

WIESŁAWA LEŚNIAK

Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: wiesles@nencki.gov.pl

## KANAŁY UWALNIAJĄCE JONY WAPNIA Z BŁON WEWNĘTRZNYCH

### WSTĘP

Wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie stanowi podstawowy sygnał inicjujący szereg reakcji w komórce. Wzrost ten może być wynikiem dwóch procesów: napływu do cytoplazmy jonów wapnia z zewnątrz komórki poprzez kanały wapniowe w błonie plazmatycznej oraz rezultatem uwalniania wapnia z przestrzeni endoplazmatycznego retikulum (ER). W wielu typach komórek przeważającą frakcję puli jonów wapnia uwalnianych do cytoplazmy pod wpływem pobudzenia stanowi wapń zmagazynowany w ER, a wapń napływający z zewnątrz komórki służy do uzupełniania tych magazynów.

Kanały odpowiedzialne za uwalnianie wapnia z wnętrza sarkoplazmatycznego retikulum (SR) mięśni sercowego i szkieletowego zostały zidentyfikowane dokładnie 10 lat temu (INUI i współaut. 1987, IMAGAWA i współaut. 1987) jako ostatnie z podstawowych ogniw komórkowej homeostazy wapnia obok wcześniej poznanej  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy, usuwającej wapń z cytoplazmy na zewnątrz komórki,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy, transportującej jony wapnia z cytoplazmy do przestrzeni ER oraz zależnych od potencjału kanałów w błonie plazmatycznej, przez które w chwili pobudzenia komórki jony wapnia napływają do cytoplazmy (CARAFOLI 1987). Niezwykle pomocny w określeniu lokalizacji, identyfikacji i oczyszczeniu białek kanałów wapniowych okazał się neutralny alkaloid roślinny rianodyna, który moduluje proces uwalniania wapnia z ER komórek mięśniowych (MEISSNER 1986). Dlatego najczęściej spotykaną w literaturze nazwą tego typu kanału jest nazwa re-

ceptor rianodynowy, w skrócie RyR. Wkrótce potem zidentyfikowano białko odpowiedzialne za uwalnianie wapnia z endoplazmatycznego retikulum komórek niepobudliwych (SUPPATA-PONE i współaut. 1988). Ponieważ uwalnianie jonów wapnia z retikulum tych komórek jest zależne od działania trójfosforanu inozytolu ( $\text{IP}_3$ ), powszechnie przyjętą nazwą tego typu kanałów jest nazwa receptor  $\text{IP}_3$ , w skrócie  $\text{IP}_3\text{R}$ . Receptory rianodynowe i receptory  $\text{IP}_3$  stanowią zatem dwa typy wewnątrzkomórkowych kanałów odpowiedzialnych za mobilizację jonów wapnia. W błonie retikulum niektórych wyspecjalizowanych komórek, na przykład mięśni szybkich, są obecne tylko kanały wapniowe typu RyR, w innych, na przykład oocytach żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) wyłącznie receptory  $\text{IP}_3$ . Najczęściej jednak w komórce są obecne obydwa typy kanałów, przy czym wydają się one kontrolować oddzielne, jakkolwiek współzależne pule wewnątrzkomórkowego wapnia (BERRIDGE 1993). Chociaż różny jest sygnał wywołujący otwarcie obu typów kanałów, to jednak zasadniczy schemat ich budowy, wynikający z pełnienia analogicznej funkcji, jest taki sam, a równocześnie zupełnie różny od budowy kanałów transportujących jony wapnia w błonie plazmatycznej. Poniżej zostanie omówiona struktura i regulacja aktywności kanałów uwalniających wapń z przestrzeni retikulum, zarówno wrażliwych na rianodynę jak i  $\text{IP}_3$  z zaznaczeniem ich strukturalnych i funkcjonalnych różnic i podobieństw.

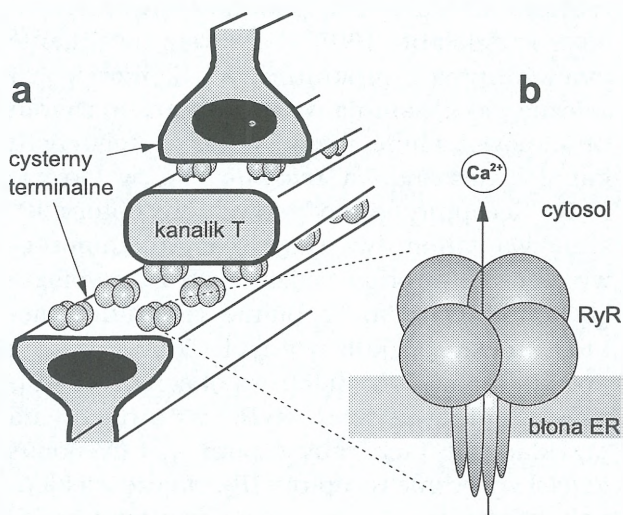
### BUDOWA KANAŁÓW UWALNIAJĄCYCH JONY WAPNIA

