę tę, nie dopuszczającą do egzocytozy, stanowią kortykálne wiązki aktynowe leżące pod błoną komórkową i połączone z pęcherzykami wydzielniczymi przez fodrynę i α -aktyninę. Po pobudzeniu komórek zwiększenie $[\text{Ca}^{2+}]_c$ powoduje depolimeryzację struktury F-aktyny, zwiększając ruchliwość pęcherzyków uwolnionych od struktur cytoszkieletu i ułatwiając egzocytozę. Także aktywacja przez Ca^{2+} kaldesmonu wydaje się być istotna w tym procesie. W niskich stężeniach Ca^{2+} (poniżej $1\mu\text{M}$) kaldesmon jest związany z filamentami F-aktyny, przy wyższych wiąże się z Ca^{2+} i oddysocjuje od aktyny, powodując tym samym zmianę jej struktury (TRIFARO i VITALE 1993).

W omówionych powyżej przykładach, proces wydzielania pęcherzyków synaptycznych czy wydzielniczych był inicjowany przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Zjawisko to jest powszechne, choć są wyjątki. Wyjątek taki stanowi wydzielanie parathormonu z komórek gruczołów przytarczycznych. Atypowy mechanizm wydzielania tego hormonu zostanie omówiony szerzej w rozdziale traktującym o wapniu jako pierwotnym przekazniku informacji.

UDZIAŁ Ca^{2+} W POŁĄCZENIACH ADHEZYJNYCH MIĘDZY KOMÓRKAMI

W komórkach zwierzęcych jony wapnia są niezbędne dla utrzymania kontaktów międzykomórkowych. Jeśli ze środowiska, w którym znajdują się komórki usunąć Ca^{2+} , to połączenia międzykomórkowe zanikają, a nawet w przypadkach szczególnych może ulec zniszczeniu system wielokomórkowy. Częsteczkami, które znajdują się na powierzchni komórek i biorą udział w zależnej od Ca^{2+} adhezji są kadheryny (TAKEICHI 1990, 1995).

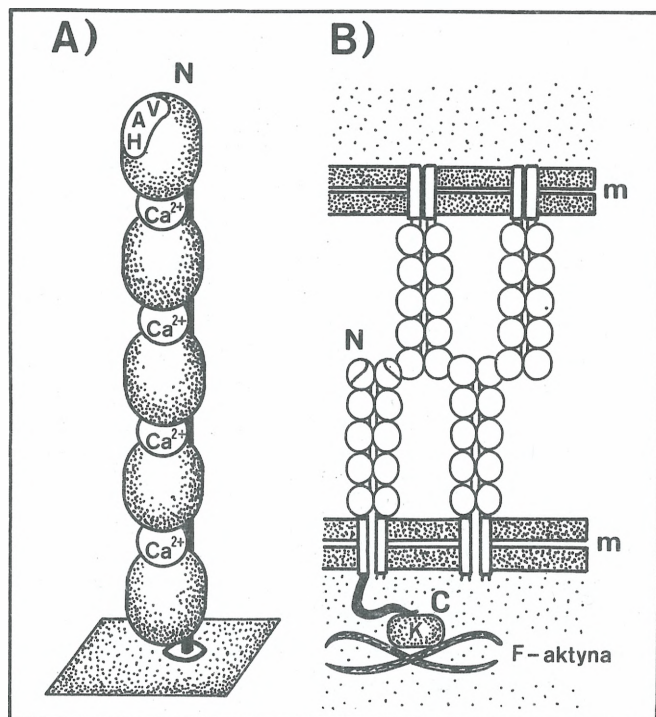
Kadheryny są glikoproteinami występującymi powszechnie w komórkach kręgowców i bezkręgowców. Wykazano, że kadheryny występujące w różnych typach komórek charakteryzują się różną odpowiedzią immunologiczną, choć wszystkie są zależne od Ca^{2+} i wrażliwe na trawienie trypsyną. U ssaków wyróżniono 3 główne (klasyczne) typy kadheryn — E, N i P. Sekwencje aminokwasów uwiarydliły, że składają się one z 723–748 aminokwasów, z małą C-kończową domeną cytoplazmatyczną i dużą N-terminalną domeną zewnętrzną (TAKEICHI 1995).

