

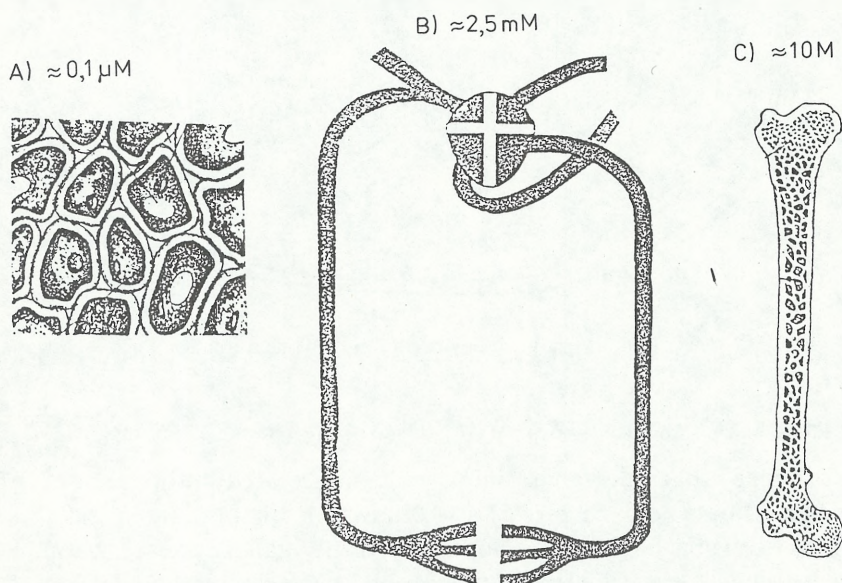
JACEK KUŹNICKI
JOLANTA KORDOWSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Warszawa

BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ JAKO MARKERY STANÓW PATOLOGICZNYCH

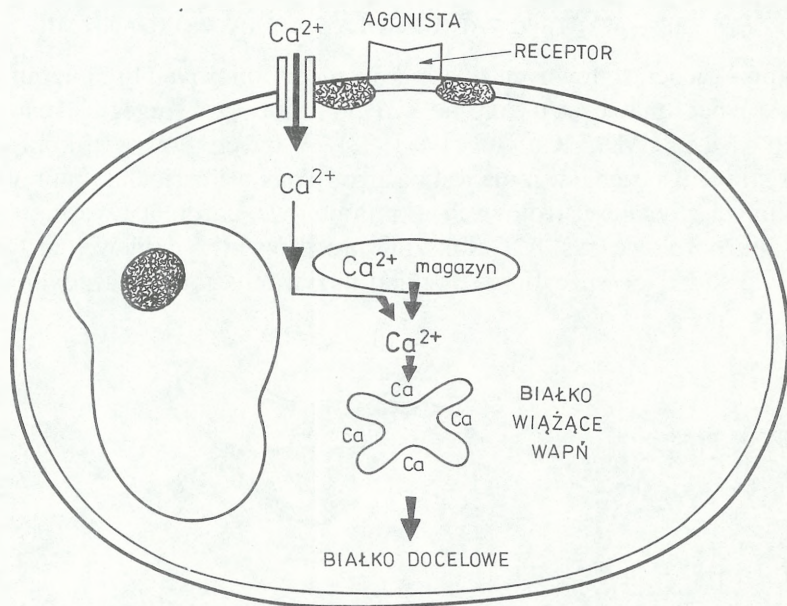
WSTĘP — WYSTĘPOWANIE I ROLA WAPNIA W ORGANIZMIE

Wapń — jeden z głównych składników nieorganicznych organizmu — pełni w nim różne funkcje strukturalne i regulacyjne (art. przegl. Schaffner i Dambader 1989; Kuźnicki 1988). W trzech głównych kompartmentach organizmu stężenie wapnia jest bardzo różne: w kościach kilkumolowe, we krwi i innych płynach ustrojowych — milimolowe, natomiast wewnątrz komórek — mikromolowe (rys. 1). Całokształt procesów utrzymujących w dynamicznej równowadze ten specyficzny rozkład nazywamy homeostazą wapniową.



Rys. 1. Występowanie wapnia w trzech głównych kompartmentach organizmu: w komórkach (A), we krwi (B) i w kościach (C)

Dzięki dużej różnicy stężeń między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym wapń może pełnić rolę w przekazywaniu sygnałów przez błonę komórkową oraz w regulacji procesów fizjologicznych, takich jak: skurcz mięśni, ruchliwość komórek mięśniowych i tworzenie cytoszkieletu, wydzielanie, podział komórkowy, synteza białek i przepuszczalność przez błony (art. przegląd. Rasmussen 1990; Berridge 1989). Wewnątrzkomórkową homeostazę wapniową można schematycznie przedstawić w postaci trzech kolejnych etapów. Pierwszy polega na aktywacji receptorów błonowych przez różnorodne czynniki (np. hormony lub zmiany potencjału), co prowadzi do wzrostu stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie. W drugim etapie jony te są wiązane przez specyficzne białka wiążące wapń, które przenoszą sygnał na białka docelowe. W trzecim etapie enzymatyczne i strukturalne białka docelowe wywołują określoną odpowiedź fizjologiczną (rys. 2). Obniżenie stężenia wapnia powoduje jego oddysocjowanie od białek wiążących, co hamuje aktywność białek docelowych.



Rys. 2. Aktywacja komórki za pośrednictwem jonów wapnia i białek wiążących wapń.

KOMÓRKOWA HOMEOSTAZA WAPNIOWA W STANACH PATOLOGICZNYCH

Normalne funkcjonowanie komórki ma miejsce wtedy, gdy stężenie Ca^{2+} jest precyzyjnie kontrolowane zarówno w czasie, jak i w przestrzeni przez współdziałające ze sobą błonowe i cytoplazmatyczne białka wiążące wapń. Różne stany patologiczne zmieniają tę równowagę, co może prowadzić do dalszego rozregulowania metabolizmu komórki. W momencie uszkodzenia komórki lub podczas jej starzenia obserwuje się zaburzenia procesów biorących udział

w wewnątrzkomórkowej homeostazie wapnia, co staje się powodem zwiększonego wpływu Ca^{2+} do komórki, uwalniania Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów i hamowania jego wydalania. Prowadzi to do znacznego wzrostu stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} , które utrzymuje się na nienormalnie wysokim poziomie. Na przykład w komórkach mięśni hodowanych *in vitro* uzyskanych od pacjentów chorych na dystrofię miotoniczną, homeostaza Ca^{2+} jest nieprawidłowa (Jacobs i in. 1991). Gdy jony wapnia są obecne w pożywce, komórki te mają wyższy poziom $[\text{Ca}^{2+}]$ w cytoplazmie, niż komórki osób zdrowych, co jest spowodowane zwiększonym wpływem jonów poprzez kanał Ca^{2+} .

