

KRZYSZTOF PRZYBYŁEK, RAFAŁ CZAJKOWSKI,
PAWEŁ SABAŁA, JOLANTA BARAŃSKA
*Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: baranska@nencki.gov.pl*

POJEMNOŚCIOWA TEORIA WNIKANIA JONÓW WAPNIA DO KOMÓREK NIEPOBUDLIWYCH. FAKTY I HIPOTEZY

WSTĘP

Jony wapnia występujące powszechnie w świecie żywym, równie powszechnie są wykorzystywane przez organizmy w procesach przekazywania informacji. Zmiana stężenia jonów wapnia w cytoplazmie może być dla komórek sygnałem do rozpoczęcia wielu procesów, takich jak reorganizacja cytoszkieletu, zmiana ekspresji genów, sekrecja lub mitoz (BARAŃSKA 1997).

Komórka w stanie spoczynku utrzymuje stały gradient stężeń jonów wapnia w poprzek swoich błon. Poziom Ca^{2+} w cytosolu jest bardzo niski, rzędu 10^{-7} mol/l, natomiast w otoczeniu komórki poziom jonów wapniowych jest kilkanaście tysięcy razy wyższy i wynosi około 10^{-3} mol/l. Większość komórkowego wapnia jest zgromadzona w organellach — jądrze, mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym (ER), które pełnią rolę magazynów tego jonu. Jądro i mitochondria charakteryzują się dużą pojemnością, ale niskim powinowactwem do wapnia. Dla powstawania sygnału wapniowego najistotniejsze są jednak magazyny związane z ER. Wapń osiąga tam stężenie nawet do 10^{-2} mol/l i może być bardzo szybko uwalniany do cytoplazmy (VETULANI 1995).

W wyniku zadziałania bodźca zewnątrzkomórkowego gradient ulega zachwianiu i poziom jonów wapnia w cytoplazmie podnosi się. W zależności od przebiegu tego procesu, komórki zwierzęce podzielono na dwa typy: komórki pobudliwe i komórki niepobudliwe.

KOMÓRKI POBUDLIWE

Komórki pobudliwe posiadają w błonie cytoplazmatycznej receptory będące kanałami wapniowymi. Istnieją dwa rodzaje takich re-

ceptorów: regulowane przez potencjał błonowy i tak zwane receptory jonotropowe, regulowane przez związanie liganda (np. receptor NMDA). Zmiana potencjału błonowego lub związanie liganda powoduje otwarcie kanałów i napływ zewnątrzkomórkowego wapnia do cytoplazmy. Ponadto komórki te posiadają receptory metabotropowe.

KOMÓRKI NIEPOBUDLIWE

Receptory błonowe w komórkach niepobudliwych, tak zwane receptory metabotropowe, nie mają charakteru kanałów jonowych. Wzrost poziomu Ca^{2+} w tych komórkach może następować nawet w nieobecności wapnia zewnątrzkomórkowego poprzez mobilizację puli Ca^{2+} zgromadzonej w magazynach ER. Może to następować na kilka sposobów, zawsze jednak towarzyszy temu zjawisku aktywacja jednej z izoform fosfolipazy C (PLC). Enzym ten występuje w trzech podtypach: β , γ , δ i katalizuje rozpad bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2) do inozitolotrisfosforanu (IP_3) i diacyloglicerolu (DAG).

Aktywacja PLC β przebiega z udziałem receptorów związanych z białkami G. Receptory te są osadzone w błonie komórkowej przez siedem helis transmembranowych. Przyłączenie hormonu czy neurotransmitera powoduje zmianę konformacyjną receptora i wymianę GDP na GTP w zwiazanym z nim białku G. Następuje oddysocjowanie podjednostki α od kompleksu $\beta\gamma$ białka G. Zarówno jeden jak i drugi produkt rozpadu białka G, zależnie od typu receptora i zwiazanego z nim białka G, może aktywować PLC (BARAŃSKA 1995).

PLC typu γ jest aktywowana przez receptory mające aktywność kinazy tyrozynowej.

Związanie agonisty (czynniki wzrostu, cytokiny) powoduje dimeryzację i autofosforylację receptora w obrębie domeny cytoplazmatycznej. Ufosforylowana tyrozyna jest miejscem, które wiąże się z domeną SH2 fosfolipazy. Związana PLC γ ulega fosforylacji przez receptor, co prowadzi do jej aktywacji.