Zewnątrzkomórkowa domena klasycznych kadheryn kręgowców jest podzielona na 5 powtarzających się poddomen, tak zwanych EC 1–5. Właśnie te poddomeny są wzajemnie między sobą połączone jonami wapnia (rys. 4). A zatem wapń stanowi jednostkę strukturalną tych makrocząsteczek. Zasadniczo uważa się,

że określony typ kadheryny jednej komórki łączy się z takim samym typem występującym w innej komórce, a połączenie to zachodzi poprzez sekwencję aminokwasów, tak zwaną HAV, znajdującą się w pierwszej poddomenie EC 1 (rys. 4). Są jednak wyjątki od tej reguły i na przykład w komórkach kurczęcia kadheryna B łączy się z kadheryną L-CAM drugiej komórki. Przypuszcza się także, że kadheryny tworzą w błonie komórkowej dimery i dopiero dimer jednej komórki reaguje z dimerem drugiej. Jednak bez względu na to czy kadheryny występują w postaci dimeru czy monomeru, połączenie przez nie dwóch komórek wydaje się być połączeniem typu zamka błyskawicznego (TAKEICHI 1995) (rys. 4).

Kadheryny są konieczne dla utrzymania struktur wielokomórkowych, a ich rola jest szczególnie ważna w okresie morfogenezy. Interesująca jest obserwacja, że w klasycznych kadherynach ich wysoce konserwatywna domena cytoplazmatyczna jest związana z cytosolowymi białkami — α , β i γ kateniną, poprzez które kadheryny wiążą się z kortykalnymi wiązkami F-aktyny leżącymi pod błoną komórkową (RANSCHT 1994) (rys. 4).

Obecność katenin jest konieczna dla właściwego funkcjonowania kadheryn. W komórkach pozbawionych α kateniny, kadheryny nie mogą pełnić funkcji adhezyjnych. Kadheryny są syn-



Rys. 4. Model budowy kadheryn (wg TAKEICHI 1995).

A) Zewnątrzkomórkowa (N-terminalna) domena kadheryny. B) Połączenia między dimerami kadheryn dwóch komórek. C-kończową, cytoplazmatyczną domenę kadheryny przedstawiono dla uproszczenia rysunku tylko dla jednego monomeru białka. N — N-terminalna część kadheryny; C — C-kończowa domena kadheryny; HAV — sekwencja aminokwasów, przez którą zachodzi połączenie kadheryn; m — błona komórkowa; k — katenina.

tetyzowane w siateczce śródplazmatycznej. Natychmiast po syntezie kadheryna E (epithelial; nabłonkowa) w połączeniu z β -kateniną (plakoglobina) jest transportowana do błony komórkowej, gdzie tworzy kompleks z α -kateniną. Badania wykazały, że α -katenina wiąże się nie tylko z kadheryną E i białkami cytoszkieletu, lecz również tworzy kompleks z białkiem receptorowym naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) (RANSCHT 1994). Ta ostatnia informacja sugerowała, że dzięki powiązaniu z kateninami kadheryny mogą uczestniczyć w przekazywaniu informacji w komórce. Istotnie, ekspresja kadheryny E jest regulowana przez proto-onkogen *ERBB2*, który koduje kinazę homologiczną do receptora EGF (DSOUZA i TSAYLOR-PAPADIMI-

TRIOU 1994). Nadekspresja tego onkogenu powoduje zahamowanie syntezy kadheryny E i *in vitro* redukuje zdolność adhezyjną komórek naskórka. Wydaje się więc, że pomiędzy aktywnością kadheryn a aktywnością receptorów zawierających kinazy-tyrozynowe istnieje zależność odwrotnie proporcjonalna. Natomiast zwiększenie aktywności białek G stymuluje tą aktywność, sugerując wprost proporcjonalną zależność między aktywnością PKC a aktywnością kadheryn (RANSCHT 1994).

Dane te pozwalają sądzić, że kadheryny nie tylko łączą komórki z komórką, ale dzięki dynamicznej strukturze cytoszkieletu i białkom, z którymi są związane mogą przekazywać i wymieniać informacje z jednej do drugiej komórki.

