

Received: 2005.03.02
Accepted: 2005.08.31
Published: 2005.10.12

TRPM7 – białko odpowiedzialne za homeostazę magnezu w komórce

TRPM7: a protein responsible for magnesium homeostasis in a cell

Anna Trzeciakiewicz^{1,3}, Adam Opolski^{1,2}, Andrzej Mazur³

¹ Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Zakład Onkologii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda, PAN we Wrocławiu

² Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie

³ Centre de Recherches en Nutrition Humaine d'Auvergne, Unité Maladies Métaboliques et Micronutriments, INRA, Theix, 63122 St-Genès-Champanelle, France

Streszczenie

Magnez jest ważnym regulatorem wielu procesów biologicznych. Przez wiele lat uważano, że homeostaza magnezu jest regulowana poprzez wypływ magnezu z komórki, a nie jego wpływ. Główną rolę przypisywano antyportowi (wymiennikowi) $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$. Jednak w ostatnich latach przeprowadzono wiele eksperymentów mających na celu poznanie mechanizmów transportu magnezu w organizmie. Stwierdzono, że prawdopodobnie poziom magnezu w komórce jest regulowany również poprzez jego wpływ do komórki. Jednym z najnowszych odkryć jest poznanie rodziny białek TRPM (transient receptor potential melastatin), z których TRPM6 i TRPM7 (białka stanowiące połączenie kanału z kinazą) są odpowiedzialne za regulację homeostazy magnezu. Odkrycie tych białek pozwoliło na lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących homeostazę magnezu. Wykazano, że białko TRPM6 jest odpowiedzialne za regulację homeostazy w całym organizmie, natomiast TRPM7 może regulować zawartość magnezu w komórce. TRPM7 pełni również inne funkcje, a jedną z nowo poznanych jest fosforylacja aneksyny 1. Tymczasem mechanizmy działania i funkcje TRPM7 nie zostały jeszcze do końca poznane. Praca jest przeglądem wiedzy zgromadzonej na temat białka transbłonowego – TRPM7, które jest odpowiedzialne głównie za utrzymanie homeostazy magnezu w komórce. Zwięźle przedstawiono główne funkcje i budowę TRPM7. Opisano również sposoby regulacji aktywności tego białka.

Słowa kluczowe: TRPM7 • homeostaza magnezu

Summary

Magnesium is an important cofactor in biological processes. For many years it has been considered that magnesium homeostasis in a cell is regulated by its efflux from a cell and not by its influx. It has also been considered that the $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ antiport plays the main role. In recent years, many experiments have been carried out to understand the mechanisms of Mg^{2+} transport in an organism. These experiments have led to some new conclusions. It was confirmed that the level of magnesium in a cell is probably also regulated by its influx to the cell. One of the last scientific findings is the discovery of the TRPM (transient receptor potential melastatin) protein family. TRPM6 and TRPM7, bifunctional proteins with kinase and ion channel activities, are responsible for magnesium homeostasis. The discovery of these proteins led to a better understanding of magnesium homeostasis. It was confirmed that TRPM6 protein is responsible for homeostasis in the whole organism and that TRPM7 may regulate the level of magnesium in the cell. TRPM7 also



has other functions. One of those newly recognized is the phosphorylation of annexin 1. However, many activities and functions of TRPM7 have not yet been described. This paper is a review of knowledge of TRPM7 transmembrane protein, which is responsible for the magnesium homeostasis in the cell. It briefly presents the main functions and structure of TRPM7. It also describes the mechanisms of its biological activity.

Key words: TRPM7 • magnesium homeostasis

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8250.pdf

Word count: 3089

Tables: 1

Figures: 1

References: 26

Adres autora: doc. dr hab. Adam Opolski, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, R. Weigla 12, 53-114 Wrocław;
e-mail: opolski@iitd.pan.wroc.pl

WSTĘP

Błona komórkowa jest barierą, która otacza cytoplazmę i wyznacza granicę komórki. Dwuwarstwowe błony lipidowe są słabo przepuszczalne dla jonów i większości cząsteczek polarnych, dlatego w transporcie substancji potrzebnych komórce pośredniczą specyficzne białka [2]. Są one zanurzone w dwuwarstwie lipidowej. Istotne znaczenie dla procesów transportu ma potencjał błonowy, to znaczy, że błona jest spolaryzowana elektrycznie z ładunkiem ujemnym od strony wewnętrznej komórki (od -70 do -100 miliwoltów) [10].