Wtórne przekaźniki powstałe w reakcji katalizowanej przez PLC uczestniczą w przekazywaniu sygnału w komórce. DAG jest aktywatorem kinazy białkowej C, jednego z kluczowych enzymów w komórce. IP_3 szybko dyfunduje do wnętrza komórki i tam łączy się ze specyficznym receptorem w błonie ER. Receptor ten jest tetramerycznym białkiem o masie monomeru 313 kDa. Ma on właściwości kanału jonowego. Po związaniu IP_3 ulega zmianom konformacyjnym, co prowadzi do jego otwarcia i wyrzutu jonów wapnia do cytoplazmy. Jest to pierwsza faza odpowiedzi wapniowej komórki. Druga jej faza polega na napływie jonów wapnia ze środowiska zewnętrznego. Napływ ten jest związany z otwarciem specyficznych kanałów jonowych w błonie komórkowej. Dla celów porządkowych nazwane zostały kanałami CRAC (ang. calcium-release-activated calcium current). Ten typ kanałów jest nazywany również SOC (ang. store activated channel).

POJEMNOŚCIOWY MECHANIZM WNIKANIA JONÓW WAPNIA DO KOMÓRKI

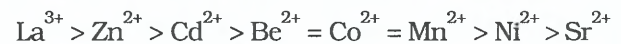
W 1986 roku JAMES PUTNEY zaproponował model, według którego wnikanie wapnia do komórki niepobudliwej jest regulowane przez stężenie tego jonu w magazynach ER. Opróżnienie magazynów powoduje otwarcie kanałów jonowych i wniknięcie Ca^{2+} do cytoplazmy, natomiast wypełnienie blokuje wejście tych jonów. Jest to proces analogiczny z przepływem elektronów w kondensatorze w obwodzie elektrycznym. Liczne doświadczenia, w których różnymi drogami wpłymano na opróżnienie magazynów ER udowodniły, że proces wnikania jonów wapnia ze środowiska zewnątrzkomórkowego jest zależny jedynie od aktu opróżnienia magazynów, bez względu na sposób, w jaki on przebiega. Do opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów używano tapsigarginy (alkaloid roślinny) — hamujący pompę wapniową w błonie ER, jonomycyny — jonoforu wapniowego i IP_3 . Inkubowano również komórki w środowisku pozbawionym Ca^{2+} . W każdym przypadku opróżnienie wewnątrzkomórkowych magazynów z jonów wapnia powodowało wnikanie Ca^{2+} do wnętrza komórki (rys. 1).

Należy podkreślić, że spotykany w literaturze termin „komórki niepobudliwe” (ang. nonexcitable cells) informuje jedynie o braku kanałów wapniowych w tych komórkach zależnych od potencjału. Komórki te, jak na przykład większość komórek glejowych, posiadają natomiast zależne od potencjału kanały dla jonów sodu i potasu (BRISMAR 1995).

CHARAKTERYSTYKA KANAŁÓW TYPU CRAC

Termin „kanały typu CRAC” został utworzony w celu odróżnienia ich od innych kanałów i w odniesieniu do strumienia jonów wapnia, przepływających przez te kanały do wnętrza komórki.

Natura mechanizmu przenikania wapnia przez te kanały nie jest jeszcze poznana i tylko dla wygody są one nazywane kanałami CRAC. Wiadomo jednak, że mogą być blokowane przez II i III wartościowe jony metali z następującą skutecznością (BERRIDGE 1995):

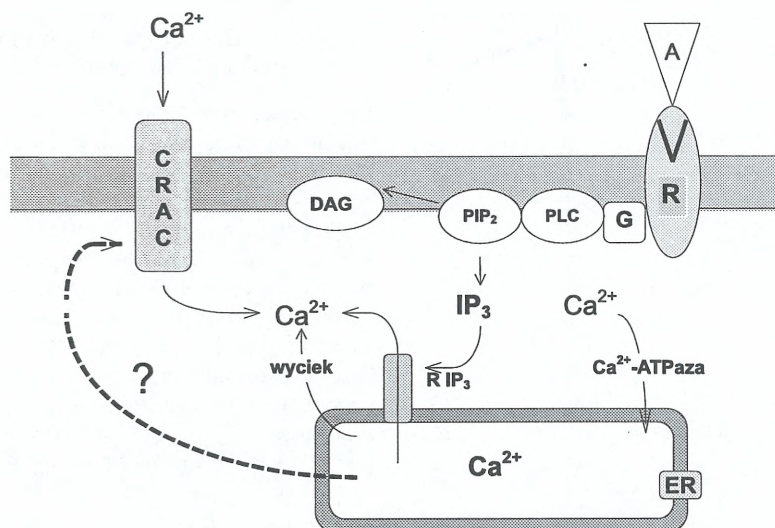


Napływ jonów przez kanały CRAC szacuje się na około $11 \times 10^4 \text{ Ca}^{2+}/\text{s}$, natomiast receptor IP_3 przewodzi $1,5 \times 10^6 \text{ Ca}^{2+}/\text{s}$. Kanały CRAC charakteryzują się zatem znacznie niższym tempem przenikania przez nie Ca^{2+} .