Receptory rianodynowe to duże białka liczące około 5000 aminokwasów, o masie cząsteczkowej ponad 500 kDa, występujące w

postaci tetramerów, które po oczyszczeniu i rekonstytucji w błonie wykazują funkcjonalne właściwości kanałów wapniowych (INUI i



współaut. 1987, IMAGAWA i współaut. 1987). Dotychczas zidentyfikowano 3 izoformy receptorów rianodynowych: RyR1 — izoforma właściwa dla mięśni szkieletowych, RyR2 — izoforma typowa dla mięśnia sercowego, ale występująca również w komórkach różnych rejonów mózgu oraz izoforma RyR3, zidentyfikowana najpierw w komórkach nerwowych, ale występująca również w mięśniach gładkich (MEISSNER 1994). Badania mikroskopowe pierwszych oczyszczonych preparatów receptora rianodynowego z SR mięśnia sercowego (INUI i współaut. 1987) wykazały, że obraz ich jest identyczny z mikroskopowym obrazem „feet” — białkowych struktur o poczwórnej symetrii obecnych w błonie cystern terminalnych SR i łączących je, poprzez rozbudowaną domenę hydrofilową, z błonami kanalików T (rys.1) (FERGUSON i współaut. 1984). A zatem



Rys. 1. Schemat a) połączenia cystern terminalnych SR i kanalików T w obrębie triady, z zaznaczeniem położenia RyR i kanałów transportujących wapń w błonie plazmatycznej; b) tetramerycznej struktury RyR.

te widoczne pod mikroskopem struktury stanowią morfologiczny odpowiednik kanałów wapniowych w retikulum. Uzyskane wkrótce sekwencje DNA trzech różnych izoform tego białka (TAKESHIMA i współaut. 1989, ZORZATO i współaut. 1990, NAKAI i współaut. 1990, OHTSU i współaut. 1990, HAKAMATA i współaut. 1992) pozwoliły na opracowanie, w oparciu o wykres hydropatii, hipotetycznej struktury kanału — homotetrameru z niewielką domeną hydrofobową, tworzącą właściwy kanał błonowy i rozbudowaną domeną hydrofilową skierowaną do cytoplazmy, a więc obraz analogiczny do obrazu mikroskopowego „feet” (rys.1). Taki ogólny plan budowy okazał się

wspólny dla wszystkich izoform RyR, a także dla receptorów  $IP_3$ .

Receptory  $IP_3$ , przy zachowaniu przedstawionego wyżej ogólnego planu budowy, są białkami o niższej masie cząsteczkowej wynoszącej, w zależności od izoformy, 230–260 kDa co odpowiada około 2 600–2 800 resztom aminokwasowym (TAYLOR i TRAYNOR 1995). Poznano dotychczas pełne sekwencje trzech izoform receptorów  $IP_3$ , a możliwe jest istnienie dalších, kodowanych bądź przez oddzielne geny, lub powstałych w wyniku różnego składania pierwotnego transkryptu. Izofорма  $IP_3R$  I przeważa w tkance nerwowej, a izoformy II i III w innych tkankach, przy czym w jednym typie komórki mogą występować różne izoformy  $IP_3R$  (JOSEPH 1996). Receptory  $IP_3$  znaleziono nie tylko w błonach ER, ale również w błonach granul sekrecyjnych oraz w zewnętrznej i wewnętrznej błonie jądrowej.

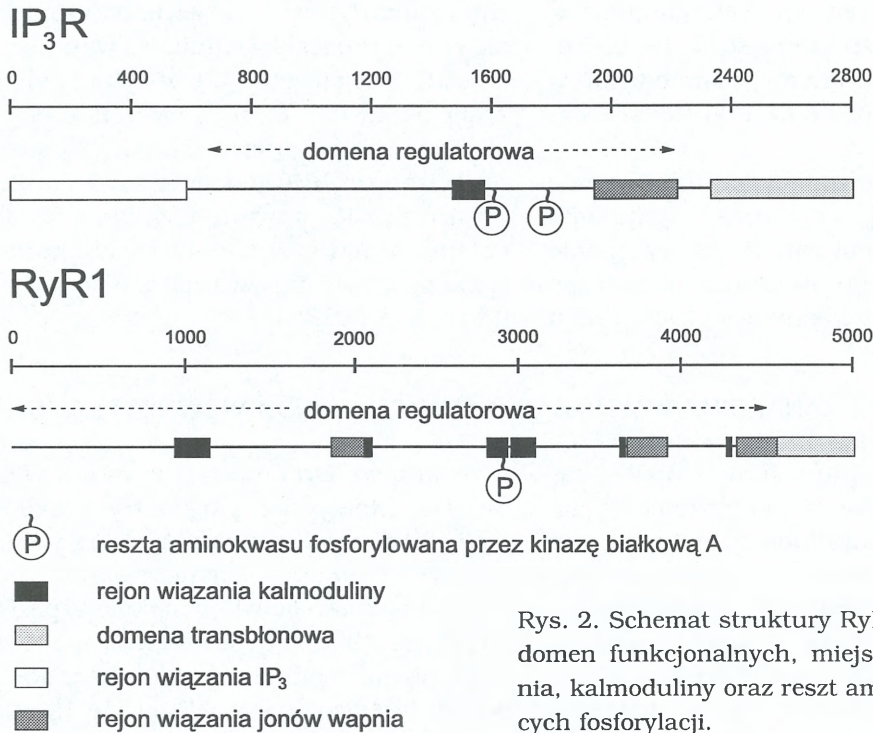
W tworzeniu domeny hydrofobowej obu typów receptorów uczestniczy kilkaset aminokwasów zlokalizowanych na C-końcu łańcucha polipeptydowego i stanowiących tylko około 10% całej cząsteczki białka. Na podstawie wykresów hydropatii proponowano istnienie w tej części białka od 4 do 12 segmentów transmembranowych, przy czym ostatnie dane wskazują na liczbę 6 takich segmentów (TUNWELL i współaut. 1996, MICHIKAWA i współaut. 1994). Ta część białka zachowała najwięcej podobieństw pomiędzy różnymi izoformami; znamienne jest również znaczne (> 50%) podobieństwo sekwencji domniemanej domeny transmembranowej M6 w  $IP_3R$  i domeny M4 w receptorze rianodynowym.

