

JERZY VETULANI

Instytut Farmakologii PAN

Smętna 12, 31-343 Kraków

E-mail: nfvetula@cyf-kr.edu.pl

WAPŃ I KANAŁY WAPNIOWE REGULOWANE POTENCJAŁEM

Wapń jest jednym z pierwiastków o zasadniczym znaczeniu dla całego królestwa zwierząt. Najbardziej dostrzegalne jest tworzenie z jego nierozpuszczalnych soli szkieletów wewnętrznych i zewnętrznych zwierząt, od otwornic do kręgowców. W ustroju ludzkim 95% wapnia jest zmagazynowane w kościach, ale znajduje się on w dynamicznej równowadze z resztą ustroju i zapewnia homeostazę wapnia zewnątrzkomórkowego (RUBIN 1985). Pierwszy raz wapń wszedł na arenę fizjologii dzięki niefrasobliwości laboranta w pracowni Sydneya Ringera, który przygotowywał roztwory do inkubacji izolowanego serca, używając wody z kranu. Kiedy laborant był na urlopie, solidny Ringer przygotowywał roztwory *lege artis*, stosując wodę destylowaną i praktycznie nie uzyskiwał żadnych skurczów mięśnia sercowego. Przeprowadzone przez niego dochodzenia doprowadziły do wniosku, że roztwór chlorku sodu w wodzie z kranu silniej niż taki roztwór w wodzie destylowanej podtrzymuje kurczliwość mięśnia sercowego, a odpowiedzialne za to okazały się minimalne stężenia Ca^{2+} , obecnego w sieci wodociągowej (RINGER 1883).

Kluczowa rola wapnia w regulacji procesów życiowych wiąże się z historią rozwoju życia na Ziemi, a w szczególności z jego rywalizacją z fosforanami. Samoreprodukujące się twory, dające początek prymitywnym formom życia, wykorzystały związki fosforanowe dla zapewnienia wierności i plastyczności reprodukcji. Tę rolę fosforany pełnią po dziś dzień, stanowiąc istotny element kwasów nukleinowych. Również wysokoenergetyczne wiązania między resztami fosforanowymi zostały z powodzeniem wykorzystane przez żywe komórki jako magazyny energetyczne. Wreszcie ze względu na fakt, że dołączenie grupy fosforanowej do reszt aminokwasowych zmienia konformację tworzonych przez nie białek, procesy fosforylacji i defosforylacji odgrywają zasadni-

czą rolę w regulacji czynności życiowej komórki i przesyłaniu sygnałów. Wszystkie te czynniki sprawiły, że jony fosforanowe były wychwytywane z „pierwotnej zupy” praooceanu przez twory ewoluujące w kierunku życia. W tej pierwotnej zupie znajdowały się jednak również stosunkowo wysokie stężenia Ca^{2+} , a powinowactwo ich do PO_4^{3-} jest bardzo duże. Iloczyn rozpuszczalności ortofosforanu wapnia $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 1×10^{-25} , jest jednym z najniższych znanych i wobec tego gdy Ca^{2+} natrafia na PO_4^{3-} następuje wytrącenie fosforanu wapnia. Twory aspirujące do życia musiały chronić swe środowisko wewnętrzne przed Ca^{2+} , aby ochronić reszty fosforanowe i uczyniły to, tworząc błonę komórkową, skutecznie zapobiegającą wchodzeniu Ca^{2+} do komórki, oraz tworząc wewnątrzkomórkowe zbiorniki retencyjne, w których jony Ca^{2+} mogły być internowane (VETULANI 1995). W trakcie ewolucji wapń uzyskiwał coraz to dalsze funkcje, stając się przez to coraz bardziej niezbędny, ale również coraz niebezpieczniejszy dla komórki. Gwałtowny wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} jest pierwszym i ostatnim sygnałem w życiu komórki: życie zaczyna się od potężnej fali wapniowej przebiegającej przez jajo w chwili wnikięcia plemnika, a kończy nie kontrolowanym napływem Ca^{2+} , gdy błona komórkowa nie jest już w stanie przeciwdziałać jego naprowi, a wlewające się jony aktywują „jak leci” enzymy proteolityczne i lipolityczne, powodując zniszczenie biochemicznej maszyneryi komórki. Między tymi dwoma wydarzeniami przez komórkę pobudliwą stale przepływają fale wapniowe inicjowane przez „iskierki” (sparks) wapniowe odkryte początkowo w komórkach mięśnia sercowego (CHENG i współaut. 1993), a ostatnio opisane również w neuronach (LIPP i NIGGLI 1996). Iskierki wapniowe są obecnie uważane za podstawowe cegiełki składające się na sygnał wapniowy, powstają-

cy w wyniku ich czasowo-przestrzennej rekrutacji (LIPP i BOOTMAN 1997).

Na obecnym etapie ewolucji królestwa zwierząt wapń pełni wiele istotnych i różnorodnych funkcji w ustroju. Ma on istotne znaczenie dla utrzymania postawy i motoryki, zapewnia nieprzepuszczalność błon, działa jako sygnał wewnątrzkomórkowy i umożliwia przesyłanie sygnałów między komórkami, reguluje funkcje cytoszkieletu, skurcze mięśniowe, podział komórki i egzocytozę oraz transkrypcję genów. Odgrywa zasadniczą rolę w obu typach śmierci, jakim może ulec komórka: w nekrozie i apoptozie. Ca^{2+} działa jako wtórny przekaznik, regulując aktywność licznych enzymów, kanałów jonowych, ekspresję genów szybkiego reagowania, i indukując w ten sposób swoiste programy genetyczne, odpowiedzialne za różne długoterminowe działania komórek, na przykład tak zwane długotrwałe wzmocnienie (LTP), uważane przynajmniej za model, jeżeli nie wręcz za podstawę procesów pamięci (BERTOLINO i LINAS 1992). Zmiany aktywności poszczególnych typów kanałów wapniowych we wczesnych stadiach ontogenezy mogą regulować takie zjawiska, jak naturalna śmierć neuronów i tworzenie się synaps (HILAIRE i współaut. 1996). Jak można się domyśleć, równie różnorodna jest metaboliczna maszynaria, wywołująca zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i reagująca na nie.

W cytosolu komórek obecnie żyjących organizmów stężenie Ca^{2+} jest bardzo niskie, nanomolarne, podczas gdy stężenie w przestrzeni międzykomórkowej jest kilkanaście tysięcy razy wyższe. Istnienie tak wysokiego gradientu stężeń powoduje nieustanne przedostawanie się Ca^{2+} różnymi drogami do wnętrza komórki i konieczność jego efektywnego usu-

wania. Sytuacja taka, potencjalnie niebezpieczna, została jednak wykorzystana przez ewolucję, która pozyskała Ca^{2+} jako efektywny sygnał wewnątrzkomórkowy, a także, w niektórych przypadkach, międzykomórkowy.

Wapń jest szczególnie predestynowany do pełnienia roli sygnału wewnątrzkomórkowego. Niektóre sole wapnia są łatwo rozpuszczalne a jon wapnia jest niewielki, a przez to szybko dyfunduje w cytoplazmie. Jego poziom jest — ze względów podanych wyżej — ściśle kontrolowany, a nadmiar prawie natychmiast likwidowany. To umożliwia szybkie powtarzanie sygnału. Wreszcie Ca^{2+} łącząc się z białkami, podobnie jak jony fosforanowe zmienia ich konformację, a więc może służyć do aktywacji licznych enzymów komórkowych. Sygnał wapniowy jest energetycznie tani — nie ma potrzeby syntezy przekaznika sygnałów, a kłopoty sprawia raczej jego usuwanie.

W tym artykule zajmiemy się jednym aspektem maszynarii regulującej zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} — wnikaniem Ca^{2+} do komórki. Ca^{2+} czyni to przechodząc przez różnego typu kanały. Nieswoiste wnikanie polega na wykorzystaniu kanałów sodowych, przez które na 100 Na^+ przemyca się jeden Ca^{2+} . Tak wprowadzony Ca^{2+} nie pełni roli sygnału. Stąd znacznie ważniejszą rolę odgrywają kanały swoiste, przez które Ca^{2+} dostaje się w sposób legalny, kontrolowany. Kanały te możemy podzielić na dwie wielkie grupy: kanały sterowane zmianami napięcia błonowego (VD, voltage-dependent) oraz kanały sterowane przez przyłączenie się swoistego ligandu, którym jest neuromediator (LD, ligand-dependent). W tym artykule omówimy tylko pierwszą grupę.