Model, według którego poziom wapnia w cytoplazmie jest kontrolowany przez wypełnienie wewnątrzkomórkowych magazynów został nazwany pojemnościowym modelem wnikania wapnia (ang. capacitative calcium entry model) (PUTNEY 1986).

Wydaje się, że pojemnościowe wnikanie wapnia odgrywa centralną rolę w wielu aspektach przekazywania sygnałów. Jego funkcjonowanie wyjaśnia mechanizm oscylacji wapniowych, które są utrzymywane przez niewielkie, lecz ciągłe wnikanie wapnia z zewnątrz. „Pojemnościowy” wapń bierze udział w aktywacji cykazy adenylanowej, fototransdukcji u *Drosophila*, aktywacji mitogenezy w limfocytach i fibroblastach (BERRIDGE 1995) oraz regulacji syntezy fosfatydyloseryny w komórkach glejaka C6 (WIKTOREK i współaut. 1996).

Najbardziej intrygującym pytaniem, jakie zadali sobie autorzy modelu pojemnościowego (PUTNEY 1986, PUTNEY i BIRD 1993), było pytanie o charakter oddziaływań pomiędzy ER a receptorami zlokalizowanymi w błonie komórkowej. Do dziś nie znaleziono na nie jedno-



Rys. 1. Pojemnościowy model wnikania Ca^{2+} do komórki niepobudliwej.

Agonista (A) jak np. hormon, neuroprzebieżnik dochodzi do błony komórkowej i łącząc się ze znajdującym się w niej receptorem (R) powoduje jego zmianę konformacyjną. W wyniku kaskady reakcji następuje aktywacja białka G (G) oraz fosfolipazy C typu β (PLC). Fosfolipaza powoduje hydrolizę fosfolipidu inozytowego PIP_2 . W wyniku tego powstają dwa wtórne przekazyńki informacji: diacyloglicerol (DAG) i trisfosfoinozytol (IP_3). IP_3 dyfunduje do wnętrza komórki i łączy się z receptorem IP_3 (RIP_3), znajdującym się w błonie endoplazmatycznego retikulum (ER). Receptor ten jest kanałem. Następuje otwarcie kanału i wyrzut Ca^{2+} zgromadzonego w ER do cytosolu. Opróżnienie magazynu ER jest informacją dla kanału CRAC znajdującego się w błonie komórkowej i powoduje napływ Ca^{2+} do wnętrza komórki z przestrzeni pozakomórkowych. Linia przerywaną zaznaczono nieznaną mechanizm przekazywania informacji z ER do błony komórkowej, powodujący otwarcie kanału CRAC.

znacznej odpowiedzi, a w środowisku badaczy zajmujących się tą tematyką funkcjonuje szeregu mniej lub bardziej prawdopodobnych hipotez próbujących opisać sposób, w jaki sygnał informujący o opróżnieniu magazynów dociera do błony komórkowej i powoduje otwarcie w niej kanałów typu CRAC (rys. 1).

OTWIERANIE KANAŁÓW CRAC POPRZEC ZMIANĘ STĘŻENIA Ca^{2+} W CYTOSOLU

Pierwszą, najbardziej oczywistą hipotezą była propozycja, że sam wapń, który wnikał z magazynów ER do cytoplazmy, powoduje otwarcie kanałów CRAC w błonie komórkowej. Przeprowadzono jednak doświadczenia, w których wykazano, że zmiana poziomu jonów wapnia w cytosolu nie ma wpływu na stan kanałów CRAC (PUTNEY i BIRD 1993). W doświadczeniach tych komórki umieszczone w środowisku pozbawionym jonów wapnia traktowano tapsigarginą, która w nieodwracalny sposób hamując aktywność Ca^{2+} -ATPazy z błony ER powoduje wyciek jonów wapnia z magazynów ER, nie rekompensowany ponownym ich uzupełnieniem. Kiedy doświadczenie jest prowadzone w środowisku bezwapniowym, po przejściowym wzroście Ca^{2+} w cytosolu, następuje powrót do stanu wyjściowego, charakteryzującego się niskim poziomem Ca^{2+} , gdyż pompa