Białka pośredniczą w funkcjach błon, takich jak transport cząsteczek, przekazywanie informacji i przemiana energii. W zależności od pełnionych funkcji, błony komórkowe zawierają różne białka. Białka błonowe osadzone w dwuwarstwie lipidowej można podzielić na peryferyjne i integralne. Białka peryferyjne są związane z powierzchnią błony przeważnie przez interakcje elektrostatyczne i wiązania wodorowe, natomiast integralne białka błonowe osadzone są w dwuwarstwie fosfolipidowej w taki sposób, że ich polarne domeny wystają po obu stronach błony (lokalizacja transbłonowa). Przykładem białka transbłonowego jest glikoforyna A, będąca pojedynczym łańcuchem polipeptydowym z szesnastoma przyłączonymi jednostkami oligosacharydowymi. Glikoforyna składa się z trzech części: rejonu przy końcu N (zewnątrzna strona błony), hydrofobowego regionu środkowego przechodzącego w poprzek błony (struktura α -helisy) oraz rejonu przy końcu C, bogatego w reszty zjonizowane i polarne (cytosolowa strona błony komórkowej) [3]. Większość białek transbłonowych wykazuje podobną budowę.

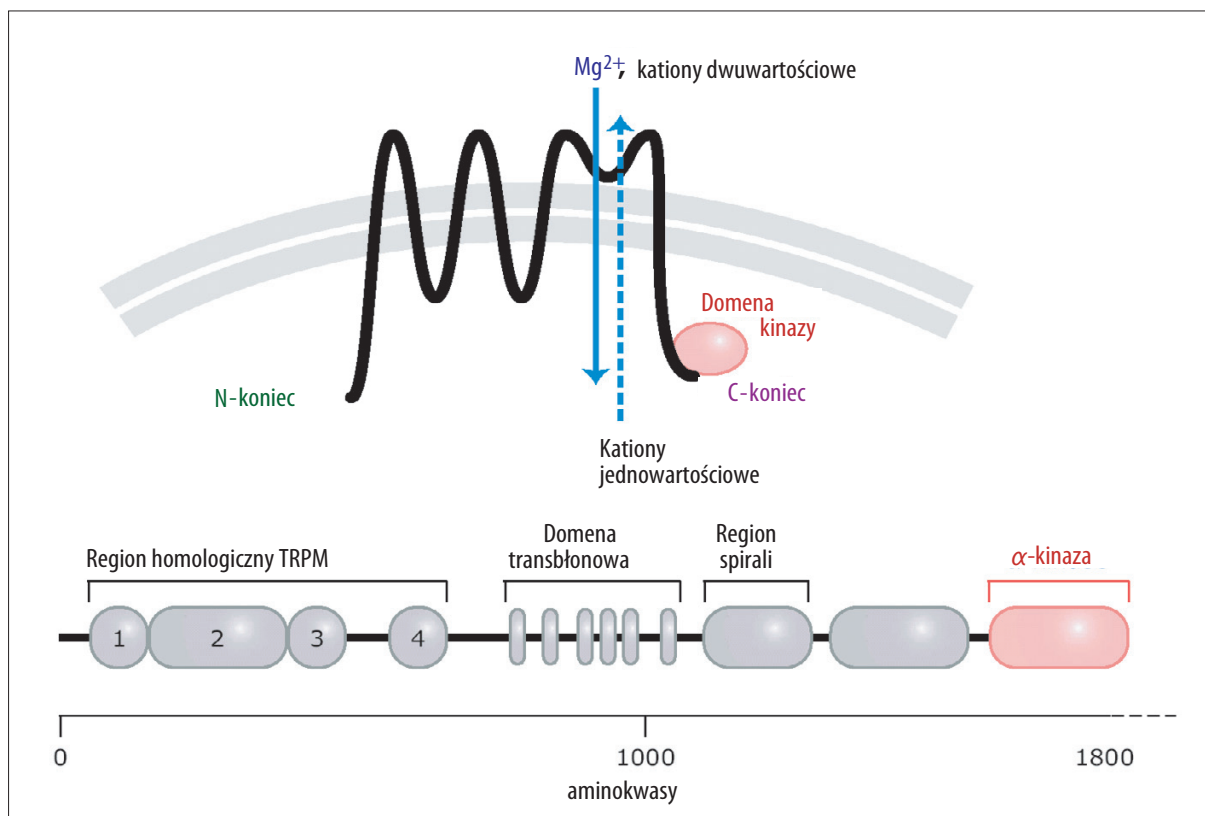
Błony komórkowe są wysoce selektywnymi barierami przepuszczalności. Molekularny i jonowy skład środowiska wewnątrzkomórkowego regulują systemy transportu obecne głównie w dwuwarstwie lipidowej. Swoiste białka umożliwiają transport cząstek do i z komórki. Białka mogą działać albo jako przenośniki (pompy transportujące jony) albo jako elementy tworzące kanał w błonie komórkowej, umożliwiając przepływ jonów. Kanały umożliwiają przepływ jonów przez błony w kierunku termodynamicznie korzystnym, to znaczy od strony większego stężenia

jonów do mniejszego. Natomiast pompy prowadzą transport jonów lub cząsteczek w kierunku wzrastającego stężenia (termodynamicznie niekorzystnym), zużywając źródła swobodnej energii np. ATP. Transport jonów przez kanały nie wymaga nakładu energii i odbywa się w obu kierunkach [24].