W wyniku starzenia zmienia się dystrybucja wapnia w głównych kompartmentach organizmu: zwiększa się jego ilość w komórkach, a zmniejsza w kościach. Poziom wapnia we krwi pozostaje taki sam, nawet niewielkie zmiany stężenia tego jonu mogą wywołać poważne zaburzenia w funkcjonowaniu różnych narządów, m.in. serca. Zawartość całkowitego $[\text{Ca}^{2+}]$ w komórce (tab. 1) zwiększa się w miarę starzenia o 52%, a u chorych na chorobę Alzheimera nawet o 197%, co stwierdzono w fibroblastach pobranych ze skóry (Peterson i Goldman, 1986). W komórkach krwi pacjentów z nadciśnieniem stwierdza się zaburzenia w transporcie jonów wapnia przez błony komórkowe oraz wzrost jego stężenia wewnątrz komórki (Oshima i in. 1988).

Tabela 1

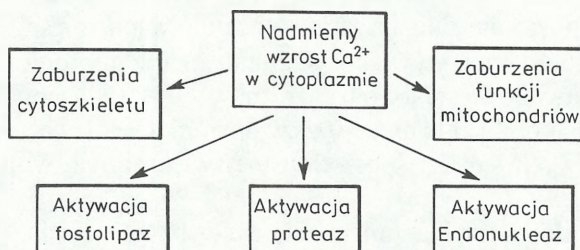
Poziom wapnia w fibroblastach (Peterson, Goldman 1986)

Wapń pmol Ca^{2+} /μg białka	Linia fibroblastów od pacjentów		
	młodych	w starszym wieku	z chorobą Alzheimera
całkowity	9,7 ± 0,5	14,6 ± 1,0	28,6 ± 1,3
wewnątrzkomórkowy	3,7 ± 0,2	7,6 ± 1,2	14,4 ± 0,4

Innym przykładem zaburzeń homeostazy wapniowej jest zachowanie się komórek nowotworowych (Boynton i Whitfield 1976; Swierenga i in. 1978). Komórki prawidłowe wymagają do wzrostu odpowiedniego stężenia jonów wapnia. Ich podziały zatrzymują się, gdy stężenie $[\text{Ca}^{2+}]$ w środowisku jest zbyt niskie. Ta sama linia komórek po transformacji nowotworowej wirusem SV-40 okazuje się niewrażliwa na zmiany $[\text{Ca}^{2+}]$. Komórki takie dzielą się nawet wtedy, gdy stężenie wapnia w środowisku jest bardzo niskie (Hazelton i Tupper 1981). W komórkach nowotworowych wykazujących zjawisko tzw. oporności wielolekowej (MDR) (Nair i in. 1986; Grzelakowska-Sztabert 1989) poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} jest podwyższony w porównaniu z komórkami nowotworowymi wrażliwymi na leki (Tsuro i in. 1984).

Utrzymujące się wysokie stężenie jonów wapniowych może doprowadzić do śmierci komórki m.in. poprzez rozbicie cytoszkieletu i nie kontrolowaną

aktywację enzymów katabolicznych, np. endonukleaz i proteaz. Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, odbywa się najprawdopodobniej m.in. poprzez zależne od Ca^{2+} endonukleazy (O r r e n i u s i in. 1989) (rys. 3)



Rys. 3. Prawdopodobne mechanizmy odpowiedzialne za zależną od wapnia programowaną śmierć komórki

KLASYFIKACJA BIAŁEK WIĄŻĄCYCH WAPŃ (CaBP)

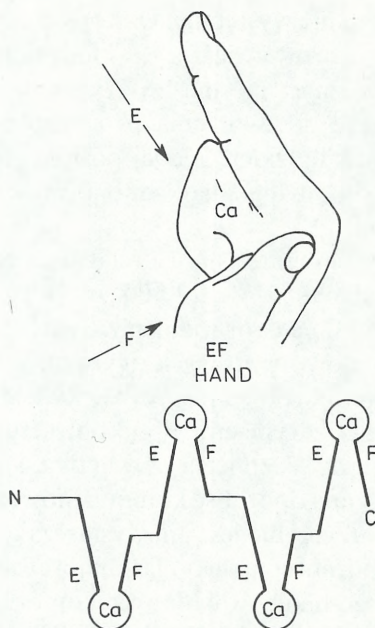
Na zmiany poziomu jonów wapnia w komórce reagują białka wiążące wapń, mające struktury wyspecjalizowane do wiązania tych jonów. Obecnie znanych jest ponad 200 takich białek. Część z nich scharakteryzowano, ale tylko dla nieznaczącej części określono funkcję (Heizmann i Berchtold 1987; Heizmann i Hunziker 1990). Białka wiążące wapń można podzielić na cztery grupy:

1. Białka, które wiążą wapń dzięki tzw. domenom „EF-hand” — strukturom o charakterystycznej budowie, składającym się z dwóch odcinków α -helisy i pętli je łączącej. Zalicza się do nich kalbindyny D28k i kalretininy (mające 6 domen „EF-hand”), kalmodulinę i troponinę C (4 domeny), (rys. 4) parwalbuminy i onkomodulinę (2 + 1 nieaktywna) oraz białka z rodziny S-100 (2 domeny „EF-hand”);

2. Białka, które zawierają domeny funkcjonalne i domeny homologiczne do struktury „EF-hand”. Przykładami są: α -aktynina (białko siecujące filamenty aktynowe), dystrofina — produkt genu, którego mutacja powoduje dystrofię Duchenna i Beckera, kalpaina — proteaza zależna od Ca^{2+} ;

3. Białka wiążące wapń, które nie mają struktur „EF-hand”, a które wiążą fosfolipidy w sposób zależny od jonów wapnia. Do grupy tej należą lipokortyny, kalpaktyny, chromobindyny i kalcimedyny, ogólnie zwane aneksynami (Gerke 1989; Gerke i in. 1990). Niektóre z tych białek ulegają fosforylacji m.in. w resztach tyrozynowych w czasie aktywacji komórki przez czynniki wzrostowe;

4. Inne białka, których nie można zaklasyfikować do trzech powyższych grup.



Rys. 4. Budowa domeny EF-hand i schemat białka wiążącego wapń zawierającego cztery domeny.

WYSTĘPOWANIE BIAŁEK WIĄŻĄCYCH WAPŃ W STANACH PATOLOGICZNYCH

Badając zmiany patologiczne związane z metabolizmem wapniowym, zwraca się m.in. uwagę na obecność różnych białek wiążących wapń. Niektóre z nich mogą się stać markerami pewnych chorób (np. te, które występują tylko w ściśle określonych komórkach lub te, których poziom w komórce zmienia się). Białka wiążące wapń, których występowanie i ekspresja zmieniają się w stanach patologicznych można podzielić na dwie grupy:

1. Białka ulegające ekspresji w specyficznych warunkach i praktycznie nie występujące w zdrowej tkance (np. onkomodulina i sorcyna);
2. Białka występujące w normalnej tkance, ale mające zmienioną ekspresję w warunkach patologicznych, np. kalmodulina, kalbindyny, parwalbuminy, białka S-100 (Heizmann i Schafer 1990).