Analiza sekwencji aminokwasowej hydrofilowej domeny różnych izoform kanałów uwalniających wapń, zarówno receptorów rianodiny, jak i  $IP_3$  wskazała na istnienie tak zwanych rejonów regulatorowych czyli funkcjonalnych domen zawierających potencjalne miejsca wiązania czynników uczestniczących w regulacji aktywności kanału, takich jak jony wapnia, nukleotydy, kalmodulina, jak również potencjalne miejsca ulegające fosforylacji. W receptorach  $IP_3$  wyróżnia się liczącą 576 aminokwasów N-kończącą domenę wiążącą ligand — trójfosforan inozytolu (NEWTON i współaut. 1994) i centralnie położoną domenę regulatorową, w której zidentyfikowano miejsca ulegające fosforylacji przez kinazy oraz potencjalne rejony uczestniczące w wiązaniu jonów wapnia i kalmoduliny (rys 2) (JOSEPH 1996). Analogiczny rejon regulatorowy istnieje również w receptorach rianodynowych. W sekwencji do-



men regulatorowych obserwuje się rejony o dużej homologii pomiędzy izoformami, jak również odcinki o dużej zmienności. Te ostatnie mogą być odpowiedzialne za obserwowane

*in vitro* funkcjonalne różnice pomiędzy poszczególnymi izoformami obu typów receptorów, na przykład w aktywacji czy wrażliwości na niektóre czynniki.



Rys. 2. Schemat struktury  $RyR$  i  $IP_3R$  z zaznaczeniem domen funkcyjnych, miejsc wiązania jonów wapnia, kalmoduliny oraz reszt aminokwasowych ulegających fosforylacji.

#### AKTYWACJA KANAŁÓW UWALNIAJĄCYCH WAPŃ Z BŁON WEWNĘTRZNYCH

Otwarcie kanałów wapniowych w błonie retikulum i wypływ jonów wapnia z przestrzeni wewnątrzkomórkowych następuje w odpowiedzi na pochodzący z zewnątrz sygnał, czy to w postaci depolaryzacji błony, czy też wywołany wiązaniem agonisty do receptora na błonie plazmatycznej. Przekazywanie tego sygnału do retikulum zachodzi w różny sposób w różnych typach komórek i jest ściśle skorelowane z występowaniem w nich określonego typu i izoformy kanału. Aktywacja kanałów wapniowych typu  $RyR$  dokonuje się pod wpływem jonów wapniowych. Pierwsze obserwacje świadczące o tym, że niewielki wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie może wywołać szybkie uwalnianie wapnia z ER przeprowadzono na mięśniach i dały one początek hipotezie „indukowanego przez wapń uwalniania wapnia” tak zwanej CIRC (ang.  $Ca^{2+}$ -induced calcium release) (ENDO i współaut. 1970), jako mechanizmu odpowiedzialnego za wzrost stężenia  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie i aktywację skurczu mięśnia. Zgodnie z tą hipotezą w komórkach pobudliwych pewien, minimalny nawet, wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie, powstały w rezultacie otwarcia zależnych od potencjału błonowego

kanałów wapniowych w błonie plazmatycznej, powoduje uwalnianie wapnia z retikulum. Późniejsze badania z użyciem oczyszczonych i rekonstruowanych preparatów  $RyR$  w pełni potwierdziły tę hipotezę wykazując, że otwarcie kanałów zachodzi pod wpływem bezpośredniej interakcji jonów wapnia z białkiem kanału wapniowego. W mięśniach szkieletowych sygnał prowadzący do otwarcia magazynów wapnia w SR osiągnął jeszcze wyższy stopień efektywności i zmienił charakter z chemicznego, pod postacią jonów wapniowych, na mechaniczny. W mięśniach tych terminalne cysterny SR są w bliskim kontakcie z błoną kanalików T, stanowiących inwaginację błony plazmatycznej, tworząc tak zwane triady (rys. 1). Jak wykazano zmiana konformacji białka kanału wapniowego w błonie kanalików T, zachodząca pod wpływem depolaryzacji, jest w sposób bezpośredni przekazywana na białko kanału wapniowego w błonie cystern terminalnych (LU i współaut. 1994). Taki typ aktywacji jest właściwy wyłącznie dla izoformy  $RyR1$  kanału wapniowego, którego każda podjednostka może być związana z jedną cząsteczką zależnego od potencjału kanału wapniowe-



go w błonie kanalikula T (LU i współaut. 1994). Otwarcie kanałów wapniowych w SR mięśni szybkich zachodzi zatem niezależnie od napływu jonów wapnia przez kanały w błonie plazmatycznej; wapń spełnia prawdopodobnie tylko wtórną rolę aktywacji tych kanałów w błonie SR, które nie znajdują się w bezpośrednim kontakcie z kanałami wapniowymi w błonie kanalikula T (FLUCHER i FRANZINI-ARMSTRONG 1996).