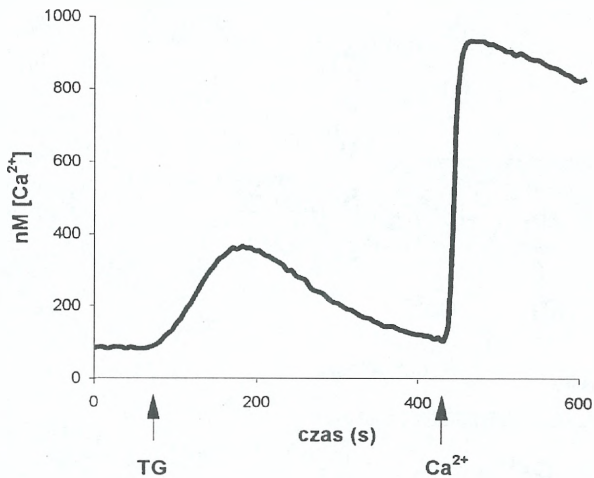
wapniowa błony komórkowej wyrzuca uwolnione z ER jony wapnia na zewnątrz komórki. Gdy następnie przywrócono środowisko wapniowe następował gwałtowny wzrost poziomu Ca^{2+} w cytosolu, świadczący o tym, że kanały wapniowe były otwarte i Ca^{2+} wnikał teraz do komórek pomimo niskiego poziomu wapnia w cytosolu. Rysunek 2 przedstawia przebieg takiego doświadczenia wykonanego na komórkach jelitaka C6.

CYTOSOLOWE PRZENOŚNIKI INFORMACJI

Innym modelem tłumaczącym, w jaki sposób informacja z magazynów wewnątrzkomórkowych ER dociera do kanałów CRAC, zlokalizowanych w błonie komórkowej, jest model zakładający istnienie cząstek przenikliwych (przenośników informacji). Model ten mówi, że gdy ER zostaje opróżnione z Ca^{2+} , to w tym samym czasie uwalnia się z ER czynnik, który później dyfunduje w cytosolu do błony komórkowej i daje sygnał do otwarcia kanałów typu CRAC.

Czynnik napływu jonów wapnia (CIF)

Czynnik ten został nazwany w literaturze angielskiej jako CIF (ang. calcium influx factor), co można tłumaczyć jako czynnik napływu jonów wapnia. Najprawdopodobniej jest on nieustannie produkowany w wewnątrzkomórkowych magazynach wapniowych i uwal-



Rys. 2. Wnikanie jonów wapnia do komórek glejaka C6 zgodnie z modelem pojemnościowym.

Do cytoplazmy komórek glejaka C6 wprowadzono barwnik fluorescencyjny Fura-2 (wskaźnik stężenia jonów wapnia). Tak przygotowane komórki umieszczono w środowisku bezwapniowym (EGTA 500 μ M) i poddano działaniu tapsigarginy (TG 100 nM). Po opróżnieniu wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych i powrocie stężenia Ca^{2+} w cytosolu do poziomu spoczynkowego, zewnątrzkomórkowy bufor bezwapniowy zastąpiono buforem zawierającym jony wapnia (Ca^{2+} 2 mM). Doświadczenie przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego sprzężonego z systemem do cyfrowej rejestracji i analizy obrazów MagiCal (Pracownia Mikroskopii Elektronicznej, IBD PAN im. M. Nenckiego).

niany do cytosolu w chwili pobudzenia komórki. Czynniki napływu jonów wapnia zostały wyizolowane z limfocytów linii Jurkat i jest on prawdopodobnie małym, ufosforylowanym anionem o ciężarze cząsteczkowym poniżej 0,5 kDa, zawierającym grupę hydroksylową lub też hydroksylową i aminową. Stwierdzono, że może on penetrować przez błony plazmatyczne, i że nie jest peptydem, gdyż podwyższona temperatura i działanie proteaz nie wpływa negatywnie na jego aktywność (RANDRIAMAMPITA i TSIEN 1995).