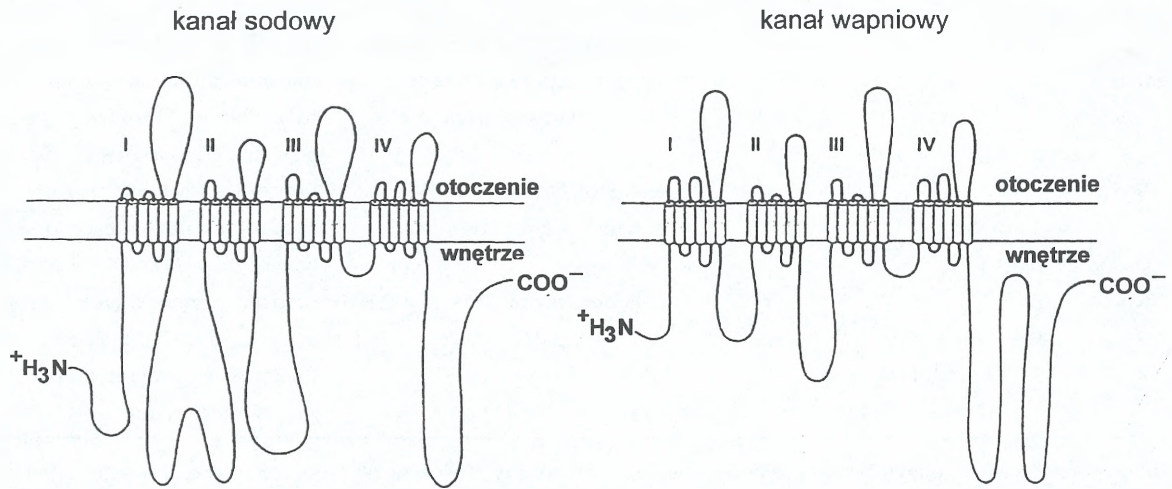
KANAŁY JONOWE

Kanały Ca^{2+} sterowane potencjałem należą do nadrodziny kanałów jonowych. Kanały takie są strukturami regulującymi napływ jonów do komórki zgodnie z gradientem stężeń. Ich podstawową cechą jest selektywność (mówiąca, jakie jony i w jakich proporcjach będą przez kanał przepuszczane) oraz przewodność (stosunek wielkości przechodzącego prądu jonowego do różnicy potencjałów w poprzek błony). Przechodzące prądy są rzędu pikoamperów, a przewodności rzędu pikosiemensów (ps). Oznacza to, że kanał przepuszcza jony z szybkością rzędu dziesięciu milionów na sekundę. W przypad-

ku kanałów dla jonów, których stężenie w komórce jest duże, oznacza to, że otwarcie kanału może zmienić napięcie błony, ale nie zmienia istotnie stężeń jonu wewnątrz komórki. Jednak w przypadku Ca^{2+} , którego w cytosolu jest mało, otwarcie kanałów może podnieść jego średnie stężenie wewnątrzkomórkowe nawet o dwa rzędy wielkości. Struktura kanału jonowego jest dość skomplikowana, zasadniczym jej elementem są podjednostki, składające się z długiego łańcucha białkowego, kilkakrotnie przechodzącego w poprzek błony i tworzącego wewnętrzne i zewnętrzne pętle. Istnieje znaczna

homologia pomiędzy kanałami jonowymi dla różnych jonów, co świadczy, że w toku ewolucji wykształciła się pewna, optymalna, a przynajmniej wystarczająca, struktura regulująca na-

plyw jonów do komórki, a następnie powstawały różne jej warianty. Podobieństwo pomiędzy budową podjednostki kanału sodowego i wapniowego przedstawia rycina 1.



Ryc. 1. Podobieństwo budowy podjednostki α_1 kanału sodowego i wapniowego typu L świadczy o wspólnym pochodzeniu i przynależności do jednej nadrodziny białek błonowych (BERTOLINO i LLINÁS 1992).

ZASADNICZA STRUKTURA KANAŁU WAPNIOWEGO

Badania biochemiczne, immunoprecypitacja i badania molekularne wykazały, że regulowane potencjałem kanały wapniowe są kompleksami heterooligomerycznymi. Zasadniczą część tego kompleksu stanowi podjednostka α_1 składająca się z czterech motywów tak ułożonych, że stanowią granicę poru. W czasie ewolucji wykształciło się co najmniej sześć genów kodujących różne warianty tej podjednostki (A, B, C, D, E, S) (tab. 1). Podjednostki α_1 mają masę od 187 kDa (1634 aminokwasy, α_{1D} z hipokampa szczura) do 273 kDa (2424 aminokwasy, α_{1A} z innych tkanek). Podjednostki α_1 różnych typów mają podobną

strukturę czterech odcinków transbłonowych, różnią się natomiast w pętli pomiędzy segmentem II i III oraz końcowym odcinkiem karboksylowym.

To właśnie podjednostka α_1 determinuje podtyp kanału wapniowego, a co zatem idzie, jego charakterystykę elektrofizjologiczną i farmakologiczną (DUNLAP i współaut. 1995, STEA i współaut. 1994) (tab. 2). Zawiera miejsce fosforylacji zależne od cyklicznego AMP, reszty glutaminianowe w świetle poru warunkują selektywność kanału dla jonów Ca^{2+} , a leki modyfikujące kanał wiążą się blisko wyściółki poru (VARADI i współaut. 1995). Każdy z czterech

Tabela 1. Rodzina genów kodujących podjednostki α_1 i β kanałów wapniowych

Pierwotna podjednostka α_1						
aktywowana niskim lub średnim potencjałem		aktywowana wysokim potencjałem				
		niewrażliwa na dihydropirydyny		wrażliwa na dihydropirydyny		
α_{1T}	α_{1E}	α_{1B}	α_{1A}	α_{1D}	α_{1C}	α_{1S}
kanał T	kanał R	kanał N	kanał P, Q	kanał L	kanał L	kanał L

Pierwotna podjednostka β			
β_1	β_2	β_3	β_4
1a (mięśnie) 1b, 1c (mózg)	2a, 2b (mózg, serce)	3a, 3b, 3c (mózg)	(mózdzek)

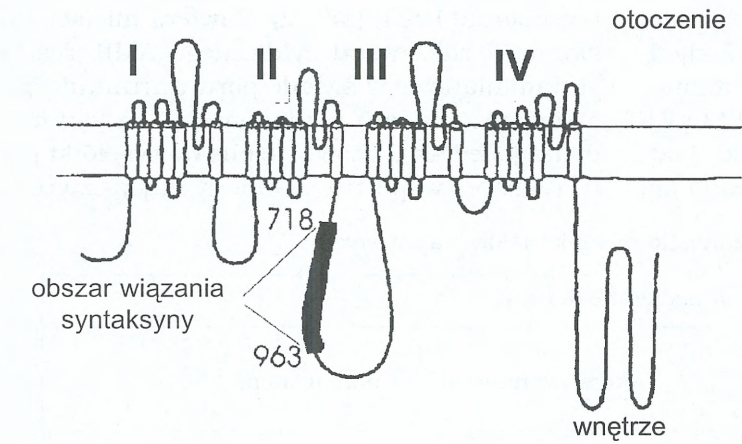
Tabela 2. Główne typy kanałów Ca²⁺ sterowanych potencjałem

Typ kanału	Podjednostka α ₁	Próg aktywacji	Wrażliwość na dihydropirydyny	Selektywni antagoniści	Najobfitsze występowanie
L	S	wysoki (HVA)	tak	dihydropirydyny (nifedipina)	mięśnie szkieletowe
L	C			benzotiazepiny (diltiazem)	mięśnie gładkie, mięsień sercowy
				fenylalkilaminy (werapamil)	mózg, płuca, fibroblasty
L	D		nie		gruczoły endokrynne, nerki, mózg
P	A			ω-agatoksyna IVA (≥100 μM)	neurony (główne kanały w komórkach Purkiniego), nerki
Q	A			ω-konotoksyna MVIIC	oocyty żaby, komórki w hodowli
N	B			ω-konotoksyna GVIA (≤100 μM)	neurony, komórki endokrynne
R	E	niski		Ni ²⁺ (≤30 μM)	ośrodkowy układ nerwowy
T	?	i średni (LVA)			mięśnie, neurony, komórki neuro-endokrynne

Istnieje ponadto wiele toksyn bezkręgowców o niskiej swoistości w stosunku do poszczególnych typów kanałów wapniowych: funelotoksyna (poliamid z jadu *Agelopsis*), ω-grammotoksyna SIA z jadu tarantuli *Grammostola spatulata*, ω-konotoksyny MVIIA i MVIIC z ślimaka *Conus magmus* itp. Nieswoistymi antagonistami licznych typów kanałów Ca²⁺ są również jony Ni²⁺ i Cd²⁺. Odkrywane są nowe podtypy kanałów P i R (VETULANI 1995, DUNLAP i współaut. 1995, VARADI i współaut. 1995).

motywów stanowiących por składa się z sześciu odcinków przechodzących poprzez błonę i tworzących zewnętrzne i wewnętrzne pętle, które zawierają regiony regulacyjne, do których mogą się przyłączać białka regulujące kanał, jak na przykład syntaksyna w kanale typu N, uczestnicząca w procesie uwalniania neuromediatora (ryc. 2) (STANLEY 1997).