Jakkolwiek jony wapnia modulują kanały wapniowe typu  $IP_3R$ , to jednak czynnikiem niezbędnym do otwarcia kanału jest związanie cząsteczki trójfosforanu inozytolu pełniącego funkcję wtórnego przekaźnika w komórkach

niepobudliwych. Działanie agonisty na receptor w błonie plazmatycznej, związany z białkiem G lub kinazą tyrozynową, powoduje aktywację fosfolipazy C, hydrolizę 4,5-dwufosforanu fosfatydyloinozytolu i powstanie 1,4,5 - trójfosfoinozytolu —  $IP_3$  (BERRIDGE 1993). Do aktywacji procesu uwalniania wapnia z ER konieczne jest stężenie  $IP_3$  w cytoplazmie wynoszące około  $10^{-6}$  M, przy czym istnieją znaczące różnice w powinowactwie do  $IP_3$  poszczególnych izoform  $IP_3R$  (NEWTON i współaut. 1994). Związanie  $IP_3$  wywołuje zmianę konformacji receptora powiązaną z otwarciem kanału i aktywacją procesu uwalniania jonów wapnia (BERRIDGE 1993).

### WŁAŚCIWOŚCI KANAŁÓW UWALNIAJĄCYCH WAPŃ Z BŁON WEWNĘTRZNYCH

Funkcjonalne receptory rianodynowe i zależne od  $IP_3$  mają postać homotetramerów, ale nie wiadomo, czy kanał błonowy jest utworzony z hydrofobowych domen transmembranych czterech tworzących go podjednostek, czy też każda podjednostka tworzy osobny funkcyjalny kanał. Za tą ostatnią hipotezę przemawia, często obserwowane w doświadczeniach nad przewodnictwem kanałów, występowanie 3–4 podstanów przewodzenia. Wiadomo natomiast, że w odróżnieniu od plazmatycznych kanałów wapniowych zależnych od potencjału, białka te tworzą szeroką przesłannę kanałową, przez którą przechodzić mogą jony magnezu oraz duże kationy organiczne, na przykład Tris czy TEA. Inną charakterystyczną cechą kanałów wapniowych w błonach endoplazmatycznego retikulum jest ich niewielka selektywność wobec kationów dwu- i jednowartościowych sprawiająca, że w warunkach *in vitro* możliwy jest również wydajny transport jonów  $Na^+$  i  $K^+$  (BEZPROZVANNY i EHRLICH 1994). W odróżnieniu jednak od sytuacji na błonie plazmatycznej, oddzielającej dwa środowiska o zupełnie różnym składzie jonowym, wapń jest jedynym jodem o znacznej różnicy potencjału elektrochemicznego po obu stronach błony ER, zatem pomimo braku selektywności jest jedynym jodem transportowa-

nym *in vivo*. Oprócz tych zasadniczych podobieństw kinetyczne parametry kanałów typu RyR i  $IP_3R$  są ilościowo różne. Prąd jednostkowy płynący przez pojedynczy kanał RyR2 z SR mięśnia sercowego wynosi około 2 pA (TINKER i współaut. 1993) i jest czterokrotnie większy niż prąd płynący przez pojedynczy kanał zależny od  $IP_3$  (BEZPROZVANNY i EHRLICH 1994). Także czas otwarcia kanału jest różny i wynosi 20 ms dla kanału RyR2 i 3,7 ms dla kanału zależnego od  $IP_3$ , co sprawia, że podczas każdego otwarcia kanału receptora rianodynowego przepływa przezeń około 20-krotnie więcej jonów wapnia niż przez kanały zależne od  $IP_3$ . Jeżeli uwzględnimy się również co najmniej kilkakrotnie niższe prawdopodobieństwo otwarcia kanału receptora  $IP_3$  w porównaniu z kanałem typu RyR to okaże się, że ten ostatni stanowi wielokrotnie bardziej wydajny system transportu jonów — system szczególnie istotny w tkankach pobudliwych, w których ten typ kanałów przeważa. Receptory  $IP_3$  pełnią funkcję w komórkach o dłuższym czasie reakcji, podczas gdy niektóre typy komórek, na przykład komórki nerwowe są wyposażone w oba typy kanałów, co prawdopodobnie zapewnia im dużą elastyczność reakcji na pobudzenie (BEZPROZVANNY i EHRLICH 1994).