Kanały jonowe można podzielić - ze względu na strukturę i sposób aktywacji - na napięciowozależne i ligandozależne. Kanały mogą być otwierane, a następnie zamykane (bramkowanie kanału) w wyniku depolaryzacji błony (kanały bramkowane potencjałem) lub w wyniku wiązania efektora allosterycznego (kanały bramkowane ligandem) [26]. Efektozem allosterycznym może być jakieś białko lub związek chemiczny, który wiążąc się z białkiem błonowym zmienia jego konformację. Zmiana konformacji białka może spowodować otwarcie poru. O prawdopodobieństwie otwarcia poru decydują różne czynniki (np. jony, związki chemiczne), które mogą pełnić rolę agonistów (aktywatorów), tzn. zwiększać prawdopodobieństwo otwarcia kanału lub antagonistów (blokerów) zmniejszających to prawdopodobieństwo. Częstotliwość otwierania kanałów może być stymulowana bądź hamowana w zależności od występującego czynnika [10].

Wiele kanałów błonowych jest zbudowanych z czterech, pięciu lub sześciu podjednostek (lub domen), co umożliwia powstanie wolnej przestrzeni, czegoś w rodzaju tunelu dla jonów [10]. Środkowa oś symetrii wyznacza bramkowaną, wypełnioną wodą drogę jonom (por). Otwarty kanał ma por, przez który jony mogą przepływać w obie strony, ale kierunek przepływu jonów jest określony przez gradient elektrochemiczny. Por jest wyścielony przez α -helisy i odcinki o przeciwrównoległej strukturze β , które decydują o selektywności kanału (rodzaju przepuszczanych jonów). Przykładem może być kanał receptora acetylocholinowego selektywny dla kationów, gdyż jego por wyścielają trzy pierścienie ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych [6]. Kanały sodowy, potasowy i wapniowy również wykazują dużą selektywność jonową dzięki swojej budowie.

Inny mechanizm transportu jonów wykazują pompy. Przykładem jest pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, która by przetransporto-



Ryc. 1. Budowa TRPM7 i schematyczne przedstawienie jego funkcji (wg [25])

wać jony sodu i potasu poprzez błonę komórkową, wymaga energii uzyskanej podczas hydrolizy ATP. Reakcję tę katalizuje enzym ATP-aza $\text{Na}^+\text{-K}^+$, który do swojej aktywności oprócz jonów Mg^{2+} wymaga dodatkowo jonów Na^+ i K^+ . Enzym ten jest integralną częścią pompy [24]. W innych przypadkach, energia może również pochodzić z elektrochemicznego gradientu Na^+ lub H^+ . Transport aktywny może być również prowadzony przez przenośnik symportowy (cząsteczki transportowane w tym samym kierunku) bądź antyportowy (w przeciwnym). Przykładem antyportu jest wymiennik $\text{Na}^+\text{-Mg}^{2+}$ działający jednocześnie z ATP-azą $\text{Na}^+\text{-Mg}^{2+}$, odpowiedzialny za wypływ magnezu z komórki. Na jeden jon magnezu wypływające z komórki przypadają dwa jony sodu wpływające do komórki, żeby zachowany był bilans ładunku [1].

TRPM7 – BUDOWA, REGULACJA I FUNKCJE

Mimo że transport jonów jednowartościowych i wapnia przez błony jest dość dobrze poznany, to jednak o transporcie wielu istotnych dla organizmu pierwiastków nadal niewiele wiadomo. Szczególnie transport kationów dwuwartościowych jest słabo poznany. Przykładem może być jon magnezu, będący drugim co do liczności kationem wewnątrzkomórkowym zaraz po potasie. Ważne dla organizmu jest utrzymanie stałego poziomu magnezu, tak zwanej homeostazy magnezu, ponieważ pełni on wiele funkcji w organizmie. Stabilizuje np. strukturę DNA oraz jest regulatorem reakcji enzymatycznych katalizowanych przez polimerazy, endonukleazy czy topoiizomerazy. Niestety, o transporcie Mg^{2+} ciągle niewiele wiadomo i powstają coraz to nowe hipotezy.