Niżej opisano właściwości niektórych białek wiążących wapń, które prawdopodobnie będą mogły być markerami określonych stanów patologicznych.

Onkomodulina ($M_r = 11\,700$) jest to białko podobne do parwalbuminy (MacManus i Whitfield 1983; Gillen i in. 1987). Tworzy ono dimery (poprzez grupę SH), które wydają się być formą aktywną biologicznie. Onkomodulina jest nieobecna w normalnych fibroblastach, ale po transformacji nowotworowej pojawia się w tych komórkach w znacznej ilości. W czasie rozwoju prenatalnego pojawia się w łożysku, podczas gdy w normalnych

tkankach człowieka dorosłego nie występuje. Onkomodulina została znaleziona w 80% przebadanych nowotworów zwierzęcych i ludzkich. Jej poziom w tkankach nowotworowych jest różny i nie ma związku ani z szybkością wzrostu nowotworu, ani ze zdolnością do tworzenia przerzutów. Onkomodulina jest obecna w wielu nowotworach ludzkich, ale jej poziom jest niski i dlatego nie wydaje się, by oznaczanie poziomu tego białka mogło mieć praktyczne znaczenie w diagnostyce onkologicznej.

Sorcyna (ang. sorcin — soluble resistance-related calcium binding protein) jest cytoplazmatycznym białkiem o Mr 22 000, mającym 4 miejsca wiązania Ca^{2+} . Podobnie jak onkomodulina tworzy dimery. Synteza sorcyny jest znacznie zwiększona w komórkach nowotworowych wykazujących oporność wielolekową, co jest efektem amplifikacji genu sorcyny. Zwiększenie tego genu zachodzi równolegle z amplifikacją genu P-glikoproteiny, błonowego białka transportującego różne związki chemiczne z wnętrza komórki na zewnątrz, odpowiedzialnego za zwiększoną oporność komórek nowotworowych na działanie leków. Nadprodukcja sorcyny nie jest ani wystarczającym, ani niezbędnym warunkiem do uzyskania oporności na leki i jest najprawdopodobniej przypadkowa. Niemniej obecność tego białka w badanych komórkach jest wskaźnikiem nabycia wielolekowej oporności (Roberts i in. 1989; Hamada i in. 1988; Meyers i in. 1987; art. przegląd Grzelakowska-Sztabert 1989).

W przeciwieństwie do innych białek wiążących wapń kalmodulina występuje powszechnie we wszystkich komórkach, chociaż jej stężenie nie wszędzie jest jednakowe. W kilku przypadkach stwierdzono, że poziom kalmoduliny wzrasta w wyniku transformacji nowotworowej wywołanej wirusami (art. przegląd Heizmann i Berchtold 1987). Ponadto w komórkach mięśni gładkich u szczurów z nadciśnieniem poziom prawidłowej kalmoduliny wzrasta i pojawia się jej zmutowana forma.

Inne białka wiążące wapń, takie jak parwalbuminy, kalbindyny i białka S-100 wykazują specyficzność tkankową i komórkową i dlatego mogą się okazać szczególnie dobrymi markerami niektórych chorób. Parwalbumina jest białkiem wiążącym wapń o Mr = 12 000, występującym w wysokim stężeniu w szybkich miofibrylach mięśni szkieletowych. Fibryle te w pierwszej kolejności ulegają dezintegracji w przebiegu miopatii i dlatego w surowicy myszy Mdx (odpowiednik ludzkiej dystrofii Duchenna) obserwuje się znacznie podwyższony poziom parwalbuminy, co jest konsekwencją zwiększonej martwicy mięśni szkieletowych (Jockusch i in. 1990). Oznaczenie poziomu parwalbuminy w surowicy może być czułym markerem stopnia dezintegracji mięśni szkieletowych (parwalbuminy nie znajduje się w mięśniach gładkich i mięśniu sercowym).

Parwalbumina występuje w ośrodkowym układzie nerwowym — w niektórych GABA-ergicznych neuronach hipokampa (Skotti i Nitsch 1991). U pacjentów cierpiących na epilepsję obserwowano ubytek komórek hipokampa, głównie w tzw. obszarach CA1 i CA3 (Lernath i Ribak 1991), natomiast komórki nerwowe z obszaru CA2 były mniej wrażliwe na uszkodze-

nie. Badania immunologiczne prowadzone na szczurach wykazały, że obszar CA2 ma wyższy niż w obszarach CA1 i CA3 poziom parwalbumin (i kalbindyn D28K) w komórkach piramidalnych. Sugeruje się, że komórki piramidalne obszaru CA2 są odporne na toksyczność wapniową wywołaną nadmiernym pobudzeniem właśnie dzięki ochronnej roli białek wiążących wapń (Lernath i Ribak 1991). U pacjentów z chorobą Alzheimera zmniejsza się liczba neuronów zawierających parwalbuminę (Ichimiya 1988). U pacjentów z syndromem DiGeorge obserwuje się delecję genu parwalbuminy, co może być markerem tej choroby (Berchtold i in. 1987).

W mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera poziom kalbindyny D28k obniża się, co jest najprawdopodobniej spowodowane zmniejszaniem się liczby neuronów zawierających to białko (Baimbridge i in. 1985). Zaobserwowano, że D28k, podobnie jak parwalbumina, chroni komórki nerwowe przed toksycznym wpływem wapnia, który pojawia się w komórce w zwiększonej ilości w wyniku nadmiernego pobudzenia. Hodowane *in vitro* neurony hipokampa zawierające kalbindynę D28k są bardziej odporne na niszczący wpływ elektrostymulujących aminokwasów, niż neurony nie mające tego białka (Mattson i in. 1991). Neurony z kalbindyną D28k bardziej efektywnie niż neurony bez niej obniżają wysoki poziom wewnątrzkomórkowego wapnia pojawiający się po pobudzeniu. Ekspresja kalbindyn D28k występujących w komórkach nerwowych jest regulowana m.in. przez glukokortykoidy oraz przez neuronalne czynniki wzrostu. W przewlekłych chorobach neurologicznych, takich jak choroba Alzheimera, Huntingtona czy Parkinsona, poziom kalbindyny D28k (oraz jej mRNA) jest zredukowany w objętych chorobą rejonach mózgu. Wymienione przykłady świadczą o tym, że zmniejszająca się w różnych stanach patologicznych (lub wraz z wiekiem) w różnych procesach patologicznych ekspresja kalbindyny D28k może prowadzić do zachwiania homeostazy wapniowej kierowanej przez układ neuronalny.

