

JACEK KUŹNICKI, ANNA FILIPEK

Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: jacek@nencki.gov.pl

RÓŻNORODNOŚĆ I WIELOFUNKCYJNOŚĆ BIAŁEK WIĄŻĄCYCH WAPŃ (CaBP)

WSTĘP

Kiedy ponad 30 lat temu zidentyfikowano w mózgu pierwsze białko wiążące wapń nikt nie przypuszczał, że jest to początek fascynującej historii. Okazało się, że życie komórki eukariotycznej nie jest możliwe bez białek wiążących jony wapnia i że nawet programowana śmierć komórki nie może się odbyć bez tych białek. Co czyni je tak istotnymi dla komórki? Odpowiedź jest prosta — uczestnictwo w regulacji wielu procesów wewnątrzkomórkowych, w których jest wykorzystywany gradient stężenia jonów wapnia. Na zewnątrz komórki jest wysokie stężenie jonów wapnia, ale w cytoplazmie jest ono około 10 000 razy niższe. Ten gradient stężenia jonów wapnia musi być utrzymywany ze względu na toksyczność wyższych stężeń jonów wapnia, ale jednocześnie

wykorzystuje się go do przekazywania informacji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. Sygnał, polegający na przedostaniu się do komórki pewnej ilości jonów wapnia z zewnątrz lub z wewnątrzkomórkowych magazynów, jest przez białka wiążące wapń identyfikowany, wzmacniany i przekazywany na białka efektorowe. Rolą białek wiążących wapń jest zatem wyłapanie sygnału aktywacji i przekształcenie tej informacji tak, by zaszły odpowiednie procesy komórkowe. To, które procesy zostaną zaktywowane zależy od wielu czynników, między innymi od składu białek wiążących wapń w danej komórce, od obecności określonych białek efektorowych oraz od drogi jaką jony wapnia dostały się do wnętrza komórki.

Tabela 1. Klasyfikacja białek wiążących wapń (CaBP)

Nazwa białka	Liczba miejsc wiązania Ca ²⁺
1. Grupa białek zawierających motyw „EF-hand”	
ERC-55	6
kalbindyna D-28k, kalretynina	6
rdgC fosfataza	5
kalcyneuryna B	4
kalmodulina	4
sorcyna	4
troponina C	4
lekkie łańcuchy miozyny	4
rekoweryna i białka homologiczne	4
kalpaina (proteaza)	4
CDPK (kinaza białkowa zawierająca domenę kalmodulinową)	4
parwalbumina	2 (+1)
białka S100	2
spektryna (wiąże aktynę)	2
α-aktynina (wiąże aktynę)	2
kinaza diacyloglicerolu	2
2. Aneksyny, białka wiążące wapń i fosfolipidy	1–6
3. Inne białka, nie należące do białek „EF-hand” lub aneksyn, np.: Ca ²⁺ -ATPaza, kinaza białkowa C, kalretikulina, kalsekwestryna kryształina, podjednostki kanałów wapniowych	

W tabeli 1 podano jedną z klasyfikacji białek wiążących wapń. Zasadniczym elementem tego podziału, określającym przynależność do danej grupy, jest budowa miejsca wiązania jonu wapnia. Na tej podstawie wyróżnia się trzy klasy: białka zawierające motywy „EF-hand”, białka zawierające domenę aneksyn oraz białka o innych, najczęściej nieokreślonych miejscach wiązania jonu wapnia. Klasyfikacji białek „EF-hand” dokonuje się przede wszystkim na podstawie liczby miejsc wiązania jonów wapnia w cząsteczce, a następnie w oparciu o lokalizację genów w określonym porządku na

chromosomach i na podstawie innych cech, na przykład dodatkowych domen funkcjonalnych.

Z uwagi na bardzo dużą liczbę i różnorodność białek wiążących wapń, w niniejszym artykule będą opisane podstawowe właściwości kalmoduliny i białek przez nią aktywowanych oraz właściwości niektórych białek o komórkowo i tkankowo specyficznym występowaniu. W podsumowaniu przedyskutowany będzie stan badań nad białkami wiążącymi wapń, w aspekcie ich komórkowo i tkankowo specyficznej lokalizacji oraz możliwości praktycznego zastosowania badań dotyczących tych białek.