W ostatnich latach zaczęto poznawać liczne białka transbłonowe odpowiedzialne za przeniesienie kationów dwuwartościowych przez błony. Białka błonowe mogą tworzyć strukturalne rodziny kodowane przez geny o podobnej sekwencji nukleotydów. Należy do nich m.in. rodzina białek TRPM (transient receptor potential melastatin), której poznano ośmiu członków (TRPM1-8) [8,11,18]. Białka te mają podobną budowę. W skład białek wchodzi trzy główne regiony: duży – zawierający około 700 aminokwasów na N-końcu (TRPM – homologous region), domenę transmembranową (TM spans) i region spirali (coiled coil region) na C-końcu, w sumie około 1500 aminokwasów. Każdy region odgrywa unikalną rolę w regulowaniu aktywności kanału. Domena transmembranowa (transbłonowa) składająca się z sześciu podjednostek tworzy por, przez który przechodzą jony. Dokładny mechanizm otwierania i zamykania się poru nie jest poznany. Spośród ośmiu znanych członków rodziny TRPM tylko TRPM6 i TRPM7 zawierają dodatkowo na C-końcu domenę kinazy serynowo-treoninowej (Ser/Thr), należącą do eEF2 α -kinaz (ryc.1), a TRPM2 domenę ADP rybozy. Geny TRPM6 i TRPM7 zawierają sekwencje nukleotydów odpowiedzialne za kodowanie trzech głównych regionów białka, ale dodatkowo zawierają sekwencję umożliwiającą syntezę kinazy. Te białka są często określane jako «chanzyme», aby podkreślić połączenie enzymu z białkiem transbłonowym [12,15,23]. Kanały TRPM wykazują zadziwiającą różnorodność ze względu na przepuszczalność jonów, a także mechanizmy bramkujące.

Początkowo rodzinę genów kodujących białka odpowiedzialne za transport magnezu odkryto u bakterii (rodzina genów

Tabela 1. Fizjologiczne funkcje kanałów jonowych TRPM (wg [8,11])

Para TRPM	Kanał TRPM	Proponowane funkcje kanału jonowego
1	TRPM1	potencjalny supresor nowotworu
	TRPM3	regulacja homeostazy wapnia w nerkach
2	TRPM6	nabłonkowy transport magnezu, regulacja homeostazy magnezu w organizmie
	TRPM7	regulacja homeostazy magnezu w komórce
3	TRPM4	depolaryzacja błony komórkowej
	TRPM5	odczuwanie smaku, depolaryzacja błony komórkowej
4	TRPM2	apoptoza, czujnik procesów redoks (reakcji utleniania i redukcji)
	TRPM8	odczuwanie temperatury i bólu

CorA). Następnie homologi genów CorA – ALUMINIUM RESISTANCE 1 (ALR1) i ALR2 znaleziono u drożdży i u innych grzybów. Kolejne poszukiwania doprowadziły do odkrycia rodziny genów MITOCHONDRIAL RNA SPLICING 2-MRS2, odpowiedzialnej również za transport magnezu w drożdżach i roślinach. Wkrótce, korzystając z analogii do znanych już genów, odkryto transportery kationów u ssaków – TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL (TRP) [9]. Jednym z członków tej rodziny są geny TRPM6 i TRPM7, biorące udział w transporcie magnezu.

Rodzina białek TRPM jest odpowiedzialna za różne funkcje w organizmie. Poznanie tej rodziny białek może dać wgląd w nowe, nieznanne dotąd, aspekty regulacji homeostazy jonowej w komórkach i całym organizmie. Prowadzono badania nad związkami panującymi między białkami z rodziny TRPM. Wykazano, że białka te można powiązać parami w grupy (TRPM1/3, TRPM4/5, TRPM2/8 i TRPM6/7) (tab. 1) i że mogą one współpracować ze sobą [4,8]. Tak więc, TRPM6 odpowiedzialne za nabłonkowy transport magnezu oraz regulację absorpcji i reabsorpcji Mg^{2+} w jelitach i nerkach współdziała prawdopodobnie z TRPM7. Nie wiadomo dokładnie na jakiej zasadzie oddziałują ze sobą i jak są powiązane. Wykazano natomiast, że TRPM6 potrzebuje obecności TRPM7, aby wbudować się w błonę komórkową [4]. Przypuszczalnie TRPM7 jest w stanie wprowadzić TRPM6 w błonę przez formowanie mieszanego multimeru. Samodzielne jednostki TRPM6 są niezdolne do utworzenia kompleksu funkcjonalnego kanału. Może to wynikać z jego składu aminokwasowego, gdyż jak wiadomo, białko żeby mogło się wbudować w błonę komórkową potrzebuje odpowiedniej ilości aminokwasów hydrofobowych.

Białka TRPM6 i 7 są najprawdopodobniej odpowiedzialne za regulację homeostazy magnezu. Jednak ich role mogą być podzielone. Tak więc, TRPM6 może być odpowiedzialne za regulację homeostazy w całym organizmie [22, 23], natomiast TRPM7 za regulację homeostazy komórkowej [11,15,20,23].

Badania nad kanałem odpowiedzialnym za przenoszenie kationów dwuwartościowych trwają zaledwie od kilku lat.

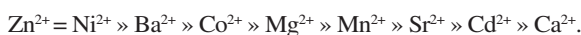
Wykazano, że białko TRPM7 (LTPC7, ChaK1 lub TRP-PLIK) jest odpowiedzialne za regulację homeostazy magnezu [15]. Jednak mechanizm jego działania pozostawia wiele pytań. Niewiele wiadomo na jakiej zasadzie enzym współpracuje z kanałem i jaką pełni rolę. Może pełnić rolę bramkującą lub wpływać na selektywność kanału, ale jest prawdopodobne, że pełni również jakieś inne funkcje.