Białka z rodziny S-100 to co najmniej 10 różnych polipeptydów (Mr od 9000 do 14 000), występujących na ogół w określonym typie komórek. Białka S-100 zawierają dwie domeny „EF-hand”; monomer może zatem wiązać dwa jony wapnia, a dimer cztery. Niektóre białka z tej rodziny wiążą jony cynku. Białka S-100 mają dwie ważne cechy odróżniające je od innych białek zawierających domeny „EF-hand”. Pierwsza — to wydzielanie białek S-100 na zewnątrz komórki do płynów ustrojowych lub pożywki, co wskazuje, że mogą one działać pozakomórkowo. Druga cecha — geny kodujące białka S-100 są aktywowane w określonej fazie cyklu komórkowego lub w przebiegu procesu różnicowania. Nie są to więc białka stale syntetyzowane w komórce.

Mózgowe białka S-100 występują w postaci dimerów zbudowanych z dwóch rodzajów podjednostek: S-100 α i S-100 β . Polipeptydy te wykazują około 50% identyczności i mogą tworzyć homo- i heterodimery. Białko S-100 β zlokalizowano w największej ilości w komórkach gleju, ale występuje ono również w adipocytach. Białko S-100 α znajduje się przede wszystkim w neuro-

Tabela 2

Właściwości białek S-100

Nazwa białka (genu)	Występowanie Indukowanie*	Ekspresja zależna od cyklu komórkowego lub etapu różnicowania	Pozakomórkowe (E) i tworzące dimer (D)
S-100 α	neurony, mięśnie, nerka, skóra	+	D
S-100 β	komórki gleju, tkanki tłuszczowej, jądra	+	E/D
S-100L	komórki płuc		
MRP-14 CF-Ag L-1 Ag	*w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych	+	E/D
MRP-8 L-1 Ag	*w przewlekłych stanach zapalnych	+	E/D
Kalcyklina PRA	*surowicą w fibroblastach połączony z receptorem prolaktyny	+	E/D
18A2	*surowicą w fibroblastach	+	
P9Ka	w komórkach mioepitelialnych	+	
pEL68	w nowotworach	+	E/D
mtsl	w przerzutach nowotworowych	+	
42A	*NGF w komórkach PC12	+	
ICaBP	*witaminą D w komórkach jelita	+	
p11 42C	podjednostka aneksyny II *NGF w komórkach PC12	+	D

nach centralnego i obwodowego układu nerwowego, a mniejsze jego ilości występują w komórkach mięśni, nerki i melanocytach. Dotychczas nie wyjaśniono jaką rolę pełnią białka S-100 α i S-100 β . Ostatnio stwierdzono jednak, że homodimer S-100 β wydłuża czas przeżycia neuronów w hodowli oraz stymuluje wydłużanie neurytów (K l i g m a n i M a r s h a k 1985). Wydzielanie S-100 β zachodzi pod wpływem hormonu kortykotropowego.

Synteza białka S-100 β w mózgu pacjentów z chorobą Downa i Alzheimer'a jest podwyższona (Griffin i in. 1989). Zwiększenie ilości białka S-100 w trakcie rozwoju mózgu może być przyczyną neurologicznych zmian występujących w chorobie Downa, co sugeruje się m.in. na podstawie obserwacji myszy transgenicznych (z genem białka S-100). Dodatkową wskazówką sugerującą, że białko S-100 β jest związane z patogenezą syndromu Downa jest fakt, że fragment chromosomu 21 zawierający gen tego białka ulega triplikacji. Poziom białka S-100 β oznaczony w płynie mózgowo-rdzeniowym jest podwyższony również w innych chorobach ośrodkowego układu nerwowego, takich jak

nowotwory, zmiany towarzyszące miażdżycy naczyń mózgowych, wylew krwi do mózgu. Użycie monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko białku S-100 β umożliwia identyfikację różnych nowotworów układu nerwowego u ludzi. W tabeli 3 pokazano w jakich nowotworach znajduje się, a w jakich nie ma białka S-100 β . We wszystkich badanych przypadkach znaleziono to białko w nowotworach pochodzących z komórek wspomagających (gleju), a nie znaleziono w nowotworach wywodzących się z neuronów (Van Eldik i in. 1986).

Tabela 3

Immunologiczna lokalizacja białka S-100 β w ludzkich nowotworach układu nerwowego (Van Eldik i in. 1986)

Nowotwór	S-100 β
Astrocytoma (gwiaździać)	23/23
Glioblastoma (glejak)	14/14
Schwannoma (osłoniak)	6/6
Ependymoma (komórki wyściółki)	3/3
Oligodendroglioma (skąpodrzewiak)	0/5
Memigioma (oponiak)	0/12
Medulloblastoma (rdzeniak)	0/7
Neuroblastoma (zwojak zarodkowy)	0/7

Białko S-100 α w komórkach mięśniowych jest obecne tylko w fibroblastach serca i fibrylach typu I mięśni szkieletowych (Haimoto i Kato 1987). W surowicy pacjentów z dystrofią miotoniczną typu 1 stwierdza się podwyższony poziom enzymów takich jak enolaza mięśniowa (dwukrotny), kinaza kreatyninowa i mioglobina (trzykrotny), anhydraza węglanowa (czterokrotny) oraz ponad sześciokrotny — białka S-100 α . Wydaje się, że białko to i jego poziom jest czułym i łatwym do oznaczania markerem tej dystrofii.

Białko S-100 β występuje w czerniakach i liniach komórkowych otrzymanych z tych nowotworów. Nie znaleziono białka S-100 β w normalnych melanocytach, w komórkach epitelialnych i w fibroblastach. Sugeruje się, że synteza tego białka zwiększa się po transformacji nowotworowej melanocytów w związku z progresją cyklu komórkowego.

Poziom kalbindyny D9k w jelicie cienkim zmienia się w różnych stanach patologicznych. Zaobserwowano korelację między poziomem kalbindyny D9k a zdolnością jelita do wchłaniania wapnia (tab. 4). Ponadto u szczurów z naciśnięciem poziom kalbindyny D9k obniża się (Rao i in.).

Dwa białka z rodziny białek S-100 zwane MRP-8 i MRP-14 (to ostatnie jest identyczne z tzw. antygenem mukowiscydozy — patrz niżej) są białkami charakterystycznymi dla komórek pochodzących ze szpiku. W warunkach normalnych obserwuje się je w granulocytach i monocytach krwi, a nie ma ich

w płytkach krwi i limfocytach oraz w normalnych tkankowych makrofagach (tab. 5).