Jednym z pierwszych dowodów na istnienie CIF było mierzenie odpowiedzi wapniowych po dodaniu do nienaruszonych komórek linii Jurkat ekstraktu tych komórek (RANDRIAMAMPITA i TSIEN 1993). Ekstrakt zawierający przypuszczalny CIF powodował wnikanie wapnia z zewnątrz do wnętrza komórki. Jednak taka reakcja mogła być także spowodowana działaniem różnych innych związków znajdujących się w ekstrakcie na receptory błony komórkowej, powodując wygenerowanie IP_3 , który poprzez połączenie się ze specyficznym receptorem w błonie ER, prowadzi do opróżnienia wewnętrznych magazynów wapniowych. Następstwem tego jest otwarcie kanałów CRAC i wniknięcie Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytosolu. Ekstrakt z komórek 1321N1 astrocytoma dodany do komórek tej samej linii, powodował również wnikanie Ca^{2+} do ich wnętrza. Proces ten nie był jednak hamowany przez heparynę, będącą specyficznym inhibitorem receptorów IP_3 (GILON i współaut. 1995). Dane te sugerują istnienie w ekstraktach komórek różnych czynników, które mogą oddziaływać bądź na receptory błony komórkowej, bądź bezpośrednio na kanały CRAC i poddają przez to w wątpliwość znaczenie CIF w procesie napływu Ca^{2+} do komórek (GILON i współaut. 1995). Widać więc, że model, zakładający istnienie cza-

stek przenikliwych (CIF) jako przenośników informacji z ER do kanałów CRAC, nie jest do końca wyjaśniony i wymaga jeszcze wielu badań w celu uporządkowania i dalszego poznania (BERRIDGE 1995).

Cytochrom P450 i jego metabolity

Inny model zakłada udział mikrosomalnego cytochromu P450 w procesie pojemnościowego napływu jonów wapnia (ALVAREZ i współaut. 1991). Wykazano bowiem, że w tymocytach szczura związki powodujące inhibicję cytochromu P450 nie powodowały otwarcia kanałów CRAC, które powinno nastąpić po wcześniejszym opróżnieniu magazynów wapniowych wewnątrz komórki. Do inhibicji cytochromu P450 używano związków takich jak CO, przeciwutleniacze, imidazolowe związki przeciwgrzybicze i inhibitory lipooksygenaz. Tak więc aktywność kanału CRAC i tym samym wejście jonów wapnia do komórki mogłoby zależeć od aktywności cytochromu P450 (NIEWCZAS 1995). W procesie działania cytochromu P450 proponowano udział bądź kalmoduliny, białka wiążącego jony wapnia, bądź kwasu 5,6-epoksyeikozatrienowego. Kwas ten powstaje przy udziale cytochromu P450 z kwasu arachidonowego, uwalnianego z fosfolipidów w wyniku aktywacji fosfolipazy A_2 . Hipoteza ta zakłada, że powstały kwas 5,6-epoksyeikozatrienowy dyfunduje w cytosolu i powoduje od strony wewnętrznej błony komórkowej aktywację kanałów CRAC i w konsekwencji napływ jonów wapnia do cytosolu komórki (NIEWCZAS 1995). Hipotezy głoszące udział cytochromu P450 w modelu pojemnościowego napływu jonów wapnia opierają się głównie na korelacji pomiędzy działaniem związków hamujących aktywność cytochromu, a hamowaniem napływu jonów wapnia do komórki. Jednak związki te hamują również niespecyficznie

inne kanały jonowe, jak na przykład zależne od potencjału kanały Ca^{2+} , czy aktywowane przez Ca^{2+} kanały dla jonów potasu (ALVAREZ i współaut. 1992, PUTNEY i BIRD 1993, NIEWCZAS 1995). Dlatego też udział cytochromu P450 i jego metabolitów w procesie pojemnościowego napływu jonów wapnia do komórek wydaje się w świetle tych danych niepewny.

Małe białka G

Istnieją również hipotezy, że małe białka G mogą wpływać na aktywację kanałów typu CRAC (FASOLATO i współaut. 1994). Doświadczenia, w których do komórek podawano analogi GTP, aktywujące wszystkie cytoplazmatyczne białka G, wykazywały zwiększenie pojemnościowego napływu wapnia (FASOLATO i współaut. 1993). Mimo iż niektóre białka G mogą aktywować fosfolipazę C i w ten sposób, na drodze zależnej od IP_3 , pośrednio zwiększać napływ Ca^{2+} , mówi się o bardziej bezpośrednim ich wpływie na ten proces. Jedną z hipotez zakłada, że to małe białka G pełnią rolę cząstek przenikliwych i przenoszą do kanałów CRAC informację o poziomie jonów wapnia w ER (BERRIDGE 1995). Inny model postuluje, że małe białka G uczestniczą jedynie w tworzeniu jakiejś nieznannej cząstki dyfundującej do kanałów CRAC. Jeszcze inny mówi, że są one zlokalizowane w pobliżu kanałów CRAC i stanowią część mechanizmu odpowiedzi na rozpuszczalny przekaznik. Zaproponowano także udział małych białek G w tworzeniu pęcherzyków zawierających kanały CRAC, ich transporcie z błon ER i fuzji z błoną komórkową. Miałoby to prowadzić do zwiększenia ilości tych kanałów w błonie, a co za tym idzie wzmocnienia pojemnościowego napływu jonów wapnia (FASOLATO i współaut. 1994, BERRIDGE 1995).