Badania wykazały, że TRPM7 jest niezbędny do życia komórki [16]. W przypadku usunięcia genu odpowiedzialnego za syntezę tego białka, komórki przestawały rosnąć i w konsekwencji obumierały. Pierwsze badania wykazały również, że TRPM7 jest przepuszczalny tylko dla jonów dwuwartościowych. Kanał ten podlega skomplikowanej regulacji. Jednym z czynników regulacyjnych jest na pewno magnez. Funkcje regulatorowe przypisywano również α -kinazie. Wiadomo, że enzym ten katalizuje reakcję fosforylacji, dzięki której regulowana jest aktywność wielu enzymów, kanałów i innych białek. α -kinaza może pełnić funkcję bramkującą, dzięki uruchomionej kaskadzie reakcji fosforylacji. Przypomnieć należy, iż fosforylacji podlegają białka znajdujące się wewnątrz komórki, gdzie występuje duża ilość ATP. Natomiast przez odwracalną fosforylację nie są regulowane białka zewnątrzkomórkowe. Można powiązać stężenie Mg^{2+} i ATP z aktywnością kinazy. Niestety, mechanizm działania i rola kinazy w TRPM7 nie jest dobrze poznana. Otrzymane dane wskazują, że TRPM7 jest kanałem bramkowanym ligandem, a to oznacza, że prawdopodobnie istnieje jakiś czynnik łączący się z białkiem, co powoduje zmianę konformacji białka i otwarcie poru. Mechanizm aktywacji otwierania poru może być związany z energią komórkową [16,21], a w konsekwencji z poziomem $MgATP$ w cytosolu. Kanał ten przepuszcza na pewno jony Ca^{2+} i Mg^{2+} . Nie jest wykluczone, że przenikają przez niego jony dwuwartościowe toksyczne dla komórki [16].

Sposób działania TRPM7 wywołuje wiele dyskusji. Istotne dla kanału są mechanizmy aktywujące i hamujące. Wykazano, że Mg^{2+} , a także $MgATP$ (potrzebuje mikromolarnego stężenia wolnego Mg^{2+}) mają właściwości hamujące [12]. Kanał ten jest określany również jako

MagNuM (magnesium-nucleotide-inhibited metal) lub MIC (magnesium-inhibited cation), aby podkreślić rolę nukleotydów magnezu lub Mg^{2+} w jego regulacji [12,25]. W komórce powinien być utrzymany stały poziom magnezu. Przypuszczalnie, gdy stężenie magnezu wewnątrz komórki jest zbyt duże to kation magnezu łączy się z resztami aminokwasowymi wewnątrz poru, blokując w ten sposób kanał, a jednocześnie wejście jonów do komórki. Właściwości hamujące (inhibitorowe) mają również Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} , ale nie wiadomo na jakiej zasadzie blokują one otwarcie kanału.

Pierwiastki śladowe występujące w organizmie są istotne dla wielu reakcji katalizowanych przez enzymy. Wykazano, że TRPM7 jest przepuszczalny dla: Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} i Co^{2+} , ale również dla metali niefizjologicznych a nawet toksycznych, takich jak Cd^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} i Sr^{2+} [14]. Może to mieć znaczenie dla funkcji fizjologicznych i patologicznych. Co więcej, jony pierwiastków śladowych metali duwarościowych dużo łatwiej przechodzą przez kanał niż Ca^{2+} . Powinowactwo do jonów metali jest następujące:



Przenikanie jonów przez TRPM7 musi być niezależne od stężenia, gdyż pierwiastki śladowe nie miałyby szans w konkurencji z wapniem i magnezem.

TRPM7 może być odpowiedzialne za utrzymanie stałego poziomu magnezu w komórkach. Ekspresja TRPM7 występuje we wszystkich rodzajach komórek. Białko to może kontrolować i dopasowywać poziom magnezu do potrzeb komórki, czyli działać jako główna maszyna regulacyjna homeostazy magnezu [18]. Przeprowadzone badania *in vitro* na kilku liniach komórkach pozbawionych genu TRPM7 lub z mutacją w obrębie kinazy [20] wykazały, iż zawartość magnezu wewnątrz komórek znacznie spada, mimo iż były one hodowane w medium o standardowej zawartości magnezu. Po kilku dniach komórki traciły zdolność do wzrostu i obumierały. Zwiększenie stężenia magnezu w medium hodowlanym zapobiegało obumieraniu komórek i prowadziło do wzrostu zawartości magnezu wewnątrz komórek [20]. Badano również wpływ ekspresji genu TRPM7 i jego mutantów na zawartość magnezu w komórkach [20]. Stwierdzono, że zwiększenie ekspresji tego genu powoduje wzrost stężenia magnezu w komórkach. Najprawdopodobniej poprzez białko transmembranowe TRPM7 magnez dostaje się do komórki, aczkolwiek nie jest to jedyna droga jego transportu. Istnieją również inne sposoby transportu Mg^{2+} do komórki poprzez kanały (na przykład kanał przepuszczalny dla Ca^{2+} , Mg^{2+} i Na^{+}) i przenośniki (na przykład wymiennik Na/Mg czy Mn/Mg) [1]. Prawdopodobnie są one mniej efektywne, gdyż potrzebne jest znaczne zwiększenie stężenia zewnątrzkomórkowego magnezu, by utrzymać komórki przy życiu.