WAPŃ JAKO PIERWOTNY PRZEKAZNIK INFORMACJI

Znaczenie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia w regulacji funkcji komórki jest już stosunkowo dobrze poznane. Nie mniej ważna, choć znacznie mniej znana jest fundamentalna rola jaką odgrywa zewnątrzkomórkowy wapń w modulacji tych funkcji.

Jak już powiedziano we Wstępie, stężenie zewnątrzkomórkowych jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_o$) jest prawie stałe i wynosi około 1 mmola/l. W organizmach ssaków poziom ten jest regulowany przez układ hormonalny, kontrolujący homeostazę Ca^{2+} . Gdy stężenie Ca^{2+} we krwi spada poniżej prawidłowego poziomu następuje pobudzenie gruczołów przytarczycznych, które wydzielają zwiększoną ilość parathormonu. Hormon ten powoduje wzrost poziomu Ca^{2+} we krwi, przywracając stan homeostazy. Kiedy stężenie wzrasta ponad poziom prawidłowy, przytarczycy przestają wydelać parathormon, a jednocześnie komórki tarczycy zaczynają wydelać kalcytoninę, hormon działający antagonistycznie do parathormonu. Parathormon dociera do tkanek docelowych, odpowiadających za transport Ca^{2+} do i z płynów ustrojowych i stymuluje resorpcję wapnia z kanalików nerkowych oraz rozkład tkanki kostnej i uwalnianie Ca^{2+} z kości. Jednocześnie aktywuje syntezę analogu witaminy D, który zwiększa wchłanianie Ca^{2+} w jelicie (BROWN 1991, FERLANTE i TRIGGLE 1993).

Badania Browna prowadzone zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* na ludzkich przytarczycach wykazały, że podwyższenie $[Ca^{2+}]_o$ nieco powyżej 1 mmola/l powoduje zmniejszenie poziomu parathormonu we krwi. *In vivo*, zwiększenie stężenia Ca^{2+} od 1 do 1,25 mmola/l powodowało prawie całkowity spadek wydzielania hormonu z komórek gruczołu (BROWN 1991). Wydzie-

lanie parathormonu zachodzi w ciągu sekund. Utrzymujące się w dalszym ciągu zmniejszenie stężenia Ca^{2+} we krwi powoduje w ciągu minut resorpcję Ca^{2+} z kanalików nerkowych, a po 1–2 godzinach uwalnianie Ca^{2+} z kości. Jeśli niedobór Ca^{2+} we krwi i płynach ustrojowych trwa jeszcze dłużej, parathormon uruchamia proces syntezy analogu witaminy D (1,25-dihydroksywitaminy D), która zwiększa wchłanianie Ca^{2+} w jelicie. A zatem, nieznaczna zmiana stężenia Ca^{2+} we krwi jest odczuwana przez komórki przytarczyc i wywołuje odpowiedź gruczołu na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Jaki jest mechanizm tej regulacji? Pośrednie wyniki badań sugerowały, że zewnątrzkomórkowy wapń działa na swoiste receptory znajdujące się w błonie komórkowej przytarczyc. Ponieważ jednak $[Ca^{2+}]_o$ jest milimolarne, receptor taki musiałby wychwytywać nawet nieznaczne zmiany w stężeniu tego jonu w morzu innych kationów. Istotnie, komórki przytarczyc reagują już na 2% zmianę $[Ca^{2+}]_o$ (BROWN 1991). Co więcej, okazało się, że i inne komórki, a mianowicie: trzustki, kanalików nerkowych, nabłonkowe skóry i jelita, osteoklasty i komórki łożyska mają podobną zdolność odbierania informacji o zewnętrznym poziomie Ca^{2+} . Badania prowadzone na tych komórkach nie są jednak tak zaawansowane, jak te prowadzone na przytarczycach.