KALMODULINA I BIAŁKA PRZEZ NIĄ AKTYWOWANE

Kalmodulinę odkryto jako białko aktywujące fosfodwuesterazę cAMP i dlatego początkowo nazywano ją aktywatorem białkowym. Dopiero, gdy okazało się, że aktywator ten wiąże jony wapnia, występuje we wszystkich komórkach eukariotycznych oraz aktywuje wiele enzymów i białek strukturalnych nazwano go kalmoduliną. Kalmodulina występuje przede wszystkim w cytoplazmie, ale także w jądrze komórkowym, centrosomach lub też w formie związanej z błonami komórkowymi. Tkanka nerwowa zawiera najwięcej kalmoduliny i białek z nią oddziałujących. Niektóre z tych białek omówiono poniżej. Wśród nich, oprócz wspomnianej fosfodwuesterazy, są kinaza białkowa II zależna od kalmoduliny (zwana też enzymem pamięci), kalcyneuryna (fosfataza białkowa), cyklaza adenylanowa, ATPaza wapniowa oraz kinaza lekkich łańcuchów miozyny.

KINAZA II ZALEŻNA OD KALMODULINY

Kinaza II zależna od wapnia i kalmoduliny występuje w dużych ilościach w tkance nerwowej. Enzym ten występuje w komórce we frakcji rozpuszczalnej, a także może być połączony z błoną jądrową oraz elementami cytoszkieletu. *In vitro* kinaza II przyłącza resztę fosforanową do różnych białek, takich jak synapsyna, MAP-2, hydroksylaza tyrozyny, syntaza glikogenu, fosfolamban. Niektóre z tych białek wydają się być również substratami tego enzymu *in vivo*, a zmiany w stopniu ich ufosforylowania wpływają między innymi na syntezę i uwalnianie neurotransmiterów. Enzym ten dzięki zdolności do autofosforylacji po aktywacji kalmoduliną i zmianie konformacji staje się niezależny od kalmoduliny. A zatem, do czasu odłączenia reszty fosforanowej, „pamięta” sygnał aktywacji, czyli wzrost stężenia jonów

wapnia, który uaktywnił kalmodulinę. Sugeruje się zatem, że kinaza II odczytuje częstotliwość oscylacji zmian poziomu wapnia w komórce.

KALCYNEURYNA

Kalcyneuryna, to jedyna fosfataza zależna od wapnia i kalmoduliny. Składa się ona z podjednostki katalitycznej (A) o masie 60 kDa wiążącej kalmodulinę i podjednostki regulatorowej (B) o masie 19 kDa. Podjednostka B wiąże 4 jony wapnia, podobnie jak kalmodulina. Zarówno podjednostka B, jak i kalmodulina, są niezbędne by w obecności wapnia uzyskać maksymalną aktywność kalcyneuryny. Kalcyneuryna jest fosfatazą odłączającą reszty fosforanowe z reszt seryny i treoniny, między innymi w podjednostce alfa kinazy fosforylasy, w podjednostce regulatorowej kinazy A, w białku MAP2 i tau, w podjednostce jednego z typów kanału wapniowego, w niektórych czynnikach transkrypcyjnych. Aktywność kalcyneuryny jest hamowana między innymi przez kompleksy leków immunosupresyjnych z odpowiednimi białkami (np. przez kompleks cyklosporyny z cyklofiliną). Kompleksy te powodują tak zwany efekt immunosupresyjny, polegający na zahamowaniu wytwarzania limfocytów T i zmniejszeniu syntezy interleukiny II. Synteza tego związku jest spowodowana defosforylacją czynnika transkrypcyjnego, odpowiedzialnego za aktywację genu interleukiny II. Najnowsze wyniki wskazują, że kalcyneuryna może być inaktywowana przez dysmutazę ponadtlenkową, a reaktywowana przez kwas askorbinowy. Sugeruje się, że kalcyneuryna może być białkiem sprzęgającym homeostazę wapniową ze stanem redoks w komórce.