Na aktywność kanału ma wpływ stężenie Mg^{2+} i $MgATP$, a szczególnie ich stosunek ($Mg^{2+}/MgATP$). Przeprowadzono eksperyment korzystając z komórek ze zmutowaną wersją α -kinazy [20]. Hodowano je w medium o różnym stężeniu magnezu i stałym stężeniu $MgATP$. Wykazano, że brak kinazy nie blokuje kanału, ale zmienia jego wrażliwość na $Mg^{2+}/MgATP$ [20]. Kanał jest ciągle aktywny (przewodzi jony), ale bardziej hamowany przez Mg^{2+} i $MgATP$.

Można przypuszczać, iż enzym pośredniczy w regulacji aktywności kanału [20]. Poprzez fosforylację i jeszcze niezidentyfikowane białko docelowe, domena kinazy może działać na zasadzie mechanizmu sprzężenia zwrotnego, hamując wejście magnezu do komórki, gdy jest zbyt duże jego stężenie wewnątrzkomórkowe [11]. Podczas gdy badania prowadzone przez Runnels i wsp. [19] wykazały, że aktywność fosfotransferazy jest potrzebna do aktywności kanału TRPM7. Jednak ostatnio przeprowadzone badania, dotyczące roli kinazy w regulacji aktywności kanału TRPM7, wykazały, że enzym ten nie ma wpływu na aktywność kanału [13]. Powód sprzecznych rezultatów pozostaje ciągle niejasny.

Rola kinazy w połączeniu z kanałem TRPM7 jest przedmiotem licznych badań. Aktywność kinazy wzrasta w obecności Mg^{2+} , maleje w obecności Zn^{2+} , natomiast Ca^{2+} nie ma na nią wpływu. Tymczasem aktywność kanału TRPM7 hamowana jest przez te kationy [13]. Domena kinazy może odgrywać rolę strukturalną podczas formowania się kanału i wbudowywania go w błonę komórkową. Struktura krystaliczna domeny kinazy pozwoliła zauważyć, że region ten wykazuje pewną homologię do domeny palca cynkowego. Prawdopodobnie to cynk pełni funkcje strukturalne. Zidentyfikowano również dwa główne miejsca autofosforylacji białka TRPM7: Ser1511 i Ser1567. Fosforylacja ta najprawdopodobniej nie ma wpływu na aktywność kinazy, ale potencjalnie może pełnić funkcję stabilizującą dla formowanych struktur dimerycznych. Badania krystalograficzne wykazały, że dwie domeny kinazy białka TRPM7 łączą się tworząc „domain – swapped” dimer [13]. Możliwe jest, iż białka TRPM6 i TRPM7 są powiązane ze sobą w podobny sposób. Ani autofosforylacja, ani brak kinazy nie mają wpływu na formowanie się funkcjonalnego kanału TRPM7 oraz jego wrażliwość na poziom wewnątrzkomórkowego Mg^{2+} . Tak więc, funkcje kanału i regulacja przez Mg^{2+} wydają się niezależne od autofosforylacji i aktywności kinazy.

Aktywność TRPM7 jest ponoć zależna od energii komórki uzyskanej w procesach metabolicznych [21]. Procesy te zachodzą w silnie współzależnym systemie reakcji chemicznych. Metabolizm stanowi bardzo spójny system, zawierający wiele wspólnych motywów oraz rządzący się swoimi regułami. Powszechnym środkiem wymiany energii swobodnej w organizmach żywych jest ATP. Metabolizm jest regulowany przez kontrolę ilości enzymów, ich katalitycznej aktywności oraz dostępności substratów. Cykliczny AMP i jony wapniowe służą jako wewnątrzkomórkowe sygnały drugiego rzędu koordynujące aktywność wielu docelowych białek. Cykliczny AMP powstaje w wyniku cykliczacji ATP. Reakcję tę katalizuje cyklaza adenylanowa kontrolowana przez stymulujące białko Gs i hamujące białko Gi. Wykazano, że wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP podnosi aktywność TRPM7 [21]. Efekt zależny od cAMP wymaga funkcjonalnej integralności między kinazą białkową A (PKA) a domeną kinazy endogennej w TRPM7. Aktywność TRPM7 jest regulowana poprzez jego własną kinazę reagującą na zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie cAMP wywołane przez białka Gi i Gs (białka wiążące GTP). cAMP stymuluje fosforylację wielu białek docelowych, katalizowaną przez PKA. Łączy się z łańcuchami regulatorowymi (R) PKA, uwalniając łańcuchy katalityczne (C), które są katalitycznie ak-



tywne. W nieobecności cAMP kompleks R2C2 nie wykazuje aktywności katalitycznej. Domena kinazy TRPM7 nie jest istotna dla bramkowania kanału, ale wpływa na jego wrażliwość na wolny Mg^{2+} i $MgATP$. Wzrost lub spadek aktywności TRPM7 opiera się na zmianach w poziomie cAMP. Mechanizmy regulacji poprzez $MgATP$ i cAMP mogą być niepowiązane ze sobą, choć istnieje możliwość, że działają razem [16,21,25].