Tabela 4

Poziom kalbidyny D9k w jelicie (Staun, Jarnum 1988)

Pacjenci z ograniczonym wchłanianiem jelitowym	Liczba przypadków	Poziom kalbidyny D9k ug/mg (biopsje)
Short-bowel syndrom	5	2,5
Celiakia		
nietraktowana	4	0,3
remisja	7	1,8
Jelitowa bypass	5	13,7
Biegunka chroniczna	7	11,5
Kontrola		
(podrażnienie jelit)	12	6,9

Tabela 5

Ekspresja MRP-8 i MRP-14 w komórkach białaczki i w stanach zapalnych (Zwaldo i in. 1983)

Stan chorobowy	MRP-8 % komórek pozytywnych	MRP-14 % komórek pozytywnych
Ostra białaczka szpikowa	10–40	10–40
Ostra białaczka limfatyczna	0	0
Przewlekła białaczka szpikowa	50–80	50–80
Przewlekła białaczka limfatyczna	0	0
Ostre stany zapalne (np. zapalenie dziąseł)	0	15–78
Przewlekłe stany zapalne (np. reumatoidalne zapalenie stawów)	50–100	50–100

W ostrych stanach zapalnych (np. w zapaleniu dziąseł, łuszczycy, świerzbicze) w makrofagach pojawia się jedynie białko MRP-14. W przewlekłych stanach zapalnych, takich jak np. reumatoidalne zapalenie stawów, makrofagi syntetyzują oba białka: MRP-8 i MRP-14. Obecność makrofagów zawierających MRP-8 wskazuje na przewlekłą naturę stanu zapalnego (Odink i in. 1987) Zwaldo i in. 1988).

W przewlekłych i ostrych białaczkach szpikowych obserwuje się obecność zarówno MRP-8 i MRP-14. W innych nowotworach układu białokrwinkowego nie stwierdzono obecności tych białek. Obecność MRP-14 w surowicy wynika albo ze zwiększonej lizy makrofagów i innych komórek, albo jest skutkiem wydzielania tego białka przez komórki w trakcie zapalenia. U pacjentów z mukowiscydozą obserwuje się podwyższony poziom białka „CF-antygen” identycznego z białkiem MRP-14. Mukowiscydoza związana jest z nienormalnie

niskim transportem jonów chlorkowych przez błonę. Gen odpowiedzialny za tę chorobę został zidentyfikowany, sklonowany, a defekt genu w postaci mutacji wykryty (art. przegląd. K o s h l a n d 1989). CF-antygen (MRP-14) jest zawsze obecny w surowicy (u osób zdrowych 2–135 ng.ml⁻¹), ale u chorych na mukowiscydozę (B r ü g g e n i in. 1988) jest obecny w dużo wyższym stężeniu (250–2500 ng.ml⁻¹). Zwiększony poziom CF-antygen (MRP-14) obserwuje się u osobników heterozygotycznych, którzy nie wykazują objawów chorobowych (12–380 ng.ml⁻¹). Oznaczenie poziomu tego białka w surowicy jest czulszym testem niż oznaczenie innych białek, np. związanych z aktywacją granulocytów, i może być testem na nosicielstwo genu mukowiscydozy.

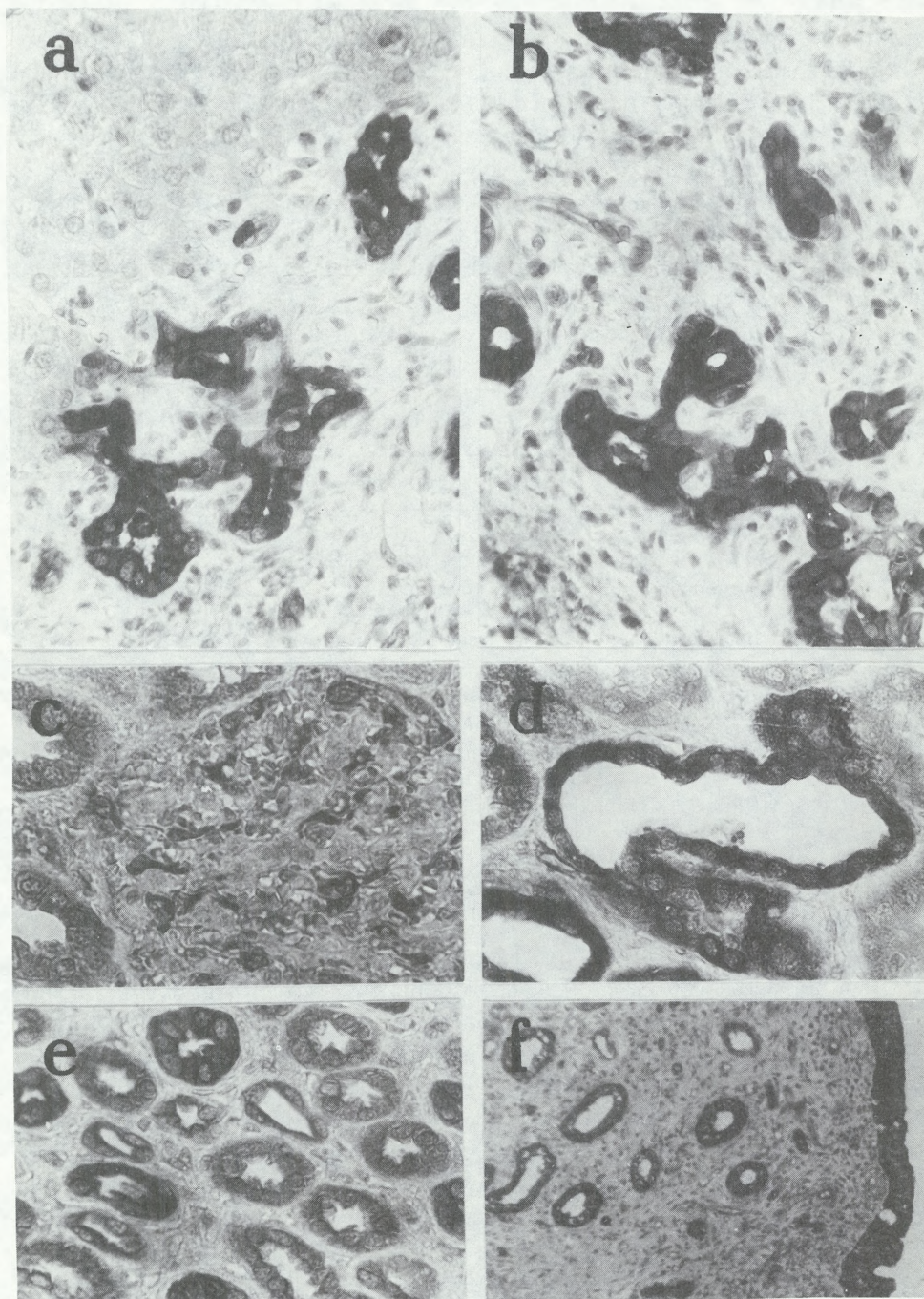
Tabela 6

CaBP jako markery chorób

Białko	Stan chorobowy
Onkomodulina	niektóre nowotwory
Sorcyyna	komórki nowotworowe z MDR
Parwalbumina	choroby mięśni
	choroba Alzheimera
Kalbidyna D9k	choroby jelit, nadciśnienie
D 28k	choroba Alzheimera
Białko S-100	dystrofia
	czerniaki
	nowotwory nerki
	nowotwory mózgu
MRP-8	chroniczne stany zapalne,
	ostre stany zapalne
MRP-14/CF-Ag	mukowiscydoza
Kalcyklina	niektóre nowotwory
	marskość żółciowa