MODELE BAZUJĄCE NA INTERAKCJI BIAŁKO-BIAŁKO

Następnym modelem, który został zaproponowany w celu wyjaśnienia pojemnościowego mechanizmu wnikania jonów wapnia do komórki jest model sugerujący bezpośrednie zaangażowanie białek wchodzących w skład budowy receptorów w procesie przenoszenia informacji z ER do błon komórkowych (PUTNEY 1986).

Udział receptorów IP_3 i IP_4

Zasugerowano, że podczas zapełnienia magazynów wapniowych, znajdujący się w nich Ca^{2+} , poprzez oddziaływanie na receptor IP_3 , zmienia jego konformację i tym samym

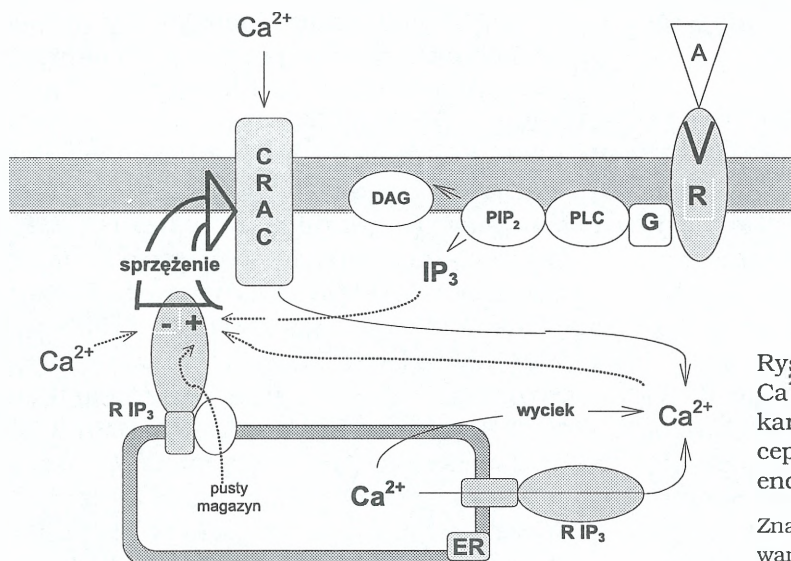
zwiększa jego powinowactwo do receptora IP_4 , który znajduje się w błonie komórkowej i jest w jakiś sposób powiązany z kanałem wapniowym oraz charakteryzuje się zdolnością wiązania tetrakisfosfoinozytolu (IP_4) obecnego w cytosolu. Następuje wówczas sprzężenie tych receptorów, w wyniku czego kanały CRAC w błonie komórkowej przyjmują pozycję zamkniętą. W przypadku opróżnienia ER z jonów wapnia następuje rozprężenie receptorów. Receptor IP_3 nie jest w stanie połączyć się z receptorem IP_4 , w wyniku czego kanał wapniowy przyjmuje konformację otwartą i w tym czasie Ca^{2+} może swobodnie wniknąć do wnętrza komórki (IRVINE 1990). W 1993 roku teoria ta została zmodyfikowana (HUGHES i MICHELL 1993). W wyniku stymulacji komórki przez agonistę powstaje IP_3 , który łączy się z receptorem IP_3 w błonie ER, co powoduje otwarcie kanału w tej błonie i wniknięcie jonów wapnia do cytosolu. IP_3 i powstający z niego na drodze fosforylacji IP_4 łączą się także z receptorem w błonie komórkowej powodując otwarcie kanału w tej błonie i napływ Ca^{2+} do wnętrza komórki (BARAŃSKA 1995). Oprócz tego połączenie się IP_3 z receptorem w ER powoduje nie tylko uwolnienie Ca^{2+} do cytosolu, ale także zmianę konformacyjną receptora IP_3 , która umożliwia jego interakcję z receptorem IP_4 . Takie połączenie prowadzi do zmian konformacyjnych receptora IP_4 . Wówczas to następuje otwarcie kanału tego receptora i wnikanie jonów wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej (BARAŃSKA 1995).