Przez wiele lat uważano, że homeostaza magnezu jest regulowana przez wpływ magnezu z komórki, a nie jego wpływ. Główną rolę przypisywano antyportowi (wymiennikowi) Na^+/Mg^{2+} . Na jeden jon Mg^{2+} wydostającego się na zewnątrz komórki przypadają dwa jony Na^+ transportowane do wnętrza, aby zachowany był bilans ładunku. Transport magnezu jest zależny od gradientu elektrochemicznego generowanego przez wewnątrzkomórkowe ładunki ujemne, które ciągną dodatnio naładowany magnez do środka. Uważa się, iż kanał TRPM7 może ułatwiać wejście Mg^{2+} i jednocześnie wyjście kationów jednowartościowych, szczególnie Na^+ i K^+ . Wniosek wysunięto na zasadzie analogii do mechanizmu działania antyportu Na^+/Mg^{2+} , który umożliwia wejście Na^+ do komórki i jednocześnie wyjście Mg^{2+} z komórki. Regulacja odbywa się poprzez fosforylację i defosforylację tego białka [25]. Można zauważyć podobieństwa między regulacją aktywności kanału i antyportu, gdyż w obu przypadkach może ona zachodzić poprzez fosforylację zależną od kinazy białkowej A (PKA). Można przypuszczać, że gdy jest zbyt duże stężenie magnezu wewnątrzkomórkowego, to przez antyport wydostają się jony magnezu z komórki, a jednocześnie kanał TRPM7 pozostaje zamknięty i odwrotnie w przypadku małego stężenia magnezu (kanał otwarty, a aktywność antyportu zablokowana). Za regulację homeostazy mogą być odpowiedzialne te dwa mechanizmy [25]. W ten sposób komórka może utrzymywać stały poziom magnezu.

Liczne kanały jonowe kontrolują przemieszczanie się jonów przez błony. Odpowiednie stężenie jonów w komórce jest istotne dla procesów biologicznych. Szczególnie komórki układu immunologicznego mają wiele różnych typów kanałów jonowych. W limfocytach, makrofagach, mastocytach i granulocytach objętościowych wykryto kanały jonowe selektywne dla K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- i H^+ [18]. Niektóre z nich są odpowiedzialne za regulację objętości komórki, jak na przykład kanały Cl^- znalezione w T-komórkach w czasie ich puchnięcia, inne regulują homeostazę

Ca^{2+} , a jeszcze inne biorą udział w szlakach sygnalizacyjnych. Wśród tych kanałów można znaleźć wielu członków powiększającej się rodziny białek TRP (transient receptor potential). Niektóre z nich mogą być zaangażowane w transport Ca^{2+} do wnętrza komórki, a także w generowanie odpowiedzi immunologicznej. Cztery białka (TRPM1, TRPM2, TRPM4 i TRPM7) z rodziny TRPM znaleziono w komórkach układu immunologicznego. Prawdopodobnie odgrywają one rolę w kształtowaniu odpowiedzi immunologicznej [18].

Jak dotąd, mechanizm działania i funkcje „chanzymu” nie są dobrze poznane. Jednak niedawno odkryto nową funkcję białka TRPM7. Wykazano, że kinaza TRPM7 fosforyluje białko aneksynę 1 [5]. Aneksyna 1 jest odpowiedzialna głównie za regulację wzrostu komórki, różnicowanie i apoptozę, ale również pośredniczy w funkcjach glikokortykoidów. Aneksyna 1 jest również białkiem wiążącym Ca^{2+} i fosfolipidy, przez co łączy się z błoną komórkową w zależności od wapnia [17]. Fosforylacja tego białka na Ser5 może zmieniać jego funkcje. Tak więc, aneksyna 1 jest substratem kinazy TRPM7. Białko TRPM7 nie tylko pełni funkcję kanału, przez który przenikają jony do komórki, ale również ma wpływ na regulację aktywności innych białek poprzez ich fosforylację. Zróżnicowanie funkcji TRPM7 wynika z jego budowy, a w szczególności połączenia kanału i enzymu. Być może istnieją również inne funkcje białka TRPM7, które nie zostały jeszcze poznane [5,18].