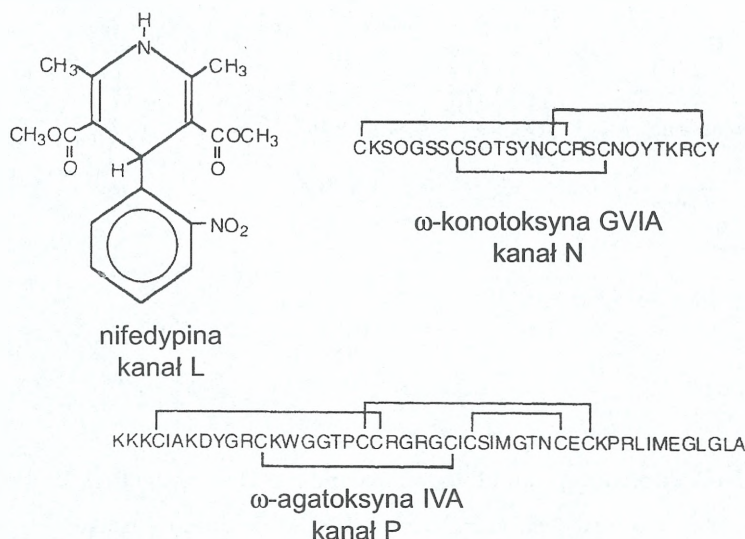
stki z podjednostkami α₂/δ i β przyspieszała kinetykę, zwiększała gęstość receptorów i podnosiła liczbę miejsc wiążących ligandy (VARADI i współaut. 1991). Podjednostka β w czasie ewolucji wykształciła cztery warianty (tab. 1) i okazało się, że z różną siłą przyspieszają one kinetykę inaktywacji podjednostki α₁ (SATHER i współaut. 1993, ELLINOR i współaut. 1993). Po-



Ryc. 2. Podjednostka α₁ kanału wapniowego typu N z zaznaczonym miejscem przyłączenia się białka syntaksyny, biorącego udział początkowo w sprzęganiu pęcherzyka synaptycznego z kanałem, a następnie — po znacznym zwiększeniu poziomu wapnia — w tworzeniu miejsca egzocytozy (STANLEY 1997).

Poza tworzącą por podjednostką α₁ w kompleks kanału wapniowego wchodzi jeszcze podjednostki mogące modyfikować funkcje kanału. Ich rolę wykazano stwierdzając, że ekspresja samej podjednostki α_{1S} wystarczyła do utworzenia kanału wapniowego w mysich fibroblastach, ale kinetyka jego aktywacji i inaktywacji była niezmiernie powolna (PEREZ-REYES i współaut. 1989), a koekspresja tej podjedno-

za najintensywniej badaną podjednostką β, znajdującą się w cytoplazmie, oraz α₂, położoną na zewnątrz, w przestrzeni międzykomórkowej, w skład kompleksu wchodzi jeszcze transmembranowe podjednostki γ i δ lub ich analogi. Schemat budowy kanału wapniowego regulowanego potencjałem przedstawia, na przykładzie kanału typu L, rycina 3.



Ryc. 4. Selektywne ligandy służące do charakteryzowania głównych typów wysokoprogowych kanałów wapniowych regulowanych potencjałem, L, N i P. (DUNLAP i współaut., 1995).

ne na działanie związków blokujących kanały L, N i P, zaliczono do grupy R (resistant, odporne) (TOTTENE i współaut. 1996).

Jest bardzo prawdopodobne, że ewolucja typów kanałów wapniowych przebiegała równoległe do ewolucji różnych funkcji komórkowych, w których kanały te odgrywają zasadniczą rolę. Inne kanały powstały do inicjowania skurczu mięśniowego, inne do regulacji sekrecji. Ewolucję tę możemy prześledzić tworząc „drzewo genealogiczne” na podstawie homologii podjednostek α_1 i β (tab. 1 i 2). Jest rzeczą istotną, że różne kanały wapniowe, różniące się charakterystyką biofizyczną i farmakologiczną, występują w tej samej komórce i wzajemnie uzupełniają się funkcjami (DUNLAP i współaut. 1995). Współpracy kanałów wapniowych, zwłaszcza w procesie regulowania uwalniania neuromediatorów w synapsie, poświęćmy więcej uwagi pod koniec tego artykułu.

KANAŁ T

Kanał T został odkryty przez LLINÁSA i YAROMA (1981) w kadłubach neuronów dolnego jądra oliwkowego świnki morskiej, podczas gdy kanały wysokoprogowe znajdują się w zakończeniach. Później wykryto je w neuronach zwojów korzenia tylnego kury i szczura. Jest kanałem niskonapięciowym; jego aktywacja wymaga niewielkiej depolaryzacji (-50 mV). Przenosi prąd przy ujemnych potencjałach membranowych (-40 – -10 mV): prąd ten zanika w ciągu 10 – 50 ms i stąd nazwa kanału (T, transient).

Maksymalna przewodność kanału T wynosi 8 pS. Jego struktura nie jest jeszcze znana, nie jest znany też typ podjednostki α_1 tworzącej por w tym kanale. Nie dysponujemy na ra-

zie czułymi i swoistymi ligandami tego kanału: hamowany jest silniej niż inne typy kanałów wapniowych przez Ni^{2+} . Kanały T są też blokowane przez amilorid (TANG i współaut. 1988), związek, który blokuje również wymiennik sodowo-protonowy i sodowo-wapniowy. Względnie swoiście kanał T blokują wyższe alkohole (SINTON i współaut. 1989).

Fakt, że kanał typu T jest aktywowany przez napięcia bliskie potencjałowi spoczynkowemu wskazuje, że może on być odpowiedzialny za oscylacyjną akcję neuronów. Oscylacje te mogą pełnić ważną rolę w wyznaczaniu globalnych stanów funkcjonalnych (np. sen, czuwanie, uwaga), w koordynacji ruchowej oraz w determinowaniu połączeń neuronalnych w czasie ontogenezy. Zaburzenia takich oscylacji, zwłaszcza w obwodach wzgórzowo-korowych, mogą być związane z pewnymi chorobami neurologicznymi i psychiatrycznymi (LLINÁS 1988). We wzgórzu aktywacja kanałów typu T powoduje dwa typy aktywności: toniczną oraz fazową (napadową). Dzięki temu neurony wzgórzowe zachowują się jak oscylatory o dwóch różnych częstotliwościach. Zmiany potencjału błonowego powodują zmianę typu działania neuronów wzgórzowych. Przy potencjałach bardziej dodatnich niż -60 mV komórki iskrzą z częstotliwością 10 Hz w wyniku aktywacji prądu sodowego, przy potencjałach bardziej ujemnych niż -65 mV są wyzwalane potencjały czynnościowe o częstotliwości 5 Hz w wyniku inaktywacji kanałów T (LLINÁS i JAHNSEN 1982). Poza ośrodkowym układem mózgowym kanały typu T pełnią istotną rolę w różnych narządach obwodowych, na przykład w trzustce, gdzie ułatwiają sekrecję insuliny w

wyniku zwiększania ogólnej pobudliwości komórek wydzielających ten hormon (BHATTACHARJEE i współaut. 1997).

KANAŁ L

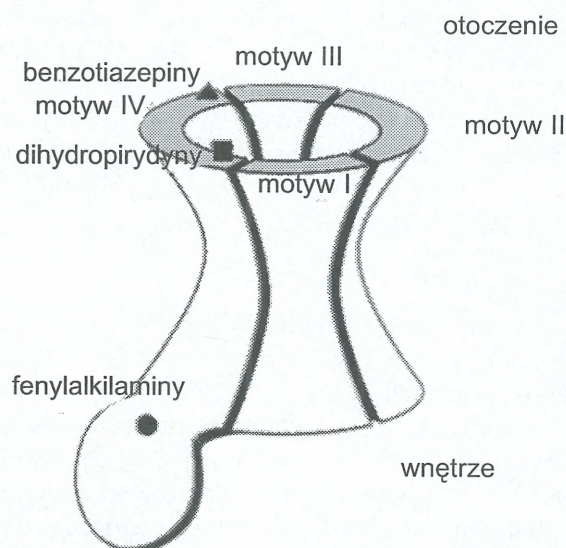
Kanał typu L jest uważany za prototypowy dla wszystkich kanałów jonowych wymagających wysokiego potencjału aktywacyjnego (HVA). Występuje w dużych ilościach w tkance mięśniowej, w poprzecznej błonie tubuli i może być znakowany związkami pochodnymi dihydropirydyny (FOSSET i współaut. 1983). Umożliwiło to jego izolację i zbadanie struktury (CAMPBELL i współaut. 1988, CATTERALL i współaut. 1988).

Kanał L jest aktywowany dopiero przy znacznej depolaryzacji neuronu, a maksymalna amplituda prądu wapniowego związana z jego otwarciem następuje przy potencjale +10 mV. Ma on wysoką przewodność, rzędu 25 pS, a spadek prądu po jego zamknięciu jest powolny, rzędu 500 ms. Kanał L może otwierać się na dwa sposoby. W trybie pierwszym (mode I), występującym znacznie częściej, kanał otwiera się na krótko (średnio 1 ms) ale często, powodując serię wyładowań. W trybie drugim (mode II) otwarcie kanału trwa ponad 10 ms. Ponadto kanał może znajdować się w trybie niewrażliwym na pobudzenie (mode 0) (NOWYCKY i współaut. 1985a, b, FOX i współaut. 1987a, b). Warunkiem otwarcia kanału L w czasie depolaryzacji jest to, aby był ufosforylowany: napływ Ca^{2+} przez kanały L jest więc regulowany przez aktywność swoistej fosfatazy, kalcyneury (ARMSTRONG 1989).