18A2, p9Ka, pEL68, mts1 i 42A to nazwy tego samego białka (genu) wykrytego w różnych komórkach i badanego przez różne grupy badaczy (zob. Tab. 2 i art. przegląd. H i l t i K l i g m a n 1991). Białko kodowane przez ten gen wiąże wapń i jest indukowane przez różne czynniki. Niektóre z nich są związane ze stanami patologicznymi; np. zwiększoną syntezę tego białka obserwuje się po transformacji nowotworowej, a szczególnie w nowotworach wykazujących zdolność do przerzutów. Białko 18A2 występuje w różnych tkankach, ale jego największe stężenie jest w macicy i w łożysku ciężarnych myszy. Szczyt syntezy 18A2 obserwuje się w fazie S cyklu komórkowego (J a c k s o n - G r u s b y i in. 1987). Polipeptyd p9Ka pojawia się w 10–15-krotnej ilości w mioepitelialnych komórkach ssaków po ich przekształceniu z macierzystych komórek epitelialnych (B a r r a c l o u g h i in. 1990).

Komórki pheochromocytoma PC12 wykazują właściwości chromafinowych komórek nadnerczy. Pod wpływem nerwowego czynnika wzrostu (NGF)



Rys. 5. Występowanie kalcykliny w wątrobie i nerce wyznaczane przy pomocy przeciwciał. (Komórki zawierające kalcyklinę mają ciemne zabarwienie). Oznaczenia: a i b — wątroba (marskość żółciowa); c-f — nerka (zdrowa), c — fragment kłębaka; d — cewki w korze, e — cewki w rdzeniu, f — rdzeń i ściana miedniczki nerkowej

komórki te uzyskują właściwości sympatetycznych neuronów, czego wyrazem jest m.in. pojawienie się i wzrost neurytów (K l i g m a n i M a r s h a k 1985). Ten proces może być odzwierciedleniem indukowanego przez NGF procesu różnicowania embrionalnych neuroblastów. W czasie różnicowania się komórek PC12 pod wpływem NGF pojawiają się dwa białka wiążące Ca^{2+} , zwane 42A (mające 101 reszt aminokwasowych) i 42 C (identyczne z p11 podjednostką anneksyny II) mające 95 reszt aminokwasowych. Poziom mRNA 42C wzrasta 5-krotnie, a mRNA 42A — 25-krotnie (M a s i a k o w s k i i S h o o t e r 1988).

Kalcyklina to białko wiążące wapń (K u ź n i c k i i F i l i p e k 1987; K u ź n i c k i 1991), którego gen ulega ekspresji pod wpływem czynników wzrostowych (C a l a b r e t t a i i n. 1986). Normalnie występuje w fibroblastach i komórkach epitelialnych (K u ź n i c k i i i n. 1992). Zwiększony poziom mRNA kalcykliny (pojawiający się w fazie Go/S cyklu komórkowego) stwierdzono w ostrej białaczce szpikowej, w niektórych typach czerniaków (W e t e r m a n i i n. 1992), w neuroblastoma (T o n i n i i i n. 1991) i w nowotworze Hodgkina (G a b i u s i i n. 1989) (rys. 5). Ponadto kalcyklina okazała się identyczna z białkiem związanym z receptorem prolaktyny (M u r p h y i i n. 1989). Nie dziwi więc obserwacja T h o r d a r s o n a i i n. (1991), że kalcyklina jest wydzielana przez komórki doczesnej i stymuluje wydzielanie laktogenu II z trofoblastu. Jest to kolejny przykład białka z rodziny S-100, które występuje pozakomórkowo i wykazuje określoną aktywność biologiczną. Oznaczanie poziomu kalcykliny w tkankach lub w płynach ustrojowych może mieć znaczenie diagnostyczne. Ze względu na to, że kalcyklina występuje w fibroblastach, choroby związane z przerostem tkanki łącznej mogą być diagnozowane na podstawie wzrostu poziomu tego białka. Inne choroby, np. żółciowa marskość wątroby (którą cechuje zwiększona proliferacja komórek kanalików żółciowych), mogą być również w ten sposób diagnozowane (K u ź n i c k i i n. 1992).

ZAKOŃCZENIE

Oznaczanie występowania białek wiążących wapń oraz ich poziomu nie jest dotychczas stosowane rutynowo w celach diagnostycznych. Sytuacja ta może się niedługo zmienić, ponieważ coraz więcej danych wskazuje na to, że białka te mogą być markerami wielu stanów patologicznych.

Niektóre właściwości białek wiążących wapń czynią je szczególnie cennymi markerami: a) występują one tylko w pewnych tkankach i typach komórek i to w dużym stężeniu, b) ekspresja wielu z nich zależy od fazy cyklu komórkowego, c) występują głównie w cytoplazmie, d) niektóre są wydzielane na zewnątrz do płynów ustrojowych, e) nie ulegają szybkiej proteolizie. W najbliższych latach można oczekiwać nowych informacji na temat zastosowania białek wiążących wapń jako markerów stanów patologicznych.

CALCIUM BINDING PROTEINS AS MARKERS OF PATHOLOGICAL CONDITIONS

Summary

The distribution of calcium ion in eukaryota and its role in cellular functions are described in the introduction. Next chapter contains the information about calcium homeostasis under pathological conditions such as muscle dystrophy and tumorigenesis. Classification of calcium binding proteins and their general properties are summarized in the next chapter. Sorcin, oncomodulin, parvalbumin, calbindin and S-100 proteins are described in the relation to some pathological situations. Majority of information is focused on some members of S-100 proteins family such as S-100 alpha, S-100 beta, MRP-8 i MRP-14 (cystic fibrosis antigen), p9Ka and calcyclin. These proteins seem to be potential markers of some diseases since they are: soluble, expressed in tissue- and cell-specific manner, excreted from cells, and resistant to proteolysis. It is suggested that some members of S-100 proteins family might become the clinically useful markers of some diseases.