Połączenie strukturalne i rola cytoszkieletu

Specyficzną propozycją próbującą wyjaśnić mechanizm przenoszenia informacji o stanie zapełnienia magazynów wapniowych przy pojemnościowym wejściu jonów wapnia do komórki jest wykorzystanie strukturalnego połączenia pomiędzy receptorem IP_3 , a kanałami CRAC w błonie komórkowej (IRVINE 1990, BERRIDGE 1995). W roku 1995 Berridge zaproponował model, w którym to sygnał z opróżnionego ER przechodzi przez dużą, znajdującą się po stronie cytosolowej błony „głowę” receptora IP_3 , a ta następnie przekazuje dalej informację do kanału CRAC, bezpośrednio poprzez interakcję białko-białko. Takie zdarzenie jest możliwe tylko w przypadku bliskiego położenia receptora IP_3 i kanału CRAC (rys. 3). Model ten zyskał pewne potwierdzenie przez wykazanie istnienia trzech izoform receptora IP_3 . Wydaje się, że jedno z nich pośredniczą tylko w przekazywaniu informacji w sprzężeniu z kanałem CRAC i nie pełnią roli kanałów wapnio-

wych, natomiast inne biorą udział w opróżnianiu ER z jonów wapnia i pełnią rolę tylko kanałów wapniowych (rys. 3). Badania na limfocytach linii Jurkat i oocytach żaby szponiastej *Xenopus* sugerują uczestnictwo w struktural-

szkieletu. Można przypuszczać, że w czasie gdy magazyn wapniowy jest opróżniony z jonów wapnia, zmienia się konformacja „głowy” cytoplazmatycznej receptora IP_3 w błonie ER, co powodowałoby zmianę konformacji białek cy-



Rys. 3. Model pojemnościowego wnikania Ca^{2+} do komórki postulujący sprzężenie kanału CRAC w błonie komórkowej z receptorem IP_3 , znajdującym się w błonie endoplazmatycznego retikulum (ER).

Znak „+” oznacza stymulację, a znak „-” hamowanie interakcji białko-białko.

nym połączeniu z kanałami CRAC izoformy receptora IP_3 typu-III, zaś pozostałe izoformy, typu-I i II, najprawdopodobniej odpowiadają jedynie za wyrzut jonów wapnia z ER. Bardzo interesującym było wykazanie, że w komórce niepobudliwej wszystkie te izoformy mogą występować jednocześnie, co może sugerować ich różną rolę w regulacji homeostazy Ca^{2+} w komórce (BERRIDGE 1995).

W przypadku dużego oddalenia izoformy typu-III receptora IP_3 od kanału CRAC najbardziej prawdopodobny w przekazywaniu informacji z ER do kanałów CRAC jest udział cyto-

toszkieletu. Pod taką postacią sygnał docierałby do kanału CRAC, powodując jego otwarcie. Za tego typu hipotezą przemawiały obserwacje zmiany przekazywania sygnału z opróżnionych magazynów do błony komórkowej po dodaniu związku wpływającego na cytoszkielet. W doświadczeniach tych używano cytochalazyny i obserwowano brak pojemnościowego napływu wapnia do komórki (PUTNEY 1986). Uzyskane rezultaty wskazywałyby zatem, że przerwanie połączenia pomiędzy receptorem IP_3 i elementami cytoszkieletu może mieć istotny wpływ na wnikanie Ca^{2+} do wnętrza komórki.

UWAGI KOŃCOWE

Hipotetyczny model PUTNEYA (1986), zakładający istnienie tak zwanego „pojemnościowego” napływu jonów wapnia do komórek niepobudliwych, wydaje się być obecnie ogólnie zaakceptowany. Wiadomo również, że napływ zewnątrzkomórkowych jonów wapnia do komórki jest spowodowany uprzednim opróżnieniem magazynów wapniowych ER z tych właśnie jonów. W jaki jednak sposób informacja o opróżnieniu magazynów ER dociera do błony komórkowej i powoduje otwarcie w niej kanałów wapniowych dotychczas nie wiadomo. Przedstawione hipotezy, tłumaczące to zjawisko, są przez jednych badaczy uważane za słuszne, a przez drugich całkowicie odrzucane. Można jedynie pokusić się o przypuszczenie, że być może w

różnych komórkach pojemnościowe wnikanie jonów wapnia jest regulowane w różny sposób. Z drugiej strony wydaje się, że najbardziej prawdopodobna hipoteza, zakładająca sprzężenie receptora IP_3 z kanałem CRAC, nie wyklucza jednoczesnego wpływu na ten kanał dyfundujących w cytosolu przekaźników informacji, takich jak na przykład małe białka G czy metabolity cytochromu P450, a również jednoczesnego oddziaływania na kanał CRAC białek cytoszkieletu. Wyjaśnienie mechanizmu wnikania Ca^{2+} do komórek niepobudliwych wymaga zatem dalszych intensywnych studiów, a intencją autorów było jedynie przybliżenie Czytelnikom tego pasjonującego i nie rozwiązanego dotychczas zagadnienia.