Zasadniczą funkcją kanałów typu L jest tworzenie potencjałów czynnościowych oraz napełnianie siateczki endoplazmatycznej Ca^{2+} . Kanały te znajdują się we wszystkich tkankach pobudliwych. W mózgu występują tak na kadłubach, jak i na zakończeniach neuronów. Szczególnie liczne skupiska kanałów L obserwuje się przy podstawach większych dendrytów w komórkach piramidalnych w hipokampie. Jak się wydaje, pełnią tam one istotną rolę w zjawisku tak zwanej opóźnionej facylitacji, zapewniającej długotrwały napływ Ca^{2+} do neuronów w warunkach ujemnego potencjału membranowego. Aktywacja receptora β -adrenergicznego swoiście blokuje ten typ odpowiedzi, ale nie inne rodzaje aktywności kanałów L (CLOUES i współaut. 1997).

Kanały typu L występujące w mięśniu sercowym, mięśniach szkieletowych i tkance nerwowej różnią się od siebie strukturą podjednostki α_1 , posiadają jednak w zasadzie podobną

farmakologię. Leki działające na kanały typu L w mięśniu sercowym i naczyniach były badane szczególnie szeroko, gdyż znalazły zastosowanie w terapii chorób krążeniowych, głównie jako leki obniżające ciśnienie u osób z nadciśnieniem. Najbardziej swoiste substancje oddziałujące z kanałem typu L to związki z grupy dihydropirydyny, które mogą wywierać działanie agonistyczne lub antagonistyczne. Antagonistami, powodującymi zmniejszony napływ Ca^{2+} do komórki są takie leki, jak nifedypina, nitrendypina czy nimodypina, agonistą zaś BAY K 8644. Działanie dihydropirydyn nie polega na blokowaniu czy otwieraniu poru kanału, ale na zmianie jego typu otwierania się. Agonista BAY K 8644 zmienia sposób bramkowania kanału z typu o krótkim otwarciu na typ o długim otwarciu (NOWYCKY i współaut. 1985b). Na podjednostce α_1 znajdują się, poza miejscami swoiście wiążącymi pochodne dihydropirydyny, jeszcze miejsca wiążące innych antagonistów kanału L, pochodne benzotiazepiny (np. diltiazem) i fenylalkilaminy (np. werapamil) (ryc. 5)



Ryc. 5. Model podjednostki α_1 kanału wapniowego typu L, z zaznaczeniem miejsc wiązania się różnych typów antagonistów tego kanału. Miejsca te znajdują się na motywie IV (VARADI i współaut. 1995).

Kanały L mogą zmieniać swą gęstość (zaragonowo mówiąc: być up- lub down-regulowane) przez własne ligandy (PANZA i współaut. 1985), a także ulegać zmianom pod wpływem innych czynników, jak na przykład abstynencja morfinowa czy chroniczny elektrowstrząs (ANTKIEWICZ-MICHALUK i współaut. 1990a, b, 1991, 1994). Sugeruje to możliwość istnienia naturalnych, endogennych ligandów tych kanałów, co oznaczałoby, że — wbrew nazwie — mogą być one regulowane nie tylko napięciem.

Sugestię tę potwierdzają dane biochemiczne i elektrofizjologiczne (SANNA i HANBAUER 1987, CALLEWAERT i współaut. 1989). Jak wspomniano, kanały typu L wymagają do swego działania fosforylacji i są regulowane, poza kalcyneuryną, przez kinazy tyrozynowe i kinazę białkową C (PKC) i wydają się być miejscem integracji aktywacji kinaz tyrozynowych i szlaków zależnych od PKC. Aktywność PKC określa, czy kinazy tyrozynowe będą w danym układzie zwiększać, czy zmniejszać aktywność kanału L (STRAUSS i współaut. 1997).

Szczególnie interesującą rolę wydają się pełnić kanały typu L w regulacji zmian adaptacyjnych w ośrodkowym układzie nerwowym. We własnych badaniach wykazaliśmy, że blokada kanałów typu L w chwili podawania leków stosowanych chronicznie znosi takie efekty, jak wytwarzanie się uzależnienia od morfiny (ANTKIEWICZ-MICHALUK i współaut. 1993), powstawanie zespołów odstawienia po neuroleptykach (MAMCZARZ i współaut. 1994, ANTKIEWICZ-MICHALUK i współaut. 1995), czy zaburzenia metabolizmu dopaminy po LSD (ANTKIEWICZ-MICHALUK i współaut. 1997). Również wyniki innych sugerują, że kanały typu L mogą grać rolę w mechanizmach uzależnień lekowych (KUZMIN i współaut. 1996). Wszystko to sugeruje, że związki blokujące napływ Ca^{2+} do komórki przez kanały typu L mogłyby znaleźć zastosowanie w zwalczaniu narkomanii.

KANAŁ N

Kanały typu N występują w tkance nerwowej i stąd często mylnie przypuszcza się, że od tego właśnie wzięły swoją nazwę (faktycznie od słowa neither - zob. wyżej). Są one aktywowane wysokim potencjałem, posiadają przewodność 13–20 pS, a ich stała deaktywacji wynosi 50–80 ms. Charakterystyka prądu wapniowego z kanału N jest złożona (PLUMMER i współaut. 1989, PLUMMER i HESS 1991) i ten sam kanał w danym neuronie może bądź otwierać się na krótko i wielokrotnie, dając serię impulsów, bądź otwierać się na długo (podobnie, jak to robią kanały L omówione wyżej). Ich scharakteryzowanie umożliwił fakt, że są one wybiórczo blokowane przez ω -konotoksynę-GVIA — jeden z grupy toksycznych peptydów z drapieżnego ślimaka morskiego *Conus geographicus* (OLIVERA i współaut. 1985).

Kanały N pełnią, wraz z kanałami P, zasadniczą rolę przy uwalnianiu neuromediatorów z zakończeń nerwowych. ω -Konotoksyna-GVIA, na przykład, całkowicie blokuje uwalnianie acetylocholin w płycie nerwowomię-

śniowej zaby i ta jej właściwość jest wykorzystywana do paraliżowania ryb przez *Conus*. Szczegółowo kanały te omówimy opisując rolę Ca^{2+} przy uwalnianiu neuromediatorów.

Kanały N występują już w życiu embrionalnym, co może się wiązać z ich rolą w migracji neuronów, ale najsilniejsza ekspresja następuje po urodzeniu, w tym samym czasie co synaptogeneza. We wczesnych okresach rozwojowych kanały N pojawiają się na kadłubach komórek przed wytworzeniem dendrytów i czynią to asynchronicznie w różnych polach (CA3-CA4 przed CA1-CA2 i zawojem zębatym). Dane te wskazują, że ekspresja kanałów N jest ważna dla genezy transmisji synaptycznej w różnych rejonach hipokampa (JONES i współaut. 1997).

KANAŁ P

Kanał P został odkryty później niż „wielka trójka” czyli kanały T, L i N, chociaż wydaje się, że jest to najbardziej rozpowszechniony typ kanału wapniowego w ośrodkowym układzie nerwowym (BERTOLINO i LLINÁS 1992, DUNLAP i współaut. 1995). Opisano go jako odrębny typ kanału wysokonapięciowego ze względu na to, że jest swoiście blokowany przez FTX czyli ω -agatoksynę IVA, toksynę z jadu amerykańskiego pajaka *Agelenopsis aperta* (funnel-web spider) a nazwano go kanałem P, ponieważ odkryty został najpierw w komórkach Purkiniego (LLINÁS i współaut. 1989). Znalezione go następnie w dużych ilościach w innych obszarach ośrodkowego układu nerwowego (HILLMAN i współaut. 1991). Wydaje się pełnić rolę integrującą aktywność nerwową i bierze udział w uwalnianiu neuromediatorów w synapsach.

KANAŁ Q

Podobny do kanału P, kanał Q został opisany najpierw przez grupę Randalla i Tsien jako kanał doe-1 w organie elektrycznym płaszczki *Dyscophya amata* (ZHANG i współaut. 1993). Wykazano później, że bierze udział, na równi z kanałem N, w uwalnianiu neuromediatora w hipokampie (WHEELER i współaut. 1994), a w szczególności jest zaangażowany w uwalnianie dopaminy w siatkówce (TAMURA i współaut. 1995). Kanały podobne do Q znaleziono też w organie elektrycznym płaszczki *Raja montagui* (RICHARDSON i współaut. 1995). Od odkrycia kanału Q minęło tak niewiele czasu, że nie jest on jeszcze umieszczany na mapach ewolucji genów kanału wapniowego lub traktowany jest jako podtyp kanału R. Inni traktują go jako podtyp kanału P i mówi się nawet o kanałach typu P/Q.

MODULACJA KANAŁÓW WAPNIOWYCH PRZEZ BIAŁKA G

System kanałów wapniowych jest powiązany z całością systemów sygnalizacyjnych w ustroju i może być przez nie modulowany. Szczególnie interesującą rolę odgrywa modulacja kanałów wapniowych przez presynaptyczne receptory dla neurotransmiterów, realizowana poprzez sygnały przekazywane przez regulacyjne białka wiążące GTP (białka G). Od dawna wiadomo było, że białka te pełnią zasadniczą rolę w transdukcji sygnału w receptorach metabotropowych, a teraz zaczyna się odkrywać ich drugie oblicze. Badania nad regulacją kanałów wapniowych przez białka G to jeden z najintensywniej uprawianych obszarów neurobiologii, a coraz nowe odkrycia spowodują, że mimo iż ostatnie omówione tu doniesienia były publikowane w sierpniu 1997, w momencie dotarcia tego artykułu do Czytelnika podane tu wiadomości mogą okazać się przestarzałe.