LITERATURA

- Baimbridge K. G., Moody I., Miller J. J. — *Reduction of rat hippocampal calcium binding protein following commissural, amygdala, septal, perforant path and olfactory bulb kindling.* Epilepsia 26: 460–465, 1985.
- Barthe C., Carrere J. Figarella C., Guy-Crotte O. — *Isolation of the „Cystic Fibrosis Protein” from Serum.* Clin. Chem. 35: 1901–1905, 1989.
- Barraclough R., Savin J. K., Rudland Ph. S. — *Molecular cloning and sequence of the gene for p9Ka. A cultured myoepithelial cell protein with strong homology to S-100, a calcium-binding protein.* J. Mol. Biol. 198: 13–20, 1987.
- Barraclough R., Gibbs F., Smith J. A., Haynes G. A., Rudland Ph. S. — *Calcium-ion binding by the potential calcium-ion-binding protein, p9Ka.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 169: 660–666, 1990.
- Berchtold M. W., Epstein P., Beaudet A. L., Payne M. E., Heizmann C. W., Means A. R. — *Structural organization and chromosomal assignment of the parvalbumin gene.* J. Biol. Chem. 262: 8696–8701, 1987.
- Berridge M. J. — *Cell signalling through cytoplasmic calcium oscillations.* w „Experiments to Theoretical Models”, Goldbeter A. (red.), Academic Press Limited, 449–459, 1989.
- Boynton A. L., Whitfield J. F. — *Different calcium requirements for proliferation of conditionally and unconditionally tumorigenic mouse cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1651–1654, 1986.
- Bruggen J., Tarcsay L., Cerletti N., Odink K., Rutishauser M., Hollander G., Sorg C. — *The molecular nature of cystic fibrosis antigen.* Nature 331: 570, 1988.
- Calabretta B., Venturelli D., Kaczmarek L., Narni F., Talpaz M., Anderson B., Beran M., Baserga R. — *Altered expression of G1-specific genes in human malignant myeloid cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1495–1498, 1986.
- Celis J. E. in. — *The MRC-5 human embryonal lung fibroblasts two-dimensional gel cellular protein database: Quantitative identification of polypeptides whose relative abundance differs between quiescent, proliferating and SV40 transformed cells.* Electrophoresis 11: 1072–1113, 1990.
- Cittachini A., Bossi D., Dni A. M., Calviello G., Wolf F., Terranova T. — *Lack of effect of the Ca^{2+} -ionophore A23187 on tumor cells.* Biochem. Biophys. Acta 645: 177–182, 1981.
- Clements M. R. Johnson L., Fraser D. R. — *A new mechanism for induced vitamin D deficiency in calcium deprivation.* Nature 324: 62–65, 1987.

- Fujita T. — *Aging and calcium metabolism*. [w] *The Biology and Medicine of Signal Transduction*, Nishizuka Y. i in., (red.), Raven Press, New York, 542–547, 1990.
- Gabius H. J., Bardosi A., Gabius S., Hellmann K. L., Karas M., Kratzin H. — *Identification of cell cycle-dependent gene product as a sialic acid-binding protein*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 506–512, 1989.
- Gerke V. — *Tyrosine protein kinase substrate p36: A member of the annexin family of Ca^{2+} (phospholipid-binding proteins)*. *Cell Motil. Cytoskel.* 14: 449–454, 1989.
- Gerke V., Johnsson N., Weber K., — *Intestinal Ca^{2+} (lipid-binding proteins)*. [w] *Stimulus Response Coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins*, Smith V. L., Dedman J. R. (red.), CRS Press, Boston, 311–338, 1990.
- Gillen M. F., Banville D., Rutledge R. G., Narang S., Seligy V. L., Whitfield J. F., MacManus J. P. — *A complete complementary DNA for the oncodevelopmental calcium-binding protein, oncomodulin*. *J. Biol. Chem.* 262: 5308–5312, 1987.
- Grzelakowska-Sztabert B. — *Oporność wielolekowa komórek nowotworowych*. *Post. Bioch.* 35: 513–542, 1989.
- Haimoto H., Kato K. — *S100 (alfa-alfa) protein, a calcium binding protein is localized in the slow-twitch muscle fiber*. *J. Neurochem.* 48: 917–923, 1987.
- Hamada H., Okochi E., Oh-hara T., Tsuruo T. — *Purification of the Mr 22,000 Calcium-binding Protein (Sorcin) associated with multidrug resistance and its detection with monoclonal antibodies*. *Cancer Res.* 48: 3173–3178, 1988.
- Hazelton B. J., Tupper T. — *Intracellular ionic changes in normal and transformed human fibroblasts after extracellular Ca^{2+} deprivation*. *Biochem. J.* 194: 707–711, 1981.
- Heizmann C. W. — *Molecular and functional aspects of some cytosolic calcium-binding protein*. NATO ASI 48, Calcium Transport and Intracellular, 1990.
- Heizmann C. W., Berchtold M. W. — *Expression of parvalbumin and other Ca^{2+} -binding proteins in normal and tumor cells: a topical review*. *Cell Calcium* 8: 1–41, 1987.
- Heizman C. W., Braun K. — *Changes in Ca^{2+} binding in human neurogenerative disorders*. *Trends in Neurosciences* (w druku).
- Heizmann C. W., Hunziker W. *Intracellular calcium-binding molecules*. [w] *Intracellular Calcium Regulation*, F. Bronner, (red.) Alan R. Liss, Inc., 211–247, 1990.
- Heizmann C. W., Schafer B. W. — *Internal calcium-binding proteins*. *Cell. Biol.* 1: 277–282, 1990.
- Hilt D. C., Kligman D. — *The S-100 protein family: a biochemical and functional overview* [w] *Novel Calcium Binding Proteins. Fundamentals and Clinical Implications*, C. W. Heizmann (red.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1991, s. 65–104.
- Ichimiya Y., Emson P. C., Mountjoy C. Q., Lawson D. E. M., Heizmann C. W. — *Loss of calbindin immunoreactive neurons from the cortex in Alzheimer-type dementia*. *Brain Res.* 475: 156–159, 1988.
- Jackson-Grusby L. L., Swiergiel J., Linzer D. I. H. — *A growth-related mRNA in cultured mouse cells encodes a placental calcium binding protein*. *Nucl. Acid. Res.* 15: 6677–6690, 1987.
- Jakobs A. E. M., Benders A. D. A. G. M., Oosterhof A., Veerkamp J. H. van Mier P., Wevers R. A., Joosten E. M. G. — *The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy*. *Biochem. Biophys. Acta* 1096: 14–19, 1991.
- Jockusch H., Friedrich G., Zippel M. — *Serum parvalbumin, an indicator of muscle disease in murine dystrophy and myotonia*. *Muscle & Nerve* 13: 551–555, 1990.
- Kato K., Haimoto H., Ariyoshi Y., Horisawa M., Washida H., Kimura S. — *High levels of S-100 (alfa-alfa) protein in tumor tissues and in sera of patients with renal cell carcinoma*. *J. Canc. Res.* 78, 856–862, 1985.
- Kligman D., Marshak D. — *Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7136–7139.
- Koshland D. E., — *The cystic fibrosis gene story*. *Science* 245, 1029, 1989.
- Kuźnicki J. *Transport i funkcje jonów wapnia u Eukaryota*. *Kosmos* 37: 197–217, 1988.