### REGULACJA AKTYWNOŚCI KANAŁÓW UWALNIAJĄCYCH WAPŃ Z BŁON WEWNĘTRZNYCH

Proces uwalniania wapnia z ER jest wrażliwy na szereg czynników farmakologicznych, takich jak kofeina i rianodyna — specyficzni agonisci kanałów typu RyR, czy też heparyna

— inhibitor uwalniania jonów wapnia przez  $IP_3R$ . W komórce aktywność kanałów wapniowych w błonach ER znajduje się pod ścisłą kontrolą czynników endogennych, spośród



których wymienić należy stężenie jonów wapnia, magnezu, ATP, kalmodulinę i stopień fosforylacji białka kanałowego. Wszystkie wymienione czynniki działają poprzez bezpośrednią interakcję z receptorem, gdyż ich efekt obserwuje się również w badaniach wyizolowanych białek. Jest rzeczą charakterystyczną, że poszczególne izoformy obydwu typów receptorów wykazują charakterystyczne różnice we wrażliwości na działanie tych samych czynników. Wielość efektorów, które mogą wpływać na aktywność wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych świadczy o tym, jak wiele sygnałów może zostać przetworzonych w jednolity sygnał zmiany cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia (TAYLOR i TRAYNOR 1995). Poniżej omówione zostaną molekularne podstawy działania niektórych endogennych czynników i ich wpływ na proces uwalniania wapnia z ER.

#### EFEKT JONÓW WAPNIA

Stężenie jonów wapnia w cytoplazmie komórki stanowi podstawowy czynnik decydujący o aktywności kanałów uwalniających wapń z błon wewnętrznych. Krzywa aktywacji kanału wapniowego przez jony wapnia ma kształt krzywej dzwonowej. W przypadku izoformy RyR1 z SR mięśni szkieletowych aktywacja kanału następuje, gdy cytoplazmatyczne stężenie wapnia wzrasta powyżej  $0,01 \mu\text{M}$ , aż do  $20 \mu\text{M}$ ; powyżej tego stężenia kanał ulega stopniowej inaktywacji (MEISSNER i współaut. 1997). W przypadku receptorów  $\text{IP}_3$  krzywa ta jest przesunięta w stronę niższych stężeń i inhibicja kanału może zachodzić już przy  $0,3 \mu\text{M}$  stężeniu jonów wapnia (BERRIDGE 1993). Mechanizm taki zapewnia zatem samoregulację aktywności kanału poprzez sprzężenie zwrotne — wzrost stężenia jonów wapniowych, spowodowany ich wypływem z ER, powoduje stopniowe zamykanie kanałów i zahamowanie wypływu. Rezultatem tego sprzężenia zwrotnego, w przypadku pojedynczego kanału, jest towarzyszące impulsowi uwolnienie pewnej porcji — „kwantu” — jonów wapnia do cytoplazmy, w komórce natomiast występowanie tak zwanych fal czy też oscylacji wapniowych, gdy lokalne pobudzenie uwalniania wapnia prowadzi do aktywacji kolejnych kanałów wapniowych i jednocześnie inhibicji kanałów już aktywnych.

Dane kinetyczne uzyskane z doświadczeń nad wpływem wapnia na aktywność kanału receptora rianodynowego wskazują na istnienie

w cząsteczce receptora oddzielnych miejsc o wysokim ( $K_a < 1 \mu\text{M}$ ) i niskim ( $K_i > 50 \mu\text{M}$ ) powinowactwie do wapnia. Wiązanie się jonów wapnia do miejsc o wysokim powinowactwie powodowałoby taką zmianę konformacyjną receptora, która w rezultacie prowadziłaby do otwarcia kanału, natomiast wysycenie miejsc o niskim powinowactwie, następujące pod wpływem wzrostu stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  powodowałoby jego zamknięcie. W strukturze pierwszorzędowej receptora rianodynowego istnieją rejony bogate w reszty kwaśnych aminokwasów, które mogłyby stanowić miejsca wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  (ZORZATO i współaut. 1990, TAKESHIMA i współaut. 1989). W przypadku izoformy RyR1 eksperymentalnie potwierdzono wiązanie się jonów wapnia do rejonów 1 861–2 094, 3 657–3 776, 4 380–4 625 (CHEN i MACLENNAN 1994), przy czym sugeruje się, że zawarty w tym ostatnim rejonie fragment 4 489–4 499, zbudowany z powtarzających się reszt proliny i kwasu asparaginowego, mógłby stanowić miejsce wiązania wapnia o wysokim powinowactwie. W strukturze pierwszorzędowej  $\text{IP}_3\text{R}$  brak jest analogicznej sekwencji. Dotychczas eksperymentalnie stwierdzono wiązanie się jonów wapnia do odcinka pomiędzy aminokwasami 1 961–2 219 w izoformie I i 1 914–2 173 w izoformie II  $\text{IP}_3\text{R}$  (MIGNE-RY i współaut. 1992).

#### WPŁYW MAGNEZU, JONÓW JEDNOWARTOŚCIOWYCH I NUKLEOTYDÓW ADENINOWYCH

Jony magnezu oraz jony kationów jednowartościowych wywierają hamujący wpływ na aktywność kanałów wapniowych. Prawdopodobnie inhibicja ta jest spowodowana kompetycją tych jonów z jonami wapnia o wiązanie do receptora, przy czym w przypadku jonów jednowartościowych działałyby one jako antagoniści wapnia w wiązaniu się do miejsc o wysokim powinowactwie; jony magnezu natomiast wiązałyby się zarówno do miejsc o wysokim, jak i niskim powinowactwie do jonów wapnia.