CYKLAZA ADENYLANOWA TYPU I

Cyklaza adenylnowa typu I jest enzymem stymulowanym przez jony wapnia i kalmodulinę. Działa ona przeciwnie do fosfodwusteryazy cAMP, inaktywując ten związek. Metodą hybrydyzacji *in situ* wykazano, że cyklaza adenylnowa typu I występuje w dużych ilościach w neuronach hipokampa mózgu szczura. Sugeruje się, że aktywacja cykazy zachodzi w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów wapnia wewnątrz komórki, a to z kolei powoduje wzrost stężenia cAMP i aktywację kinazy białkowej A. W ten sposób enzym ten sprzęga homeostazę wapniową z homeostazą cyklicznych nukleotydów.

ATPaza WAPNIOWA

Nadmiar wapnia jest usuwany na zewnątrz komórek eukariotycznych (z wyjątkiem drożdży) za pośrednictwem zlokalizowanej w błonie plazmatycznej ATPazy wapniowej. Aktywność tego enzymu zależy między innymi od kalmoduliny i kwaśnych fosfolipidów. Znanych jest ponad 20 różnych izoform ATPazy wapniowej, które pojawiają się w różnych

tkankach i na różnych etapach rozwoju organizmu. Transkrypcja niektórych genów ATPazy wapniowych jest aktywowana przez jony wapnia za pośrednictwem skomplikowanych mechanizmów sygnałowych. ATPazy wapniowe znajdujące się w błonach endoplazmatycznego retikulum mają podobną budowę, lecz ich działanie nie zależy od kalmoduliny.

KINAZA LEKKICH ŁAŃCUCHÓW MIOZYNY

Kinaza lekkich łańcuchów miozyny uczestniczy w aktywacji aktomiozyny w komórkach niemięśniowych i w komórkach mięśni gładkich. Inicjacja skurczu w mięśniach gładkich zachodzi dzięki fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny katalizowanej przez tę kinazę. W mięśniach poprzecznie prążkowanych lekki łańcuch miozyny jest również fosforylowany, ale nie jest w pełni wyjaśnione, czy i jaką rolę odgrywa w modulowaniu skurczu tych mięśni. Wiadomo jest natomiast, że inicjacja skurczu tych mięśni odbywa się za pośrednictwem kompleksu białek, którego składnikiem jest troponina C — białko wiążące wapń podobne do kalmoduliny.

BIAŁKA O KOMÓRKOWO I TKANKOWO SPECYFICZNEJ LOKALIZACJI

Organizm tkankowy składa się z wielu typów wyspecjalizowanych komórek o określonym kształcie, właściwościach i funkcjach biologicznych. Komórki te zawierają, oprócz białek występujących we wszystkich typach komórek również i takie, które są dla nich charakterystyczne. Dzięki tym specyficznym białkom komórki uzyskują określone właściwości i mogą pełnić określone funkcje. Wśród białek wiążących wapń są właśnie takie, które występują tylko w pewnych komórkach i tkankach. Do tej grupy białek należą między innymi kal-

bindyna D28K, kalretynina, białka z rodziny rekoweryny, parwalbumina, troponina C oraz białka z rodziny S100 (tab. 2).

KALBINDYNA D28K I KALRETYNINA

— ZNACZNIKI NEURONÓW

Kalbindyna D28K i kalretynina to białka zawierające 6 motywów „EF-hand” i mające masę cząsteczkową około 30 kDa. Kalbindyna jest białkiem znanym od kilkunastu lat, występującym w dużych ilościach w nabłonku je-

Tabela 2. Białka wiążące wapń występujące w określonych tkankach i komórkach

Białko	Tkanki/komórki
Kalbindyna D28K	nabłonek jelita, neurony
Kalretynina	neurony
Rekoweryna i białka homologiczne	siatkówka oka, neurony
Parwalbumina	mięśnie, neurony
Troponina C	mięśnie poprzecznie prążkowane
S100A1	neurony, mięśnie
S100A2	płuca, nerki
S100A6 (kalcyklina)	fibroblasty, komórki nabłonka, neurony
S100A8	granulocyty, monocyty
S100B	komórki gleju, melanocyty
S100P	łożysko
kalbindyna D9K	nabłonek jelita