CAPACITIVE CALCIUM ENTRY INTO NONEXCITABLE CELLS. FACTS AND HYPOTHESES

Summary

In nonexcitable cells calcium entry occurs through a capacitive mechanism, regulated by the state of filling of the endoplasmic reticulum calcium stores. It can be switched on by a great variety of stimuli, such as agonist or pharmacological agents, all of which share a common property of releasing stored calcium by the IP_3 system. The mechanism by which the Ca^{2+} content of the intracellular Ca^{2+} pools determines the rate of Ca^{2+} entry is still unknown. Similarly, the Ca^{2+} channel in plasma membrane of

nonexcitable cells has not been yet identified. The hypotheses explaining how information from the depleted endoplasmic reticulum can be transmitted to the plasma membrane Ca^{2+} channels are described. The presented models are divided into these that propose the existence of diffusible factors and those that propose that the information is transferred more directly through protein-protein interaction (e.g. endoplasmic reticulum receptor — Ca^{2+} channel in the plasma membrane).

LITERATURA

- ALVAREZ J., MONTERO M., GARCIA-SANCHO J., 1991. Cytochrome P-450 may link intracellular Ca^{2+} stores with plasma membrane Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* 274, 193–197.
- ALVAREZ J., MONTERO M., GARCIA-SANCHO J., 1992. High affinity inhibition of Ca^{2+} -dependent K^+ channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J. Biol. Chem.* 267, 11789–11793.
- BARAŃSKA J., 1995. Udział pochodnych inozytoli w przekazywaniu informacji. [W:] *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, KONARSKA L. (red.), PWN, Warszawa, 138–153.
- BARAŃSKA J., 1997. Wapń jako pierwotny i wtórny przekaznik informacji. Udział Ca^{2+} w cyklu komórkowym, sekcji i adhezji. *Kosmos*, 46, 33–44.
- BERNIDGE J. M., 1995. Capacitive calcium entry. *Biochem. J.* 312, 1–11.
- BRISMAR T., 1995. *Physiology of Transformed Glial Cells*. *GLIA*, 15, 231–243.
- FASOLATO C., HOTH M., PENNER R., 1993. A GTP-Dependent Step in the Activation Mechanism of Capacitive Calcium Influx. *J. Biol. Chem.* 268, 20737–20740.
- FASOLATO C., INNOCENTI B., POZZAN T., 1994. Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? *TIPS*, 15, 77–83.
- GILON P., BIRD G. ST. J., BIAN X., YAKEL J. L., PUTNEY JR. J. W., 1995. The Ca^{2+} -mobilizing Actions of a Jurkat Cell Extract on Mammalian Cells and *Xenopus laevis* Oocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 8050–8055.
- HUGHES P. J., MICHELL R. H., 1993. Novel inositol containing phospholipids: their synthesis and possible new roles in cellular signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 3, 383–400.
- IRVINE R.F., 1990. „Quantal” Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates - a possible mechanism. *FEBS*, 263, 5–9.
- NIEWCZAS B., 1995. Regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} w komórkach niepobudliwych, *Postępy Biochemii*, 41, 283–289.
- PUTNEY JR. J. W., 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7, 1–12.
- PUTNEY JR. J. W., BIRD G. ST. J., 1993. The Inositol Phosphate-Calcium Signaling System in Nonexcitable Cells. *Endocrine Reviews*, 14, 610–631.
- RANDRIAMAMPITA C., TSIEN R. Y., 1993. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature*, 364, 809–818.
- RANDRIAMAMPITA C., TSIEN R. Y., 1995. Degradation of a Calcium Influx Factor (CIF) Can Be Blocked by Chelation of Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 270, 29–32.
- VETULANI J., 1995. Wapń jako wtórny przekaznik informacji. [W:] *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, KONARSKA L. (red.), PWN, Warszawa, 154–176.
- WIKTOREK M., SABAŁA P., CZARNY M., BARAŃSKA J., 1996. Phosphatidylserine Synthesis in Glioma C6 Cells Is Inhibited by Ca^{2+} Depletion from the Endoplasmic Reticulum: Effects of 2,5-Di-tert-butylhydroquinone and Thimerosal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 645–650.