Transport jonów w organizmie jest procesem bardzo skomplikowanym. Bierze w nim udział wiele przekaźników i nie tylko. Każdy z nich umie odczytywać potrzeby komórki przez przetwarzanie wysyłanych przez nią sygnałów. Jeśli jest to możliwe, to jak najszybciej realizuje jej potrzeby. Mechanizmy działania licznych białek pozostają ciągią tajemnicą. Zrozumienie mechanizmów działania może być pomocne w poznaniu szlaków transportu licznych pierwiastków. Można zauważyć, że jedno białko, takie jak na przykład TRPM7, może pełnić tak wiele funkcji i mieć tak skomplikowane mechanizmy regulacji. Zaburzenia w działaniu choćby jednego białka mogą wywoływać zmiany w zawartości danego jonu w komórce, co może mieć wpływ na działanie organizmu. Przykładem może być niedobór magnezu, który powoduje nadpobudliwość nerwowo-mięśniową, zmiany psychiczne w postaci depresji, lęku, wzmożonej drażliwości, bóle głowy, a także ogólne osłabienie.

PIŚMIENICTWO

- [1] Beyenbach K.W.: Transport of magnesium across biological membranes. *Magnes. Trace Elem.*, 1990; 9: 233–254
- [2] Boxer S. G.: Molecular transport and organization in supported lipid membranes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000; 4: 704–709
- [3] Chin C.N., von Heijne G., de Gier J.W.: Membrane proteins: shaping up. *Trends Biochem. Sci.*, 2002; 27: 231–234
- [4] Chubanov V., Waldeger S., Mederos y Schnitzler M., Vitzthum H., Sassen M.C., Seyberth H.W., Konrad M., Gudermann T.: Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 2894–2899
- [5] Dorovkov M.V., Ryazanov A.G.: Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 50643–50646
- [6] Doyle D. A.: Structural changes during ion channel gating. *Trends Neurosci.*, 2004; 27: 298–302
- [7] Ebel H., Kreis R., Gunther T.: Regulation of Na^+/Mg^{2+} antiport in rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1664: 150–160
- [8] Fleig A., Penner R.: The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2004; 25: 633–639
- [9] Gardner R.C.: Genes for magnesium transport. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003; 6: 263–267
- [10] Hebert S. C.: General principles of the structure of ion channels. *Am. J. Med.*, 1998; 104: 87–98
- [11] Konrad M., Schlingmann K.P., Gudermann T.: Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2004; 286: 599–605
- [12] Kozak J.A., Cahalan M.D.: MIC channels are inhibited by internal divalent cation but not ATP. *Biophys. J.*, 2003; 84: 922–927

- [13] Matsushita M., Kozak J.A., Shimizu Y., McLachlin D.T., Yamaguchi H., Wei F.Y., Tomizawa K., Matsui H., Chait B.T., Cahalan M.D., Nairn A.C.: Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 20793–20803
- [14] Monteilh-Zoller M.K., Hermosura M.C., Nadler M.J., Scharenberg A.M., Penner R., Fleig A.: TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J. Gen. Physiol.*, 2003; 121: 49–60
- [15] Montell C.: Mg²⁺ homeostasis: The Mg²⁺ nificent TRPM channels. *Curr. Biol.*, 2003; 13: R799–R801
- [16] Nadler M.J., Hermosura M.C., Inabe K., Perraud A.L., Zhu Q., Stokes A.J., Kurotaki T., Kinet J.P., Penner R., Scharenberg A.M., Fleig A.: LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, 2001; 411: 590–595
- [17] Parente L., Solito E.: Annexin I: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm. Res.*, 2004; 53: 125–132
- [18] Perraud A.L., Knowles H.M., Schmitz C.: Novel aspects of signaling and ion-homeostasis regulation in immunocytes. The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response. *Mol. Immunol.*, 2004; 41: 657–673
- [19] Runnels L.W., Yue L., Clapham D.E.: TRP-PLIK, bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*, 2001; 291: 1043–1047
- [20] Schmitz C., Perraud A.L., Johnson C.O., Inabe K., Smith M.K., Penner R., Kurotaki T., Fleig A., Scharenberg A.M.: Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell*, 2003; 114: 191–200
- [21] Takezawa R., Schmitz C., Demeuse P., Scharenberg A.M., Penner R., Fleig A.: Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2004; 101: 6009–6014
- [22] Voets T., Nilius B., Hoefs S., van der Kemp A.W., Droogmans G., Bindels R.J., Hoenderop J. G. J.: TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 19–25
- [23] Walder R. Y., Landau D., Meyer P., Shalev H., Tsolia M., Borochowitz Z., Boettger M.B., Beck G. E., Englehardt R. K., Carmi R., Sheffield V. C.: Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat. Genet.*, 2002; 31: 171–174
- [24] West I. C.: Ligand conduction and the gated-pore mechanism of transmembrane transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1331: 213–234
- [25] Wolf F.I.: TRPM7: channeling the future of cellular magnesium homeostasis? *Sci. STKE*, 2004; 233: pe23
- [26] Woolley G. A., Loughheed T.: Modeling ion channel regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003; 7: 710–714