- Kuźnicki J. — *Calcyclin — From gene to protein*. [w] *Novel Calcium Binding Proteins. Fundamentals and Clinical Implications*. C. W. Heizmann (red.), Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 1991, s. 157–168.
- Kuźnicki J., Filipiek A. — *Purification of a novel calcium-binding protein (10,5 kDa) from Ehrlich ascites tumour cells*. *Biochem. J.* 247: 663–667.
- Kuźnicki J., Kordowska J., Puzianowska M., Woźniewicz B.M. — *Calcyclin as a new marker of human epithelial cells and fibroblasts*. *Exp. Cell Res.* (w druku).
- Leranth C., Ribak C.E. — *Calcium-binding proteins are concentrated in the CA2 field of the monkey hippocampus: a possible key to this region's resistance to epileptic damage*. *Exp. Brain Res.* 85: 129–136, 1991.
- MacManus J.P., Whitfield J.F. — *Oncomodulin: A calcium-binding protein from Morris Hepatoma*. [w] *"Calcium and cell function"*, IV Academic Press, Inc. 412–440, 1983.
- Masiakowski P., Shooter E.M. — *Nerve growth factor induces the genes for two proteins related to a family of calcium-binding proteins in PC12 cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1277–1281, 1988.
- Mattson M.P., Rychlik B., Chu Ch., Christakos S. — *Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28K in cultured hippocampal neurons*. *Neuron* 4: 41–51, 1991.
- Mayel-Afshar S., Lane S.M., Lawson D.E. — *Relationship between the levels of calbindin synthesis and calbindin mRNA in chick intestine*. *J. Biol. Chem.* 263: 4355–4361, 1988.
- Meyers M.B., Schneider K.A., Spengler B.A., Chang T.D., Biedler — J.L. Sorcin (V19), a soluble acidic calcium-binding protein is overproduced in multidrug-resistant cells. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2373–238, 1987.
- Morgan D.W., Welton A.F. — *Specific in vitro activation of Ca, Mg-ATPase by vitamin D-dependent rat renal calcium binding protein (calbindin D28K)*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 547–553, 1986.
- Moss S.E., Crumpton M.J. — *The lipocortins and the EF-hand evolution*. *TiBS* 15: 11–12, 1990.
- Murphy C.L., Murphy L.J., Tsuyuki D., Duckworth M.L., Shiu R.P.C. — *Cloning L. and characterization of a cDNA encoding a highly conserved, putative calcium binding protein, identified by an anti-prolactin receptor antiserum*. *J. Biol. Chem.* 263: 2397–2401, 1988.
- Nair S., Samy T.S.A., Krishan A. — *Calcium, calmodulin, and protein content of adriamycin-resistant and — sensitive murine leukemic cells*. *Cancer Res.* 46: 229–232, 1986.
- Odink K., Cerletti N., Bruggen J., Clerc R.G., Tarcsay L., Zwadlo G., Gerhards G., Schlegel R., Sorg C. — *Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis*. *Nature* 330: 80–82, 1987.
- Orrenius S., McConkey J.D., Bellomo G., Nicotera P. — *Role of Ca^{2+} in toxic cell killing*. *TiBS* 10: 281–284, 1989.
- Oshima T., Matsuura H., Matsumoto K., Kido K., Kajiyama G. — *Role of cellular calcium in salt sensitivity of patients with essential hypertension*. *Hypertension* 11: 703–707, 1988.
- Peterson C., Goldman J.E. — *Alternations in calcium content and biochemical processes in cultured skin fibroblasts from aged and Alzheimer donors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2758–2762, 1986.
- Rasmussen H. — *The complexities of intracellular Ca^{2+} signalling*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371: 191–204, 1990.
- Roberts De. W., Meyers M.B., Biedler J.L., Wiggins L.G. — *Association of sorcin with drug resistance in L1210 cells*. *Cancer Chemother. Pharm.* 23: 19–25, 1989.
- Schaffner W., Dambader M.A. — *Homeostaza wapnia*. *Sandoz Revue* 1: 41–48, 1989.
- Scotti A.L., Nitsch C. — *The perforant path in the seizure sensitive gerbil contains the Ca^{2+} -binding protein parvalbumin*. *Exp. Brain Res.* 85: 137–143, 1991.
- Shibuya S., Wakayama Y., Nakada H., Jimi T., Kato K. — *Serum S-100 protein level in myotonic dystrophy*. *Med. Sci. Res.* 15: 1055, 1987.

- Smith V., Kaetzel M.A., Dedman J.R. — Stimulus-response coupling: the search for intracellular calcium mediator proteins. *Cell regulation* 1: 165–172, 1990.
- Staun M., Jarnum S. — *Measurement of the 10 000 – Molecular weight calcium-binding protein in small-intestinal biopsy specimens from patients with malabsorption syndromes.*, 1988.
- Stuhlfauth I., Reininghaus J., Jockusch H., Heizmann C.W. — *Calcium-binding protein, parvalbumin, is reduced in mutant mammalian muscle with abnormal contractile properties.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4814–4818, 1984.
- Swierenga S.H., Whitfield J.F., Karasaki S. — *Loss of proliferative calcium dependence: Simple in vitro indicator of tumorigenicity.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 6069–6072, 1978.
- Thordarson G., Southard J.N., Talamantes F. — *Purification and characterization of mouse decidual calyculin: a novel stimulator of mouse placental lactogen — II secretion.* *Endocrinology* 129: 1257–1265, 1991.
- Tonini G.P., Antonella C., Cara A., Di Martino D.Di. — *Inducible expression of calyculin, a gene with strong homology to S-100 protein, during neuroblastoma cell differentiation and its prevalent expression in Schwann-like cell lines.* *Cancer Res.* 51: 1733–1737, 1991.
- Tsuruo T., Lida H., Kawabata H., Tsukagoshi S., Sakurai Y. — *High calcium content of pleiotropic drug-resistant P388 and K562 leukemia and chinese hamster, ovary cells.* *Cancer Res.* 44: 5095–5099, 1984.
- Tupper T., Kaufman L., Bodine P.B. — *Related effects of calcium and serum on the G1 phase of the human WI 38 fibroblasts.* *J. Cell Physiol.* 104: 97–103, 1980.
- Van Eldik L.J., Jensen R.A., Ehrenfried B.A., Whetsell W.O. — *Immunohistochemical localization of S-100 in human nervous system tumors by using monoclonal antibodies with specificity for S-100 polypeptide.* *J. Histochem. Cytochem.* 8: 977–982, 1986.
- Walrers J.R.F., Howard A., Charpin M.V., Gniecko K.C. Brodin P., Thulin E., Forsen S. — *Stimulation of intestinal basolateral membrane calcium-pump activity by recombinant synthetic calbindin-D9K and specific mutants.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 603–608, 1990.
- Weterman M.A.J., Stoopen G.M., van Muijen G.N.P., Kuźnicki J., Ruiter D.J., Blomers H.P.J. — *Expression of calyculin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behaviour in nude mice.* *Cancer Res.* 52, 1291–1296, 1992.
- Zwadlo G., Bruggen J., Gerhards G., Schiegel R., Sorg C. — *Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues.* *Clin. Exp. Immunol.* 72: 510–515, 1988.