Pierwsze odkrycie wskazujące na to, że sygnały z receptorów metabotropowych mogą wpływać na aktywność kanałów wapniowych to obserwacja, że serotonina, noradrenalina i GABA hamują prąd Ca^{2+} w zwoju korzenia grzbietowego kury (DUNLAP i FISHBACH 1981). Odkrywcy postawili hipotezę, że blokada wejścia Ca^{2+} do zakończenia przez neuromediator jest powodem hamowania presynaptycznego i ma znaczenie w uwalnianiu neuromediatora. Obecnie modulacja hormonalna kanałów wapniowych sterowanych potencjałem w neuronach oraz komórkach mięśnia sercowego i endokrynnych jest dobrze udokumentowana (HESCHELER i SCHULTZ 1997). Już ponad trzy lata temu wiadano, że kanały wapniowe typu N, odpowiadające — jak wiemy — za uwalnianie neuromediatorów, są hamowane w różny sposób przez ponad 20 neuromediatorów (HILLE 1994) i że hamowanie to nie jest

związane ze zmianą liczby kanałów, ale zwolnieniem szybkości aktywacji i (nie zawsze) podniesieniem progu aktywacji przez część kanałów w zakończeniu, nazwaną populacją kanałów niechętnych do otwarcia (BEAN 1989). Hamowanie wywołane przez neuromediatory jest odblokowane przez silną depolaryzację.

Pierwszym pytaniem było, które białka G są zaangażowane w regulację kanałów wapniowych i które kanały podlegają tej regulacji? Jak wiemy białka G są heterotrimerami, a ich aktywność związana z produkcją wtórnego przekaźnika jest wyznaczona rodzajem podjednostki α . Białka G zaangażowane w modulację kanałów wapniowych należą do grupy wrażliwych na toksynę krztuśca (PTX), a dalsze badania wykazały, że w większości są to białka typu G_o . Jednakże stwierdzono, że również białko G_s działa blokująco na kanały wapniowe i czyni to bez pośrednictwa cyklicznego AMP (BROWN i BIRNBAUER 1988). Stosunkowo wcześniej zorientowano się też, że białka G działają na kanały nie poprzez ich fosforylację. Fosforylacja jest również jednym z mechanizmów regulacji kanałów jonowych, ale jest procesem znacznie wolniejszym, podczas gdy efekty hamujące białek G następują w czasie ułamków sekundy (BERNHEIM i współaut. 1991, BOLAND i BEAN 1993). Wykazano też, że w niektórych przypadkach białka G działają bezpośrednio na strukturę kanału, w innych czynią to za pomocą nieznanego pośrednika, będącego wtórnym przekaźnikiem. Stan naszej wiedzy podsumowuje tabela 3. Część wiadomości tam umieszczonych jest już uzupełniona. Ostatnio wykazano na przykład (STRUBING i współaut. 1997), że somatostatyna hamuje nie tylko kanały wapniowe typu N, ale również kanały typu L. Przy okazji

Tabela 3. Szlaki modulacji kanałów Ca^{2+} przez białka G (HILLE 1994)

Receptor	Muskarynowy M1 Angiotensyny II	Muskarynowy M4, adrenergiczny $\alpha 2$, somatostatyny, adenozyny, polipeptydu trzustkowego (PP), prostaglandyny E_2	Adrenergiczny $\alpha 2$,	Substancji P, polipeptydu trzustkowego (PP)	Sekretyny, wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP)
Białko G	$G_{q/11}$	G_o	G_{niePTX}	G_{niePTX}	G_s
Modulacja	przez wtórny przekaźnik	bezpośrednia	bezpośrednia	bezpośrednia	bezpośrednia
Przesunięcie potencjału aktywacji	nie	tak	tak	nie	tak
Kanał wapniowy	L, N	N	N	N	N

stwierdzono, że reguluje kanały wapniowe już we wczesnych stadiach ontogenezy, a regulacja ta może stanowić ważny mechanizm epigenetycznej kontroli różnicowania neuronalnego.

Problemem badanym intensywnie w ostatnich latach jest molekularny mechanizm hamowania prądów Ca^{2+} przez neuromediatory. Przez długi czas sądzono, że podobnie jak w wypadku generacji wtórnych przekazników zasadniczą rolę gra podjednostka α białka G (G_α). Jednakże w roku 1996 jednocześnie z dwóch ośrodków opublikowano doniesienia (HERLITZE i współaut. 1996, IKEDA 1996), że za modulację kanału wapniowego odpowiada kompleks podjednostek $\beta\gamma$ ($G_{\beta\gamma}$), co udowodniono przez transfekcję genów podjednostek $\beta\gamma$ do komórek wykazujących ekspresję kanałów P/Q lub komórek sympatycznych zawierających kanał N. Podjednostka G_β jest efektywna bez G_γ i może modulować kanał wapniowy, ale wymaga to jej

bardzo wysokiej ekspresji; G_γ sama nie jest aktywna, ale zwiększa znacznie działanie G_β .

W sierpniu 1997 badacze z grupy Birnbauera (QIN i współaut. 1997) określili dokładnie mechanizm molekularny regulacji neurotransmisji przez presynaptyczne receptory związane z białkami G. Opisali oni dwa miejsca wiążące podjednostkę $G_{\beta\gamma}$, znajdujące się na podjednostkach α_{1A} , α_{1B} i α_{1E} kanałów wapniowych (a więc na kanałach P, N i Q/R). Jedno miejsce wiązania znajduje się na pętli łączącej pierwszy i drugi odcinek transmembranowy, drugie w połowie wolnego końca C. To właśnie drugie miejsce jest odpowiedzialne za blokowanie napływu Ca^{2+} do komórki. Oba miejsca wiążące $G_{\beta\gamma}$ mogą również wiązać podjednostkę β kanału wapniowego, która rywalizując z $G_{\beta\gamma}$ o miejsce wiązania, reguluje stopień hamowania kanału przez pobudzenie receptorów sprzężonych z białkami G.

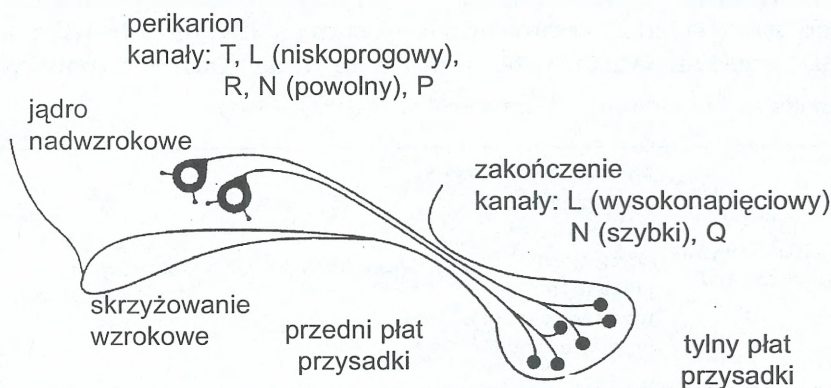
PRZYKŁADY WSPÓŁDZIAŁANIA KANAŁÓW WAPNIOWYCH

KANAŁY WAPNIOWE W KOMÓRKACH NEUROSEKRECYJNYCH

Różnorodność kanałów wapniowych i fakt, że wiele ich typów występuje na jednej komórce umożliwia sprawne regulowanie wielu czynności fizjologicznych. Dobrym przykładem takiego współdziałania jest sytuacja w olbrzymiokomórkowych komórkach neurosekrecyjnych, neuronach zlokalizowanych w podwzgórzu, których zakończenia znajdują się w płacie nerwowym przysadki. Pod wpływem potencjałów czynnościowych płynących z kadłubów, zakończenia uwalniają oksytocynę i wazopresynę (RENAUD i BOURQUE 1991). Szybkość tworzenia potencjałów

oraz ich wzorzec są dokładnie kontrolowane przez wapniowe potencjały następcze, endogenne prądy błonowe oraz impulsy synaptyczne. Napływ Ca^{2+} reguluje zarówno elektrofizjologiczne własności perikarionu, jak i uwalnianie peptydów z zakończeń. Jak wykazano, w komórkach tych zidentyfikowano większość znanych typów kanałów wapniowych (ryc. 6) (FISHER i BOURKE 1996).