BROWN i współautorzy (1993) wyizolowali i sklonowali receptor czuły na zmiany stężenia zewnątrzkomórkowych jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_o$) z przytarczyc wołu. Receptor ten jest dużym białkiem (120 kDa), z dużą N-terminalną częścią zewnątrzkomórkową, posiadającą segment hydrofobowy o wysokiej homologii z metabotro-

powym receptorem glutaminianu (mGluR) i licznymi miejscami N-glikozylacji. Receptor zawiera ponadto 7 domen przenikających błonę komórkową (rys. 5), a część cytosolowa C-terminalna zawiera 4 miejsca fosforylowane przez PKC. Miejsca wiązania Ca^{2+} nie są znane. Białko w części zewnętrznej zawiera jednak więcej niż jeden segment składający się z kwaśnych aminokwasów i one mogłyby wiązać te jony (rys. 5). Okazało się ponadto, że to samo białko receptorowe wiąże inne kationy dwuwartościowe, jak na przykład Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , a również polikationy, jak na przykład neomycynę. Należy dodać, że sklonowano już także receptor Ca^{2+} z przytarczyc ludzkich, nerek i mózgu szczura (BROWN i współaut. 1995, HEBERT i BROWN 1995).

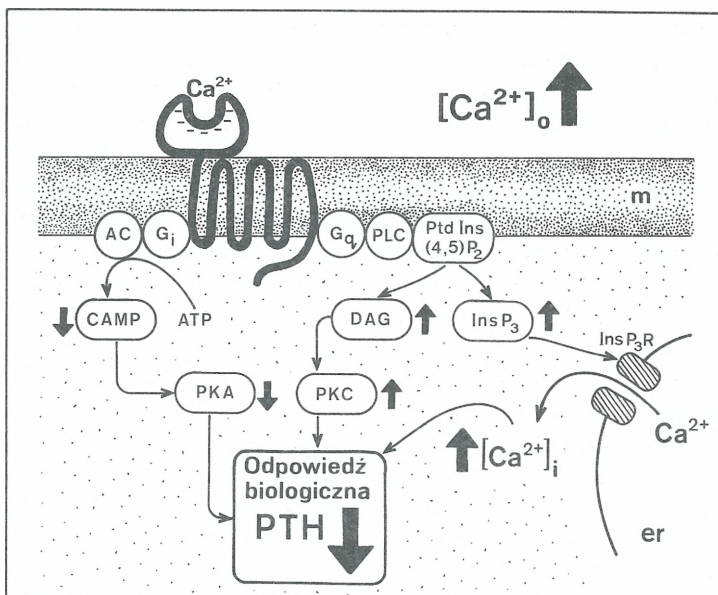
Obecność 7 domen przenikających błonę komórkową pozwala zakwalifikować ten receptor do klasy receptorów sprzężonych z białkami G. Ponadto zwiększenie $[\text{Ca}^{2+}]_o$ powodowało w komórkach przytarczyc ludzkich i wołu zwiększoną aktywność fosfolipazy C, produkcję InsP_3 i wyrzut Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej. Jednocześnie następowało zahamowanie aktywności cAMP. Efekty te mogły zostać zablokowane przez toksyny krztuśca sugerując, że w kaskadzie reakcji bierze udział nie tylko białko G_q , ale i G_i (rys. 5).

HEBERT i BROWN (1995) proponują zatem, że Ca^{2+}_o łącząc się z receptorem powodują kaskadę reakcji, w wyniku której następuje zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) i aktywacja PKC oraz zahamowanie kinazy białkowej A zależnej od cAMP (rys. 5). Jednocześnie następuje zmniejszenie wydzielania hormonu, a więc ograniczenie egzocytozy (rys. 5). Autorzy sugerują, że za zjawisko to

odpowiadają zmiany w aktywności obu kinaz. Jak już wspomniano w rozdziale poświęconym sekrecji, wydzielanie parathormonu jest wyjątkiem od ogólnie występującej zasady, zgodnie z którą zwiększenie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wywołuje egzocytozę i inicjuje sekrecję. Można więc domniemywać, że zmniejszenie $[\text{Ca}^{2+}]_o$ jest także wyczuwane przez receptory komórek przytarczyc i wywołuje kaskadę reakcji chemicznych, w wyniku których tym razem następuje egzocytoza i wyrzut parathormonu, choć molekularny mechanizm tego procesu nie jest jeszcze jasny.