Nukleotydy adeninowe i ich niehydrolizowalne analogi w stężeniu milimolowym wykazują stymulujący efekt na aktywność kanałów wapniowych, prawdopodobnie w wyniku stabilizacji kanału w konformacji otwartej w szerszym zakresie stężeń jonów wapnia (MEISSNER i współaut. 1997). Regulacja aktywności kanałów uwalniających wapń z ER przez nukleotydy stanowiłaby powiązanie procesu uwalniania wapnia ze stanem metabolicznym komórki.



## EFEKT FOSFORYLACJI

W strukturze pierwszorzędowej wszystkich izoform RyR znaleziono wiele miejsc konsensusowych dla różnych kinaz (ZORZATO i współaut. 1990, TAKESHIMA i współaut. 1989), a badania *in vitro* wykazały, że kanał uwalniający wapń z SR mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego ulega fosforylacji przez kinazę zależną od kalmoduliny (PK-CaM), kinazę zależną od cGMP (PKG) i kinazę zależną od cAMP (PKA), a także PKC (TAKASAGO i współaut. 1991, SUKO i współaut. 1993). Fosforylacja izoformy RyR2 z mięśnia sercowego powoduje aktywację kanału poprzez zwiększenie prawdopodobieństwa jego otwarcia (TAKASAGO i współaut. 1991, WITCHER i współaut. 1991). Ustalono, że miejsce fosforylacji w RyR2 stanowi reszta seryny w pozycji 2809 (WITCHER i współaut. 1991), a więc w postulowanym wcześniej rejonie regulatorowym (OTSU i współaut. 1990). W przypadku izoformy RyR1 z mięśni szkieletowych kinazy PKA, PKG fosforylują resztę seryny w pozycji 2843, homologiczną do seryny 2809 w izoformie RyR2, natomiast kinaza PK-CaM oprócz seryny 2843 fosforyluje również inne miejsca. Funkcjonalny efekt fosforylacji w przypadku izoformy RyR1 nie jest do końca wyjaśniony.

W strukturze pierwszorzędowej receptorów IP<sub>3</sub> typu I rozpoznano dwa potencjalne miejsca fosforylacji przez kinazę A, reszty serynowe w pozycji 1588 i 1755, a następnie potwierdzono fosforylację tych miejsc w warunkach *in vitro*, przy czym seryna w pozycji 1755 ulega fosforylacji już przy niskich stężeniach PKA (FERRIS i współaut. 1991). Receptor IP<sub>3</sub> typu I ulega również fosforylacji przez PKC i PK-CaM (FERRIS i współaut. 1991). Natomiast izoforma receptora IP<sub>3</sub> typu II nie ulega fosforylacji przez kinazę A (NAKADE i współaut. 1994). Prawdopodobnie takim właśnie strukturalnym, a co za tym idzie również funkcjonalnym różnicom pomiędzy izoformami IP<sub>3</sub>R należy przypisać fakt, że badania efektu fosforylacji w różnych tkankach dają często niejednoznaczne wyniki (JOSEPH 1996). Niemniej jednak w przypadku preparatu uzyskanego metodą immunopowinowactwa i zawierającego wyłącznie izoformę typu I, uzyskano wyniki analogiczne jak dla receptora rianodynowego z retikulum serca, to znaczy fosforylacja przez PKA powodowała zwiększenie przepływu jonów wapnia przez błonę w wyniku zwiększenia jednostkowego przewodnictwa i prawdopodobieństwa otwarcia kanału (NAKADE i współaut. 1994).

## WPŁYW KALMODULINY

Badania nad wpływem kalmoduliny na uwalnianie wapnia z retikulum wykazały, że kalmodulina wywiera efekt inhibitorowy poprzez zmniejszenie prawdopodobieństwa otwarcia się kanałów typu RyR i IP<sub>3</sub>R (MEISSNER 1994, JOSEPH 1996). Efekt ten obserwuje się w mikromolowym stężeniu kalmoduliny w obecności jonów wapnia, natomiast w nieobecności ATP, co wyklucza efekt działania kinazy i sugeruje bezpośrednią interakcję kalmoduliny z białkiem receptora. Na podstawie analizy struktury pierwszorzędowej RyR z mięśni szkieletowych (ZORZATO i współaut. 1990) i mięśnia sercowego (NAKAI i współaut. 1990, TUNWELL i współaut. 1996) wyróżniono trzy potencjalne miejsca wiązania kalmoduliny, natomiast doświadczenia z użyciem jodowanej kalmoduliny wykazały istnienie co najmniej 6 takich miejsc o różnym powinowactwie (CHEN i MACLENNAN 1994). Spośród trzech izoform receptorów IP<sub>3</sub>, tylko izoformy I i II wykazują zdolność bezpośredniej interakcji z kalmoduliną, a zatem jest to kolejny przykład możliwej, różnej regulacji aktywności kanałów wapniowych w różnych typach komórek w zależności od właściwej dla nich izoformy tego białka (YAMADA i współaut. 1995). Kalmodulina wiąże się z wysokim powinowactwem z rejonem pomiędzy aminokwasami 1564–1585 (YAMADA i współaut. 1995). Na uwagę zasługuje fakt, iż podobnie jak w przypadku receptorów rianodynowych, rejon wiązania kalmoduliny znajduje się w pobliżu miejsca fosforylacji; często sugeruje się wzajemną interakcję tych rejonów zwłaszcza, że fizjologiczny efekt obydwu procesów, fosforylacji i związania kalmoduliny, jest przeciwny.