Badania prądów Ca^{2+} w tych komórkach wskazały na wysoką kompartmentalizację kanałów wapniowych. Prądy generowane przez kanały T i R występują tylko w perikarionie, a nie w zakończeniu i tylko w perikarionie wyka-



Ryc. 6. Kanały wapniowe w podwzgórzowych olbrzymiokomórkowych komórkach neurosekrecyjnych, uwalniających neurohormony: wazopresynę i oksytocynę w tylnym płacie przysadki. Rozmieszczenie i charakterystyka, a także funkcje kanałów wapniowych sterowanych potencjałem są różne w perikarionie i w zakończeniu. Kanały wapniowe w perikarionie (T, L_{niskoprogowy}, R, N_{powolny}, P) odgrywają istotną rolę w regulacji wzorca bioelektrycznego komórek, uwalnianiu peptydów z dendrytów, regulacji ekspresji genów i plastyczności morfologicznej i funkcjonalnej synaps. Kanały wapniowe w zakończeniu neuronu są inne (L_{wysokonapięciowy}, N_{szybki}, Q) i regulują neurosekrecję, będąc też odpowiedzialnymi za zjawiska tachyfilaksji i facylitacji sekrecji. Współdziałanie kanałów wapniowych w perikarionie i zakończeniu nerwowym zapewnia elastyczną regulację syntezy i uwalniania neurohormonów (FISHER i BOURKE 1996).

zono obecność odpowiednich kanałów i mRNA kodującego ich podjednostki α_1 . W aksonach brak jest niskonapięciowych kanałów T (BOURQUE 1990). Z drugiej strony, mimo tego że kanały L i N znajdują się zarówno w perikarionie, jak i na zakończeniach generowane przez nie prądy Ca^{2+} mają odmienną charakterystykę elektrofizjologiczną. Kanały L w perikarionie są aktywowane przy niskim potencjale, co jest dla tego typu kanału rzeczą niespotykaną. Przypuszcza się, że mogą one grać rolę przy aktywowaniu czynników transkrypcyjnych, tak jak to czynią w neuronach hipokampa i kory (MURPHY i współaut. 1991, BADING i współaut. 1993). Z kolei prądy generowane przez kanały N w perikarionie i w zakończeniu różnią się szybkością inaktywacji.

WSPÓLDZIAŁANIE KANAŁÓW WAPNIOWYCH W PROCESIE UWALNIANIA NEUROMEDIATORA

Uwalnianie neuromediatora w synapsie jest kluczowym etapem neurotransmisji. Proces ten najłatwiej poddaje się szybkiej modulacji, która jest głównym mechanizmem regulacji przekazywania sygnału i punktem uchwytu sprzężeń zwrotnych, dostrajających aktywność sieci neuronalnych. Farmakolodzy wiedzą o roli autoreceptorów, modulujących aktywność synaptyczną w zależności od stężenia neuromediatora w szczeliny synaptycznej. Uwalnianie neuromediatora jest jednak w sposób krytyczny uzależnione od napływu Ca^{2+} do zakończenia synaptycznego i kanały jonowe w zakończeniu pełnią zasadniczą rolę w neurotransmisji.

Podstawowe mechanizmy uwalniania neuromediatora z zakończenia poznano w końcu lat 60-tych, kiedy stwierdzono, że depolaryzacja powoduje w ciągu ułamków milisekund otwarcie kanałów wapniowych, napływ Ca^{2+} , fuzję pęcherzyków wydzielniczych z błoną komórkową i w końcu uwolnienie zawartości pęcherzyka do przestrzeni synaptycznej. Zakończenie presynaptyczne nerwu działa więc jako mikroskopijny, ultraszybki przetwornik elektromechaniczny.

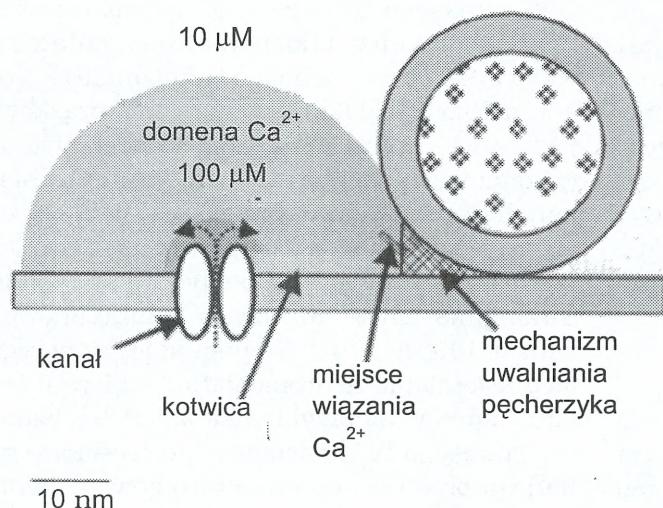
Wejście Ca^{2+} do zakończenia nerwowego powoduje zakotwiczenie się pęcherzyków synaptycznych, wypełnionych neuromediatozem w błonie komórkowej, a następnie fuzję błony pęcherzyka z błoną komórkową i opróżnienie jego zawartości do szczeliny synaptycznej. Jak stwierdzono, w zakończeniach występują różne typy kanałów i, co więcej, zakończenia nerwowe z różnych części mózgu i zakończenia uwalniające różne neuromediatory wykazują różne zestawy typów kanałów (STANLEY 1997).

Pierwszym kanałem wykazanym w zakończeniu nerwowym był kanał typu N blokowany przez ω -konotoksynę GVIA (KERR i YOSHIKAMI 1984, MILLER 1987). Wkrótce wykazano, że jest on zlokalizowany na powierzchni, gdzie są uwalniane neuromediatory (TORRI TARELLI i współaut. 1991, COHEN i współaut. 1991). ω -Konotoksyna GVIA blokuje uwalnianie wielu neuromediatorów, takich jak kwas glutaminowy, GABA, acetylocholina, dopamina i noradrenalina z hipokampa, kory lub prążkowie (DUNLAP i współaut. 1995). Chociaż jednak ω -konotoksyna GVIA jest pełnym antagonistą kanału N, wywoływany przez nią blok jest tylko częściowy, a siła działania peptydu zależy od charakteru synapsy: peptyd blokuje silniej uwalnianie GABA niż kwasu glutaminowego (HORNE i KEMP 1991). Wynika stąd, że w regulacji uwalniania neuromediatorów biorą udział i inne kanały, na przykład kanały P. Ich ligand, ω -agatoksyna IVA, również tylko częściowo hamuje napływ Ca^{2+} do synaptosomów i uwalnianie neuromediatora; łączne zahamowanie kanałów N i P powoduje znacznie silniejszy blok neurotransmisji i uwalniania neuromediatora. Dopiero inne, mniej swoiste inhibitory, zwłaszcza ω -grammotoksyna (TURNER i współaut. 1995) czy Ni^{2+} (SOONG i współaut. 1993), hamują całkowicie wapnionależne procesy związane z przekazywaniem synaptycznym. Wszystko to wskazuje, że w uwalnianiu neuromediatora z synapsy odgrywają rolę przynajmniej trzy typy kanałów, N, P i R. Kanały L (klasy C i D) nie biorą bezpośrednio udziału w uwalnianiu neurotransmitera z synapsy.

Wydaje się, że pogląd, w myśl którego kanały wapniowe i miejsca uwalniania neuromediatora z pęcherzyka znajdują się w bezpośredniej styczności i tworzą kompleks, jest nie do obalenia. Z jednej strony wskazują na to wyniki badań morfologicznych, z drugiej — fakt szybkości reakcji uwalniania neuromediatora: następuje ono 0,2 ms po rozpoczęciu napływu Ca^{2+} , a ponieważ rozprzestrzenianie się jonów w synapsie jest ograniczone szybkością dyfuzji, oznacza to, że odległość pomiędzy miejscem napływu Ca^{2+} a egzocytozy nie przekracza 100 nm. Dalszym dowodem kolokalizacji kanałów wapniowych i miejsc uwalniania jest to, że stężenie Ca^{2+} , potrzebne do inicjacji uwalniania, musi być bardzo wysokie, co najmniej 20 μM . Takie stężenie może być osiągnięte tylko bardzo blisko miejsca wnikania Ca^{2+} czyli poru w kanale. Koncepcja domeny jonowej (SMITH i AUGUSTINE 1988) zakłada, że stężenie neuroprzekaźnika jest bardzo wyso-

kie przy porze i gwałtownie spada z odległością. Domena jonowa pojedynczego kanału rozciąga się tylko na ułamki mikrometra, ale mogą istnieć skupiska kanałów i wówczas domena jest wyznaczona wielkością skupiska. Domena powstaje i znika w ciągu mikrose-

kund i zmienia się wraz z fluktuacją kanału. Obliczenia wskazują, że dla uwolnienia jednego pęcherzyka potrzeba około 190 kanałów. Model, w którym kanał typu N jest częścią składową mechanizmu uwalniającego neuromediator przedstawia rycina 7.



Ryc. 7. Kompleks uwalniający neuromediator do szczeliny synaptycznej. Kanał wapniowy typu N po otwarciu otoczony jest domeną wapniową, w której na przestrzeni około 30 nm stężenie Ca^{2+} spada z 100 do 10 μM . Kanał zawiera miejsce zakotwiczenia, do którego przyłącza się (dokuje) pęcherzyk synaptyczny. Jony Ca^{2+} powodują uruchomienie białkowego mechanizmu prowadzącego do egzocytozy i uwolnienia neuromediatora z pęcherzyka (STANLEY 1997).

ZAKOŃCZENIE

Wapń to pierwiastek niezbędny dla życia, ale również bardzo niebezpieczny, i dla żywego organizmu jego wykorzystanie jest zawsze igraniem z ogniem (zresztą w końcu zawsze z fatalnym skutkiem dla osobnika). Stąd jego napływ do komórki musi być ściśle regulowany; jest rzeczą zdumiewającą, jak elastyczną jest ta regulacja. Elastyczność ta powstała w toku ewolucji przez stosunkowo niewielkie zróżnicowanie podjednostek α_1 , determinujących charakterystykę kanału. Dalsze subtelne regulacje związane są ze zmiennością podjednostki β . W rezultacie organizm dysponuje całą gamą kanałów wapniowych dostosowanych do różnych potrzeb. Co więcej, kanały te współistnieją i współpracują ze sobą we wszystkich komórkach pobudliwych, regulując liczne funkcje Ca^{2+} . Na dodatek są regulowane w sposób pośredni przez neuromediatory, które uwalniają z kompleksów receptorów metabotropowych podjednostki $\text{G}\beta\gamma$, modyfikujące oddziaływania pomiędzy podjednostkami α_1 i β kanałów wapniowych.