lita i biorącym udział w akumulacji jonów wapnia, znajdujących się w przewodzie pokarmowym. Synteza kalbindyny D28K zwiększa się pod wpływem witaminy D₃. Białko to występuje też w niektórych komórkach nerki oraz w niektórych neuronach. W tych ostatnich, synteza kalbindyny D28K nie zależy od witaminy D₃. Ostatnio wykazano, że myszy pozbawione genu kalbindyny D28K na skutek manipulacji genetycznych, przeżywają i zachowują swoje cechy anatomiczne. Jednocześnie nie zaobserwowano u tych zwierząt podwyższonego poziomu innych białek wiążących wapń, co mogłoby rekompensować brak kalbindyny D28K. W testach sprawności ruchowej, na przykład zdolności do przechodzenia przez długą kładkę, myszy pozbawione kalbindyny D28K okazywały się bardzo nieporadne, w przeciwieństwie do myszy kontrolnych, które bezbłędnie przechodziły przez tę samą kładkę. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że brak kalbindyny D28K hamuje pewne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórkach neuronów.

Kalretynina jest białkiem znanym od niedawna. Po raz pierwszy zidentyfikowano ją w siatkówce oka i neuronach mózgu. Podczas rozwoju kalretynina ulega ekspresji tylko w pewnych grupach neuronów, takich jak komórki Cajal-Reitzus kory mózgowej i hipokampa. Równie ciekawa jest rzadko występująca pozaneuronalna lokalizacja kalretyniny. Przykładowo, białko to jest specyficznym znacznikiem niektórych rodzajów komórek nowotworowych, na przykład linii komórkowej WiDr z ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy i złośliwego śródbłoniaka opłucnej. Ponieważ degeneracji komórki często towarzyszy wysokie stężenie jonów wapnia, sugeruje się, że neurony zawierające kalbindynę D28K, kalretyninę i parwalbuminę (parwalbuminie jest poświęcony oddzielny paragraf), mają większą zdolność do buforowania jonów wapnia i w związku z tym mogą być bardziej odporne na procesy degeneracyjne. Działanie neuroprotektoryjne tych białek przeciwko nadmiarowi jonów wapnia nie jest jednak powszechnie akceptowane.

REKOWERYNA I BIAŁKA HOMOLOGICZNE

Rekoweryna i białka o podobnej strukturze i funkcji stanowią grupę białek odkrytą dopiero w ostatnim dziesięcioleciu. Poszczególne białka tej rodziny występują w różnych neuronach i prawdopodobnie pełnią funkcję specyficznych sensorów w różnych grupach neuronów. Najbardziej znanym z tych białek jest rekoweryna, białko występujące w siatkówce

oka. Inne białka to neurokalcyna, wizyna, S-modulina, frekwenina, hipokalcyna, wilipina. Wszystkie te białka wykazują daleko idącą homologię względem siebie. Są to globularne cząsteczki o masie około 23 kDa, zawierające 4 motywy „EF-hand”. Większość z tych białek (rekoweryna, S-modulina, wilipina i hipokalcyna) hamuje proces fosforylacji rodopsyny i tym samym może przedłużać aktywność fosfodwuesterazy cGMP w pręcikach siatkówki. Inne, jak frekwenina, wydają się uczestniczyć w uwalnianiu neurotransmiterów. Niektóre, na przykład neurokalcyna, hamują polimeryzację tubuliny. Chociaż nie wiadomo jaką funkcję *in vivo* pełni rekoweryna i białka homologiczne to jednak wydaje się, że w komórkach neuronów odgrywa istotną rolę w przekazywaniu sygnału przez błonę synaptyczną.

PARWALBUMINA — BIAŁKO MIĘŚNI I NEURONÓW

Parwalbuminę zidentyfikowano po raz pierwszy w mięśniach szkieletowych, gdzie jak sądzi się, pełni ona rolę czynnika ułatwiającego rozkurcz mięśni szybkich. Było to pierwsze białko wiążące wapń, dla którego określono strukturę trzeciorzędową i stworzono hipotezę motywów „EF-hand”. Kilka lat później parwalbuminę zidentyfikowano w komórkach niemięśniowych, w tym w tkance nerwowej. Parwalbumina występuje między innymi w neuronach mózdzku, hipokampa, opuszek węchowych i niektórych regionów podwzgórza. Podobnie jak kalbindyna D28K i kalretynina białko to jest swoistego rodzaju znacznikiem neuronów. Wiadomo, że w mózgu dorosłego szczura występuje przede wszystkim w neuronach zawierających kwas gamma-aminomasłowy (GABA).