## ROLA INNYCH BIAŁEK

Wiele obserwacji wskazuje na możliwy udział różnych białek w regulacji aktywności wewnątrzkomórkowych kanałów wapniowych (JOSEPH 1996, TAYLOR i TRAYNOR 1995). Na szczególną uwagę zasługuje białko FKBP12, które wiąże się z każdą podjednostką kanału typu RyR i IP<sub>3</sub>R w stosunku stechiometrycznym 1:1. Jest to białko o masie 12 kDa, o aktywności izomerazy peptydyloprolinowej, będące receptorem dla leku immunosupresyjnego FK506, którego związanie powoduje dysocjację FKBP12 od receptora (TIMERMAN i współaut. 1996). Dysocjacja FKBP12 sprawia, że kanał wapniowy ulega otwarciu w niższych



stężeniach wapnia, jest mniej wrażliwy na inhibicję przez jony magnezu i wykazuje wyższe prawdopodobieństwo otwarcia (TIMERMAN i współaut. 1996). Białko FKBP12 działałoby zatem jako inhibitor stabilizując kanał wapniowy w konformacji zamkniętej.

#### CYKLICZNA ADP-RYBOZA

Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują, że cykliczna ADP-ryboza, związek powstający z  $\text{NAD}^+$  przy udziale cykazy adenylowej, może pełnić rolę specyficznego ligandu

powodującego otwarcie kanałów wapniowych typu RyR w sposób analogiczny do tego, w jaki  $\text{IP}_3$  wywołuje aktywację  $\text{IP}_3\text{R}$ . Jednak rola cyklicznej ADP-rybozy jako wtórnego przekaznika nie została dotychczas udowodniona, gdyż jest ona obecna również w komórkach w stanie spoczynku. Uważa się raczej, iż może ona pełnić rolę kofaktora w procesie indukowanego wapniem uwalniania jonów wapniowych, zwiększając czułość receptorów rianodynowych na wapń (GALIONE 1993).

#### UWAGI KOŃCOWE

Badania nad funkcją i regulacją wewnątrzkomórkowych kanałów uwalniających jony wapnia są prowadzone bardzo intensywnie, a w perspektywie już rysują się całkiem nowe zagadnienia. Problemy te, które prawdopodobnie już wkrótce znajdą się w centrum zainteresowania, to między innymi występowanie he-

terotetramerów  $\text{IP}_3\text{R}$ , możliwa rola izoformy III  $\text{IP}_3\text{R}$  w procesie sprzężenia pomiędzy uwalnianiem wapnia z magazynów ER i ich uzupełnianiem przez wapń napływający z zewnątrz komórki, czy też udział receptorów  $\text{IP}_3$  w regulacji stężenia wapnia w jądrze komórkowym.

#### CALCIUM RELEASE CHANNELS

##### S u m m a r y

Ryanodine and  $\text{IP}_3$  receptors represent two types of calcium release channels responsible for the opening of intracellular calcium stores and the influx of calcium ions into cytoplasm. Although their opening is induced by different molecular signals, both types of receptors share considerable structural and functional homologies. They are large tetrameric proteins with a large N-terminal cytoplasmic regulatory domain and a C-terminal portion em-

bedded in the ER membrane. Several isoforms of ryanodine and  $\text{IP}_3$  receptors differing in their functional properties have been identified. The activity of intracellular calcium channels is under a strict control of endogenous effectors such as calcium and magnesium ions, ATP and calmodulin that modulate channel kinetics by a direct interaction with the receptor.

#### LITERATURA

- BERRIDGE M. J., 1993. *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature 361, 31–325.
- BEZPROZVANNY I., EHRLICH B. E., 1994. *Inositol (1,4,5)-triphosphate ( $\text{InsP}_3$ )-gated Ca channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by interluminal calcium*. J. Gen. Physiol. 104, 821–857.
- CARAFOLI E., 1987. *Intracellular calcium homeostasis*. Annu. Rev. Biochem. 56, 395–433.
- CHEN S. R. W., MACLENNAN D. H., 1994. *Identification of calmodulin-,  $\text{Ca}^{2+}$ -, and ruthenium red binding domains in the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. J. Biol. Chem. 269, 22698–22704.
- ENDO M., TANAKA M., OGAWA Y., 1970. *Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers*. Nature 228, 34–36.
- FERGUSON D. G., SCHWARTZ H. W., FRANZINI-ARMSTRONG C., 1984. *Subunit structure of junctional feet in triads of skeletal muscle; a freeze-drying, rotary-shadowing study*. J. Cell Biol. 99, 1735–1742.
- FERRIS C. D., CAMERON A. M., BRETT D. S., HUGANIR R. L., SNYDER S. H., 1991. *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic AMP-dependent kinase at serines 1755 and 1589*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 192–198.
- FLUCHER B. E., FRANZINI-ARMSTRONG C., 1996. *Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8101–8106.
- GALIONE A., 1993. *Cyclic ADP-ribose: a new way to control calcium*. Science 259, 325–326.
- HAKAMATA Y., NAKAI J., TAKESHIMA H., IMOTO K., 1992. *Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rat brain*. FEBS Lett. 312, 229–235.
- IKEMOTO T., IINO M., ENDO M., 1995. *Enhancing effect of calmodulin on  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle fibers*. J. Physiol. 487.3, 573–582.
- IMAGAWA T., SMITH J. S., CORONADO R., CAMPBELL K. P., 1987. *Purified ryanodine receptor from skeletal muscle*.