Ze względu na rozmiar artykułu nie wspomniano tu o wielu innych ważnych procesach regulacyjnych, jak na przykład regulacji kanałów wapniowych w substancji szarej okołowodociągowej przez receptory opioidowe μ (KIM i współaut. 1997), co może mieć bardzo istotne znaczenie dla regulacji bólu, w której zarówno opioidy, jak i Ca^{2+} (ROSS i CARDENOS 1979) od-

grywają kluczowe role. Nie omówiliśmy też istotnej roli białek pęcherzykowych współdziałających z kanałami wapniowymi w procesie egzocytozy neuromediatora (SHENG i współaut. 1996).

Zupełnie na uboczu pozostawiliśmy interesujące zagadnienie napływu Ca^{2+} do komórki przez kanały sterowane ligandem, zwłaszcza kanały NMDA. Równie ciekawe są kanały wapniowe w magazynach wewnątrzkomórkowych, zwłaszcza w siateczce endoplazmatycznej, regulujące tworzenie wspomnianych we wstępie fal wapniowych (EHRlich i współaut. 1994) a także regulowanie kanałów błonowych przez poziom Ca^{2+} w cytozolu (PUTNEY 1986).

Na zakończenie można się zastanowić, czy taka różnorodność kanałów wapniowych powstała wyłącznie w wyniku presji czynników wewnętrznych, czy też może istniała również jakaś zewnętrzna tego przyczyna. Można bowiem przypuszczać, że zaangażowanie kilku typów kanałów wapniowych w neurotransmisję i uniknięcie w ten sposób pewnego monopolu jednej struktury jest wykształconym w procesie ewolucji wentylem bezpieczeństwa. Wiadomo bowiem, że jady wielu bezkręgowców: drapieżnych owadów, pajęczaków i mięczaków, zawierają silne blokery kanałów wapniowych. Zróżnicowanie tych kanałów powoduje, że toksyna jednego napastnika nie musi powodować fatalnych skutków dla napadniętej ofiary.

CALCIUM AND VOLTAGE-DEPENDENT CALCIUM CHANNELS

Summary

In the course of evolution calcium assumed a position of the element that is necessary but also very dangerous for the living cell. To enable calcium to play the role of a signal in the cell and to prevent its toxic effects, the intracellular Ca^{2+} concentrations must be very low and strictly controlled. The important components of the control system are voltage-dependent (VD) Ca^{2+} channels, regulating Ca^{2+} entry to the cell depending on the membrane potential. The channels are heterooligomers consisting of five subunits; the subunit α_1 that forms the channel pore, shows the greatest diversity and determines the physiological, electrophysiological and pharmacological properties of the channel. Although the α_1 subunit may alone act as a Ca^{2+} channel, its activity is strongly enhanced by binding of the β subunit.

The VD Ca^{2+} channels are presently classified as low-voltage and high-voltage. The low-voltage channels are T channels, playing an important role in the oscillatory electrophysiological action of neurons. The high-voltage chan-

nel group includes L, N, P, and Q channels that are pharmacologically distinguished by their specific ligands: dihydropyridines (L), ω -conotoxin GVIA (N), ω -agatoxin IVA (P), ω -conotoxin MVIIc (Q), and R channels that are resistant to specific organic ligands. L channels play an important role in generation of action potentials and refilling of Ca^{2+} intracellular stores. They also control the expression of genes, and their blocking seems to inhibit various adaptive responses. N and P channels are involved in release of neurotransmitters from synaptic vesicles into the synaptic cleft; Q and R channels cooperate with the other channels to permit fine tuning of electrophysiological activity of the neuron. VD Ca^{2+} channels are controlled indirectly by neurotransmitters such as $\beta\gamma$ subunits of $\text{G}_{o/1}$ proteins dissociating during metabotropic receptor activation, which modulate the activity of the channels by competing for the sites of binding of α_1 and β subunits of the Ca^{2+} channel.

LITERATURA

- ANTKIEWICZ-MICHALUK L., MICHALUK J., ROMAŃSKA I., VETULANI J., 1990a. Cortical dihydropyridine binding sites and a behavioral syndrome in morphine-abstinent rats. *Eur. J. Pharmacol.* 180, 129-135.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK L., MICHALUK J., ROMAŃSKA I., VETULANI J., 1990b. Effect of repetitive electroconvulsive treatment on sensitivity to pain and on [3H]nitrendipine binding sites in cortical and hippocampal membranes. *Psychopharmacology* 101, 240-243.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK L., MICHALUK J., VETULANI J., 1994. Modification of effects of chronic electroconvulsive shock by voltage-dependent Ca^{2+} channel blockade with nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* 254, 9-16.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK L., ROMAŃSKA I., MICHALUK J., VETULANI J., 1991. Role of calcium channels in effects of antidepressant drugs on responsiveness to pain. *Psychopharmacology* 105, 269-274.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK L., MICHALUK J., ROMAŃSKA I., VETULANI J., 1993. Reduction of morphine dependence and potentiation of analgesia by chronic co-administration of nifedipine. *Psychopharmacology* 111, 457-464.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK L., ROMAŃSKA I., VETULANI J., 1998. Ca^{2+} channel blockade prevents lysergic acid diethylamide-induced changes in dopamine and serotonin metabolism. *Eur. J. Pharmacol.*
- ANTKIEWICZ-MICHALUK L., KAROLEWICZ B., MICHALUK J., VETULANI J., 1995. Difference between haloperidol- and pimozide-induced withdrawal syndrome: a role for Ca^{2+} channels. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 459-467.
- ARMSTRONG D. L., 1989. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca^{2+} -activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci.* 12, 117-122.
- BADING H., GINTY D. D., GREENBERG M. E., 1993. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260, 181-186.
- BEAN B. P., 1989. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340, 153-156.
- BERNHEIM L., BEECH D. J., HILLE B., 1991. A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron* 6, 859-867.
- BERTOLINO M., LLINÁS R. R., 1992. The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32, 399-421.
- BHATTACHARJEE A., WHITEHURST R. M. JR, ZHANG M., WANG L., LI M., 1997. T-type calcium channels facilitate insulin secretion by enhancing general excitability in the insulin-secreting β -cell line, INS-1. *Endocrinology* 138, 3735-3740.
- BITON B., GODET D., GRANGER P., AVENET P., 1997. R- and L-type Ca^{2+} channels are insensitive to eliprodil in rat cultured cerebellar granule neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 323, 277-281.
- BOLAND L. M., BEAN B. P., 1993. Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J. Neurosci.* 13, 516-533.
- BOURQUE C. W., 1990. Intraterminal recordings from the rat neurohypophysis in vitro. *J. Physiol. (London)* 421, 247-262.
- BROWN A. M., BIRNBAUER T., 1988. Direct G protein gating of ion channels. *Am. J. Physiol.* 354, H401-H410.
- CALLEWAERT G., HANBAUER I., MORAD M., 1989. Modulation of calcium channels in cardiac and neuronal cells by an endogenous peptide. *Science* 243, 663-666.
- CAMPBELL K. P., LEUNG A. T., SHARP A. H., 1988. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* 11, 425-430.
- CATTERALL W. A., 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242, 50-61.
- CHENG H., LEDERER W., CANNEL M. B., 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 740-744.