TROPONINA C — BIAŁKO MIĘŚNI POPRZECZNIE PRAŻKOWANYCH

Troponina C jest składnikiem aparatu regulującego skurcz mięśni poprzecznie prążkowanych. Już w 1963 roku zidentyfikowano i wyizolowano z mięśni szkieletowych królika troponinę — białko regulujące skurcz mięśni. Pod koniec lat siedemdziesiątych udowodniono, że troponina składa się z trzech podjednostek, z których jedna (troponina C) wiąże wapń. W kompleksie z pozostałymi składnikami troponiny oraz tropomiozyną troponina C uczestniczy w zależnej od jonów wapnia inicjacji skurczu mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego. Troponina C nie występuje w mięśniach gładkich, a regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego tych mięśni odbywa się z udziałem kalmoduliny.

BIAŁKA S100 — RODZINA BIAŁEK O NIE ZNANEJ FUNKCJI

Białka z rodziny S100 pojawiają się na określonym etapie rozwoju i w określonych komórkach, czyli wykazują charakterystyczne czasowe i przestrzenne występowanie w organizmie. Dzięki temu białka S100 są doskonałymi wskaźnikami danego typu komórek, a ich geny stanowią wygodny materiał do badania mechanizmów komórkowo specyficznej ekspresji genów. Obecnie znanych jest co najmniej 13 genów białek S100 u człowieka. Większość tych genów jest zlokalizowana na jednym chromosomie (1q21) w postaci zbioru podobnego do zbioru genów globiny. Białka S100 zawierają dwa motywy „EF-hand” jako miejsca wiązania jonów wapnia. Jeden z nich to typowa struktura „EF-hand” o wysokim powinowactwie w stosunku do jonów wapnia, drugi motyw posiada sekwencję charakterystyczną dla białek S100 i jest to miejsce o niskim powinowactwie względem jonów wapnia. Większość białek S100 tworzy dimery, co może zasadniczo zmieniać ich aktywność biologiczną. Na przykład w przypadku białka S100 beta udowodniono, że tylko dimer wykazuje aktywność neurotroficzną i mitogeniczną. Nie wiadomo jednak, czy *in vivo* aktywność biologiczna dimerów białek S100 jest zachowana.

Sugeruje się, że białka S100 mogą pełnić określone funkcje tak wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki, między innymi mogą brać udział w progresji cyklu komórkowego, w różnicowaniu komórek oraz w wydzielaniu określonych substancji do przestrzeni międzykomórkowych.

Określenie wspólnych cech budowy białek S100 jest istotnym elementem umożliwiającym poznanie funkcji tych białek. Do niedawna jedynym białkiem, którego strukturę dobrze poznano, była kalbindyna D9K, lecz białko to nie jest typowym przedstawicielem rodziny S100. W 1995 roku opublikowano wyniki dotyczące struktury trzeciorzędowej i czwartorzędowej kalcykliny, typowego przedstawiciela rodziny białek S100. Choć gen kalcykliny znany był wcześniej, to po raz pierwszy oczyszczono ją i scharakteryzowano w naszym laboratorium w 1987 roku. Białko to występuje w cytosolu tylko niektórych typów komórek, takich jak komórki nabłonkowe, fibroblasty, płytki krwi ssaków oraz niektóre neurony. Nie wiadomo jaką funkcję pełni kalcyklina, ale wydaje się, że podobnie jak kalmodulina, aktywuje w obecności jonów wapnia inne białka, między innymi aneksynę XI oraz nowe białko o masie 30 kDa (p30).