Nie wnikając w spekulacje dotyczące mechanizmu egzocytozy i sekrecji parathormonu, istnienie w błonach komórkowych przytarczyc receptorów odbierających sygnały od zewnątrzkomórkowych jonów wapnia jest udokumentowane. A zatem jony wapnia mogą być uważane za pierwotny przekaźnik informacji. Dochodzą bowiem do powierzchni komórki, łączą się ze specyficznymi receptorami jej błony komórkowej, wywołują kaskadę reakcji i modulują odpowiedź komórki (rys. 5).

Należy dodać, że receptory rozpoznające zewnątrzkomórkowy poziom Ca^{2+} występują nie tylko w komórkach tkanek włączonych bezpośrednio w regulację homeostazy Ca^{2+} , jak przytarczycy i nerka, ale występują także w innych tkankach, nie włączonych bezpośrednio w tę regulację. I tak na przykład znaleziono je w różnych regionach mózgu, jak hipokampie, korze i mózdzku, występują także w komórkach nabłonkowych jelita i skóry (BROWN i współaut. 1995). Przypuszcza się, że w mózgu, receptor ten może pełnić dodatkowe funkcje w procesach uwalniania neuroprzekaźników (receptorów tych nie stwierdzono w komórkach glejowych). Komórki naskórka i nabłonkowe uchyłków jelia



Rys. 5. Przekształcenia wewnątrzkomórkowe zachodzące w komórkach przytarczyc po pobudzeniu receptora błony komórkowej przez zwiększone stężenie zewnątrzkomórkowych jonów wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_o \uparrow$) (wg HEBERTA i BROWNA 1995).

Zachodząca w komórce przytarczyc po pobudzeniu receptora zwiększona aktywność kinazy białkowej C (PKC \uparrow) oraz zwiększone stężenie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia ($[\text{Ca}^{2+}]_o \uparrow$) wraz ze zmniejszeniem aktywności kinazy białkowej A (PKA \downarrow) prowadzi do zatrzymania sekrecji parathormonu (PTH \downarrow). Objasnie pozostałych symboli w wykazie stosowanych skrótów.

są natomiast przykładem oddziaływania $[Ca^{2+}]_o$ na procesy wzrostu, podziału, różnicowania i apoptozy (WHITFIELD i współaut. 1995).

Jak wiadomo naskórek składa się z kilku warstw komórek. Najgłębiej jest położona warstwa podstawowa. Komórki tej warstwy stale się dzielą, nowo powstające wypychają starsze ku górze. Komórki przesuwane się w kierunku powierzchni dojrzewają, a w warstwie powierzchniowej, tak zwanej rogowej, obumierają, są złuszczone i zastępowane nowymi.

Ułożone warstwowo komórki nabłonka znajdują się w różnym gradiencie $[Ca^{2+}]_o$. W warstwie podstawowej $[Ca^{2+}]_o$ jest najniższe i wynosi 0,05–0,30 mmola/l. Jest ono utrzymywane dzięki specjalnemu białku wiążącemu Ca^{2+} (SCaBP — skin Ca^{2+} -binding protein), znajdującemu się w przestrzeni pozakomórkowej (WHITFIELD i współaut. 1995). Im bliżej powierzchni tym stężenie Ca^{2+}_o jest wyższe i w warstwie rogowej wynosi już 1,5–1,8 mmola/l. Według WHITFIELDA i współautorów (1995) niskie stężenie Ca^{2+} w części podstawowej gwarantuje wzrost i podział komórek, w wyższych częściach naskórka jego różnicowanie oraz programowaną śmierć w warstwie rogowej. Receptory obecne na powierzchni błony komórkowej naskórka wychwytyują różnice w $[Ca^{2+}]_o$. Wejście komórek w fazę G_1 następuje poniżej 0,1 mM stężenia Ca^{2+} . Przy stężeniu 0,3 mM komórki rosną, ale już się nie dzielą. Progowe $[Ca^{2+}]_o$ wynosi 0,7 mM. Powyżej tego stężenia, $[Ca^{2+}]_o$ jest już tak wysokie, że receptory błony komórkowej rejestrują ten wzrost i inicjują kaskadę reakcji prowadzącą do aktywacji białek G, powstania $InsP_3$ i DAG oraz wzrostu $[Ca^{2+}]_i$