- CLOUES R. K., TAVALLIN S. J., MARRION N. V., 1997. β -adrenergic stimulation selectively inhibits long-lasting L-type calcium channel facilitation in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 17, 6493-6503.
- COHEN M. W., JONES O. T., ANGELIDES K. J., 1991. Distribution of Ca^{2+} channels on frog motor nerve terminals revealed by fluorescent ω -conotoxin. *J. Neurosci.* 11, 1032-1039.
- DUNLAP K., FISCHBACH G. D., 1981. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J. Physiol. (London)* 317, 519-535.
- DUNLAP K., LUEBKE J. I., TURNER T. J., 1995. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 18, 89-98.
- ELLINOR P. T., ZHANG J. F., RANDALL A. D., ZHOU M., SCHWARZ T. L., TSIEH R. W., HORNE W. A., 1993. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature* 363, 455-458.
- EHRICH B. E., KAFTAN E., BEZPROZVANNYA S., BEZPROZVANNY I., 1994. The pharmacology of intracellular Ca^{2+} -release channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 145-149.
- FISHER T. E., BOURQUE C. W., 1996. Calcium-channel subtypes in the somata and axon terminals of magnocellular neurosecretory cells. *Trends Neurosci.* 19, 440-444.
- FOSSET M., JAIMOVICH E., DELPONT E., LAZDUNSKI M., 1983. 3H -Nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 258, 6086-6092.
- FOX A. P., NOWYCKY M. C., TSIEH R. W., 1987a. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol. (London)* 394, 149-172.
- FOX A. P., NOWYCKY M. C., TSIEH R. W., 1987b. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Physiol. (London)* 394, 173-200.
- HAGIWARA S., OZAWA S., SAND O., 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 65, 617-644.
- HERLITZE S., GARCIA D. E., MACKIE K., HILLE B., SCHEUER T., CATTERALL W. A., 1996. Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein β subunits. *Nature* 380, 258-262.
- HESCHELER J., SCHULTZ G., 1997. G-proteins involved in the calcium channel signaling system. *Cur. Opin. Neurobiol.* 3, 360-367.
- HILAIRE C., DIOCHOT S., DESMADRYL G., BALDY-MOULINIER M., RICHARD S., VALMIER J., 1996. Opposite developmental regulation of P- and Q-type calcium currents during ontogenesis of large diameter mouse sensory neurons. *Neuroscience* 75, 1219-1229.
- HILLE B., 1994. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 17, 531-536.
- HILLMAN D., CHEN S., AUNG T. T., CHERKSEY B., SUGIMORI M., LLINÁS R. R., 1991. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7076-7080.
- HORNE A. L., KEMP J. A., 1991. The effect of omega-conotoxin GVIA on synaptic transmission within the nucleus accumbens and hippocampus of the rat in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1733-1739.
- IKEDA S. R., 1996. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channel by G-protein β subunits. *Nature* 380, 255-258.
- JONES O. T., BERNSTEIN G. M., JONES E. J., JUGLOFF D. G., LAW M., WONG W., MILLS L. R., 1997. N-Type calcium channels in the developing rat hippocampus: subunit, complex, and regional expression. *J. Neurosci.* 17, 6152-6164.
- KERR L. M., YOSHIKAMI D., 1984. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* 308, 282-284.
- KIM C. J., RHEE J. S., AKAIKE N., 1997. Modulation of high-voltage activated Ca^{2+} channels in the rat periaqueductal gray neurons by mu-type opioid agonist. *J. Neurophysiol.* 77, 1418-1424.
- KUZMIN A., SEMENOVA S., RAMSEY N. F., ZVARTAU E. E., VAN REE J. M., 1996. Modulation of cocaine intravenous self-administration in drug-naive animals by dihydropyridine Ca^{2+} channel modulators. *Eur. J. Pharmacol.* 295, 19-25.
- LIPP P., BOOTMAN M. D., 1997. To quark or to spark, that is the question. *J. Physiol.* 502, 1.
- LIPP P., NIGGLI E., 1996. A hierarchical concept of cellular and subcellular Ca^{2+} -signaling. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 65, 265-296.
- LLINÁS R., JAHNSEN H., 1982. Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro. *Nature* 297, 406-408.
- LLINÁS R., SUGIMORI M., LIN J. W., CHERKSEY B., 1989. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1689-1693.
- LLINÁS R., YAROM Y., 1981. Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. *J. Physiol. (London)* 315, 569-584.
- LLINÁS R. R., 1988. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242, 1654-1664.
- MAMCZARZ J., KAROLEWICZ B., ANKIEWICZ-MICHALUK L., VETULANI J., 1994. Co-administration of nifedipine with neuroleptics prevents development of activity changes during withdrawal. *Pol. J. Pharmacol.* 46, 75-77.
- MILLER R. J., 1987. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235, 46-52.
- MURPHY T. H., WORLEY P. F., BARABAN J. M., 1991. L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7, 625-635.
- NOWYCKY M. C., FOX A. P., TSIEH R. W., 1985b. Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2178-2182.
- NOWYCKY M. C., FOX A. P., TSIEH R. W., 1985a. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440-443.
- OLIVERA B. M., GRAY W. R., ZEIKUS R., MCINTOSH J. M., VARGA J., RIVIER J., DE SANTOS V., CRUZ L. J., 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230, 1338-1343.
- PANZA G., GREBB J. A., SANNA E., WRIGHT A. G. JR, HANBAUER I., 1985. Evidence for down-regulation of 3H -nitrendipine recognition sites in mouse brain after long-term treatment with nifedipine or verapamil. *Neuropharmacology* 24, 1113-1117.
- PEREZ-REYES E., KIM H. S., LACERDA A. E., HORNE W., WEI X. Y., RAMPE D., CAMPBELL K. P., BROWN A. M., BIRN-

- BAUMER L., 1989. Induction of calcium currents by the expression of the $\alpha 1$ -subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 340, 233–236.
- PLUMMER M. R., HESS P., 1991. Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels. *Nature* 351, 657–659.
- PLUMMER M. R., LOGOTHETIS D. E., HESS P., 1989. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* 2, 1453–1463.
- PUTNEY J. W. JR., 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1–12.
- QIN N., PLATANO D., OLCESE R., STEFANI E., BIRNBAUMER L., 1997. Direct interaction of $G\beta\gamma$ with a C-terminal $G\beta\gamma$ -binding domain of the Ca^{2+} channel α subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8866–8871.
- RENAUD L. P., BOURQUE C. W., 1991. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog. Neurobiol.* 36, 131–169.
- RICHARDSON C. M., DOWDALL M. J., GREEN A. C., BOWMAN D., 1995. Novel pharmacological sensitivity of the presynaptic calcium channels controlling acetylcholine release in skate electric organ. *J. Neurochem.* 64, 944–947.
- RINGER S., 1883. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contractions of the heart. *J. Physiol. (London)* 4, 29–42.
- ROSS D. H., CARDENOS H. L., 1979. Nerve cell calcium as a messenger for opiate and endorphin actions. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 20, 301–336.
- RUBIN R. P., 1985. Historical and biological aspects of calcium action. [W:] R. P. RUBIN, G. B. WEISS, J. W. JR. PUTNEY (red.), *Calcium in Biological Systems*. Plenum Press, New York, 5–11.
- SANNA E., HANBAUER I., 1987. Isolation from rat brain tissue of an inhibiting activity for dihydropyridine binding sites and voltage-dependent Ca^{2+} uptake. *Neuropharmacology* 26, 1811–1814.
- SATHER W. A., TANABE T., ZHANG J. F., MORI Y., ADAMS M. E., TSIEH R. W., 1993. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (B1) calcium channel $\alpha 1$ subunits. *Neuron* 11, 291–303.
- SHENG Z. H., RETTIG J., COOK T., CATTERALL W. A., 1996. Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature* 379, 451–454.
- SINTON C. M., KROSSER B. I., WALTON K. D., LLINÁS R. R., 1989. The effectiveness of different isomers of octanol as blockers of harmaline-induced tremor. *Pflugers Arch.* 414, 31–36.
- SMITH S. J., AUGUSTINE G. J., 1988. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci* 11, 458–464.
- SOONG T. W., STEA A., HODSON C. D., DUBEL S. J., VINCENT S. R., SNUTCH T. P., 1993. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260, 1133–1136.
- STANLEY E. F., 1997. The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci.* 20, 404–409.
- STEA A., SOONG T. W., SNUTCH T. P., 1994. Voltage-gated calcium channels. [W:] R. A. NORTH (red.), *Ligand and Voltage-Gated Ion Channels*. CRC Press, Boca Raton, 113–151.
- STRAUSS O., MERGLER S., WIEDERHOLT M., 1997. Regulation of L-type calcium channels by protein tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells. *FASEB J.* 11, 859–867.
- STRUBING C., ROHWEDER J., AHNERT-HILGER G., WIEDENMANN B., HESCHELER J., WOBUS A. M., 1997. Development of G protein-mediated Ca^{2+} channel regulation in mouse embryonic stem cell-derived neurons. *Eur. J. Neurosci.* 9, 824–832.
- TAMURA N., YOKOTANI K., OKUMA Y., OKADA M., UENO H., OSUMI Y., 1995. Properties of the voltage-gated calcium channels mediating dopamine and acetylcholine release from the isolated rat retina. *Brain Res.* 676, 363–370.
- TANG C. M., PRESSER F., MORAD M., 1988. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 240, 213–215.
- TORRI TARELLI F., PASSAFARO M., CLEMENTI F., SHER E., 1991. Presynaptic localization of ω -conotoxin-sensitive calcium channels at the frog neuromuscular junction. *Brain Res.* 547, 331–334.
- TOTTENE A., MORETTI A., PIETROBON D., 1996. Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *J. Neurosci.* 16, 6353–6363.
- TURNER T. J., LAMPE R. A., DUNLAP K., 1995. Characterization of presynaptic calcium channels with omega-conotoxin MVIIC and omega-granmotoxin SIA: role for a resistant calcium channel type in neurosecretion. *Mol. Pharmacol.* 47, 348–353.
- VARADI G., LORY P., SCHULTZ D., VARADI M., SCHWARTZ A., 1991. Acceleration of activation and inactivation by the β subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 352, 159–162.
- VARADI G., MORI Y., MIKALA G., SCHWARTZ A., 1995. Molecular determinants of Ca^{2+} channel function and drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 43–49.
- VETULANI J., 1995. Wapń jako wtórny przekaźnik informacji. [W:] L. KONARSKA (red.), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*. PWN Warszawa, 154–176.
- WHEELER D. B., RANDALL A., TSIEH R. W., 1994. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264, 107–111.
- ZHANG J.-F., RANDALL A. D., ELLINOR P. T., HORNE W. A., SATHER W. A., TANABE T., SCHWARTZ T. L., TSIEH R. W., 1993. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32, 1075–1088.