- le sarcoplasmic reticulum is the  $\text{Ca}^{2+}$  permeable pore of the calcium release channel. *J. Biol. Chem.* 262, 16636–16643.
- INUI M., SAITO A., FLEISHER S., 1987. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J. Biol. Chem.* 262, 15637–15642.
- JOSEPH S. K., 1996. The inositol triphosphate receptor family. *Cell. Signal.* 8, 1–7.
- LU X., XU L., MEISSNER G., 1994. Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 6511–6516.
- MEISSNER G., 1986. Ryanodine activation and inhibition of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261, 6300–6306.
- MEISSNER G., 1994. Ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effectors. *Ann. Rev. Physiol.* 56, 485–508.
- MEISSNER G., RIOS E., TRIPATHY A., PASEK D. A., 1997. Regulation of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) by  $\text{Ca}^{2+}$  and monovalent cations and anions. *J. Biol. Chem.* 272, 1628–1638.
- MICHIKAWA T., HAMANAKA H., OTSU H., YAMAMOTO A., MIYAWAKI A., FURUICHI T., TASHIRO Y., MIKOSHIBA K., 1994. Transmembrane biology and sites for N-glycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 9184–9189.
- MIGNERY G. A., JOHNSTON P. A., SUDHOF T. C., 1992. Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{InsP}_3$ ) binding to the cerebellar  $\text{InsP}_3$  receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 7450–7455.
- NAKADE S., RHEE S. K., HAMANAKA H., MIKOSHIBA K., 1994. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of an immunopurified homotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type I) increases  $\text{Ca}^{2+}$  flux in reconstituted lipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 269, 6735–6742.
- NAKAI J., IMAGAWA T., HAKAMATA Y., SHIGEKAWA M., TAKESHIMA H., NUMA S., 1990. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett.* 271, 169–177.
- NEWTON C. L., MIGNERY G. A., SUDHOF T. C., 1994. Co-expression in vertebrate tissue and cell lines of multiple 1,4,5-trisphosphate inositol ( $\text{InsP}_3$ ) receptors with distinct affinities for  $\text{InsP}_3$ . *J. Biol. Chem.* 269, 28613–28619.
- OHTSU K., WILLARD H. F., KHANNA V. K., ZORZATO F., GREEN N. M., MACLENNAN D. H., 1990. Molecular cloning of cDNA encoding the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 13472–13483.
- SUKO J., MAURER-FOGY I., PLANK B., BERTEL O., WYSKOWSKY W., HOHENEGGER M., HELLMANN H., 1993. Phosphorylation of serine 2843 in ryanodine receptor — calcium release channel of skeletal muscle by cAMP-, cGMP- and CaM-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1175, 193–206.
- SUPPAPATONE S., WORLEY P. F., BARABAN J. M., SNYDER S. H., 1988. Solubilization, purification, and characterization of an inositol triphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 1530–1534.
- TAKASAGO T., IMAGAWA T., SHIGEKAWA M., 1991. Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *J. Biochem. (Tokyo)* 109, 163–170.
- TAKESHIMA H., NISHIMURA S., MATSUMOTO T., ISHIDA H., KANGAWA K., MONAMINO N., MATSUO H., UEDA M., HANAOKA M., HIROSE T., NUMA S., 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature (London)* 339, 439–445.
- TAYLOR C. W., TRAYNOR D., 1995. Calcium and inositol triphosphate receptors. *J. Membr. Biol.* 145, 109–118.
- TIMERMAN A. P., ONOUE H., XIN H.-B., BARG S., COPELLO J., WIEDERRECHT G., FLEISHER S., 1996. Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 20385–20391.
- TINKER A., LINDSAY A. R. G., WILLIAMS A. J., 1993. Calcium conduction in the calcium release channel of the cardiac sarcoplasmic reticulum under physiological and pathophysiological conditions. *Cardiovascular Res.* 27, 1820–1825.
- TUNWELL E. A., WICKENDEN C., BERTRAND B. M. A., SHEVCHENKO V. I., WALSH M. B., ALLEN D., LAI F. A., 1996. The human cardiac muscle ryanodine receptor — calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. *Biochem. J.* 318, 477–487.
- WITCHER D. R., KOVACS R. J., SCHULMAN H., CEFALI D. C., JONES L. R., 1991. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J. Biol. Chem.* 266, 11144–11152.
- YAMADA, M., MIYAWAKI, A., SAITO, K., NAKAJIMA T., YAMAMOTO-HINO, M., RYO Y., FURUICHI T., MIKOSHIBA K., 1995. The calmodulin binding domain in the mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem. J.* 308, 83–88.
- ZORZATO F., FUJII J., OTSU K., PHILIPS M., GREEN N. M., LAI F. I., MEISSNER G., MACLENNAN, D. H., 1990. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 2244–2256.