PODSUMOWANIE

Poszczególne białka wiążące wapń różnią się między sobą liczbą miejsc wiązania tych jonów, powinowactwem względem nich i wrażliwością na różnorodne białkowe i niebiałkowe czynniki. Ponadto białka te występują w różnym stężeniu albo we wszystkich komórkach, albo tylko w niektórych typach komórek i tkanek i mogą pełnić jedną szczególną funkcję lub też, jak kalmodulina, mogą brać udział w wielu procesach komórkowych. Badanie komórkowo specyficznej ekspresji białek wiążących wapń jest istotne w wyjaśnieniu ekspresji innych białek charakterystycznych dla danej tkanki. Zrozumienie mechanizmów komórkowo specyficznej ekspresji danego genu daje możliwość opracowania metod, za pomocą których można będzie selektywnie włączać lub wyłączać poszczególne geny w celach terapeutycznych. Ponadto znajomość sekwencji DNA, odpowiedzialnych za komórkowo specyficzną ekspresję może być wykorzystana do konstrukcji wektorów stosowanych w terapii genowej lub immunizacji genetycznej.

Z pośród 200 znanych białek wiążących

wapń tylko kilkanaście z nich ma określoną funkcję biologiczną. Pozostała część to białka, których funkcja nie jest jednoznacznie wyjaśniona. Interesującą właściwością białek wiążących wapń jest to, że w niektórych stanach patologicznych zmienia się ich poziom lub aktywność biologiczna. Na przykład podwyższony poziom białek z rodziny S100 występuje w mózgu pacjentów z chorobą Downa, Alzheimera, w epilepsji; zwiększony poziom rekoweryny pojawia się w nowotworze siatkówki; zmniejszony poziom kalbindyny D9K i D28K występuje przy niedoborze witaminy D₃ i zmniejszonej akumulacji wapnia. Ponieważ wiele białek wiążących wapń występuje tylko w określonych typach komórek prawidłowych lub po ich stymulacji czynnikami wzrostowymi lub onkogenami, białka te mogą być znacznikami immunohistologicznymi niektórych stanów patologicznych i efektów terapii. Jednak ilościowe oznaczanie poziomu białek wiążących wapń w oparciu o reakcję immunologiczną powinno być interpretowane ostrożnie, gdyż konformacja białek wiążących wapń zmienia się po

przyłączeniu jonów wapnia, a tym samym zmienia się też ich immunoreaktywność. Wydaje się jednak, że w najbliższym czasie powszechnie stosowane metody diagnostyczne,

oparte na reakcji antygeny z przeciwciałem, będą zastępowane nowymi metodami opartymi na badaniach genów białek wiążących wapń.

HETEROGENEITY AND MULTIFUNCTIONALITY OF CALCIUM BINDING PROTEINS (CaBP)

Summary

Calcium binding proteins (CaBP) differ in their structures and affinities for calcium ions and may perform various functions in eukaryotic cells. Calmodulin, a typical EF-hand calcium binding protein, is a ubiquitous protein which can activate many enzymes and is thus involved in many processes. Other calcium binding proteins are fo-

und only in certain cells and tissues and their function may be unique and cell specific. In this report we focus on calmodulin, its target proteins and on some of the EF-hand calcium binding proteins which are distributed in a cell in tissue specific manner.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

- CELIO M. R., (red), 1996. *Guidebook to the Calcium-Binding Proteins*. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press.
- FILIPEK A., KUŹNICKI J., 1993. *Calcyclin — from basic research to clinical implications*. Acta Biochim. Polon. 40, 321-327.
- FILIPEK A., 1993. *Białka wiążące wapń występujące w układzie nerwowym*. Post. Biochem. 39, 126-133.
- HEIZMANN C. W., (red), 1991. *Novel Calcium Binding Prote-*

- ins: Fundamentals and Clinical Implications*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- KUŹNICKI J., KORDOWSKA J., 1992. *Białka wiążące wapń jako markery stanów patologicznych*. Kosmos 41, 105-121.
- KUŹNICKI J., LEŚNIAK W., 1996. *Mechanizmy komórkowo-specyficjnej ekspresji genów — badania odcinków promotorowych*. Post. Biol. Kom. 23, supl. 7, 3-54.
- LEŚNIAK W., 1989. *Interakcja kalmoduliny z jej białkami docelowymi*. Post. Biochem. 35, 63-88.