i aktywacji PKC (rys. 5). Stanowi to sygnał do rozpoczęcia różnicowania. Związanie komórek do warstwy podstawowej poprzez integryny ulega osłabieniu, komórki wiążą się teraz wzajemnie poprzez zależne od Ca^{2+} kadheryny, których aktywność uległa stymulacji. Utrzymujący się wzrost $[Ca^{2+}]_i$ powoduje następnie aktywację transglutaminaz i w warstwie rogowej naskórka wraz ze wzmożoną aktywnością fosfolipaz i proteaz rozpoczyna się proces programowanej śmierci komórek (WHITFIELD i współaut. 1995).

Podobny proces występuje w komórkach nabłonka uchyłków jelita (okreźnicy), gdzie w płynach odchodowych występuje gradient $[Ca^{2+}]_o$. W części uchyłka położonej najgłębiej $[Ca^{2+}]_o$ jest najniższe (0,1 mM) i umożliwia podział komórek nabłonkowych. Powyżej stężenia progowego, wynoszącego 0,8 mM rozpoczyna się proces różnicowania, a w części położonej najwyższej, gdzie stężenie Ca^{2+}_o wynosi 2,2 mmola/l — apoptoza. Procesy te zachodzą dzięki obecności na powierzchni komórek nabłonka receptorów zdolnych do odbierania i rejestracji $[Ca^{2+}]_o$.

WHITFIELD i współautorzy (1995) sugerują, że także w przypadku wszystkich innych komórek organizmu, Ca^{2+}_o regulują procesy wzrostu, podziału i różnicowania. Znacznie wyższe tylko, bo milimolarne, jest stężenie wyjściowe Ca^{2+}_o pozwalające komórce wejść w cykl komórkowy. Zaburzenie homeostazy Ca^{2+} na poziomie ustroju musi się więc niekorzystnie odbijać na zasadniczych życiowych procesach komórki, a zachowanie tej homeostazy na obu poziomach — komórki i ustroju jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

CALCIUM AS A FIRST AND A SECOND MESSENGER. ROLE OF Ca^{2+} IN THE CELL CYCLE, SECRETION AND ADHESION

Summary

The role of Ca^{2+} as a first and a second messenger is described. As a second messenger Ca^{2+} is involved in cell division and differentiation, and hormone and neurotransmitter secretion. One of the sites of action for Ca^{2+} in secretion is the control of the dynamics of actin network and the interaction between secretory vesicles and the cytoskeleton. Ca^{2+} is also essential for maintaining cell to

cell adhesion. By cloning of the G protein-coupled calcium receptors from parathyroid, kidney and brain it was established that extracellular Ca^{2+} can serve as a first messenger. A decrease in serum Ca^{2+} is followed by an elevation of parathyroid hormone which, in turn, produces an increase in Ca^{2+} absorption from the gut, reabsorption from the kidney and enhanced mobilization from bone.

LITERATURA

- BARAŃSKA J., 1992. *Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce*. Monografie, Copright by Polskie Towarzystwo Biochemiczne, wyd.II, 1–36.
- BARAŃSKA J., 1993. *Ca^{2+} jako wtórny przekaznik informacji*. Kosmos 42, 557–564.
- BARAŃSKA J., 1995. *Udział pochodnych inozytoli w przekazywaniu informacji*. [W:] *Molekulane mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, L. KONARSKA (red.), PWN, Warszawa, str. 154–177.
- BENEFENATI F., VALTORTA F., RUBENSTEIN J. L., GORELICK F. S., GREENGARD P., CZERNIK A.J., 1992. *Synaptic vesicle-associated Ca^{2+} /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.
- BRAUN A. P., SCHULMAN H., 1995. *The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: From form to function*. Annu. Rev. Physiol. 57, 417–445.

- BROWN E. M., 1991. *Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers*. *Physiol. Rev.* 71, 371-411.
- BROWN E.M., GAMBA G., RICCARDI D., LOMBARDI M., BUTTERS R., KIFOR O., SUN A., HEDLGER M.A., LYTTON J., HEBERT S.C., 1993. *Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid*. *Nature* 366, 575-580.
- BROWN E. M., VASSILEV P. M. HEBERT S. C., 1995. *Calcium ions as extracellular messengers*. *Cell* 83, 679-682.
- CLAPA B., PASENDO D., WILDING M., WHITAKER M., 1994. *Cell-cycle calcium transients driven by cyclic changes in inositol trisphosphate levels*. *Nature* 368, 875-878.
- D'SOUZA B., TSAYLOR-PAPADIMITRIOU J., 1994. *Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells. Signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 7202-7206.
- FAMULSKI K. S., 1989. *Transport jonów wapnia przez błonę komórkową*. *Post. Biochem.* 35, 493-511.
- FERRANTE, J., TRIGGLE, D. J., 1993. *Calcium ions and calcium channel blockers*. [W:] *Cellular Membrane. A key to disease processes*, OHNISHI, S. T., OHNISHI, T., (red.), CRC Press, London, Tokyo.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1993. *Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego*. *Post. Biochem.* 39, 16-25.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1996. *Cykliny fazy G₁ cyklu komórkowego, ich funkcje i udział w nowotworzeniu*. *Post. Biochem.* 42, 108-113.
- HEBERT S. C., BROWN E. M., 1995. *The extracellular calcium receptor*. *Current Opinion in Cell Biol.* 7, 484-492.
- HENZI V., MACDERMOTT A. B., 1992. *Characteristics and function of Ca²⁺ and inositol 1,4,5-triphosphate-releasable stores of Ca²⁺ in neurons*. *Neuroscience* 46, 251-273.
- KAMIŃSKA-KACZMAREK B., 1995. *Receptory czynników wzrostu — struktura i funkcje*. [W:] *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, L. KONARSKA (red.), PWN, Warszawa, str. 62-77.
- KUŹNICKI J., 1989. *Transport i funkcja jonów wapnia u Eukariota*. [W:] *Fizjologia i farmakologia błony komórkowej*, B.PRZEWŁOCKA (red.), Ossolineum, str. 103-122.
- MAKOWSKA A., DUSZYŃSKI J., 1996. *Oscylacje i fale wapniowe w komórce*. *Post. Biochem.* 42, 146-153.
- MIYAZAKI, S., 1995. *Inositol trisphosphate receptor mediated spatiotemporal calcium signalling*. *Current Opinion in Cell Biol.* 7, 190-196.
- NISHIZUKA Y., 1992. *Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C*. *Science* 258, 607-614
- PUTNEY J R., J.W., BIRD G. S T.J., 1993. *The inositol phosphate-calcium signaling in nonexcitable cells*. *Endocr. Rev.* 14, 610-631.
- RADZISZEWSKA E., 1995. *Fizjologiczna rola apoptozy*. *Post. Biol. Kom.* 22, 247-263.
- RANSCHT B., 1994. *Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development*. *Current Opinion in Cell Biol.* 6, 740-746.
- SHORT A. D., BIAN J., GHOSH T. K., WALDRON R. T., RYBAK S. L., GILL D. L., 1993. *Intracellular Ca²⁺ pool content is linked to control of cell growth*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 4986-4990.
- TAKEICHI M., 1990. *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion*. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 237-252.
- TAKEICHI M., 1995. *Morphogenetic roles of classic cadherins*. *Current Opinion in Cell Biol.* 7, 619-627.
- TRIFARO J. M., VITALE M. L., 1993. *Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release*. *Trends Neurosci.* 16, 466-472.
- VETULANI J., 1995. *Wapń jako wtórny przekaźnik informacji*. [W:] *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, L. KONARSKA (red.), PWN, Warszawa, str. 154-177.
- WHITAKER M., PATEL R., 1990. *Calcium and cell control*. *Development* 108, 525-542.
- WHITFIELD J. F., BIRD R. P., CHAKRAVARTHY B. R., ISAACS R. J., MORLEY P., 1995. *Calcium — cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter*. *J. Cell. Biochem., Supplement* 22, 74-91.
- WIKTOREK M., ROJEK A., CZARNY M., BARAŃSKA J., 1995. *Rola cyklu inozytowego w przekazywaniu informacji w jądrze*. *Post. Biochem.* 41, 67-72.