

Uloga kalcija u prijenosu signala

Stipanović, Narda

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:637055>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO –TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ULOGA KALCIJA U PRIJENOSU SIGNALA

ZAVRŠNI RAD

Narda Stipanović

Matični broj: 327

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ULOGA KALCIJA U PRIJENOSU SIGNALA

ZAVRŠNI RAD

Narda Stipanović

Matični broj: 327

Split, rujan 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ROLE OF CALCIUM IN SIGNAL TRANSDUCTION

BACHELOR THESIS

Narda Stipanović

Parent number: 327

Split, rujan 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Nastavni predmet: Biokemija

Tema rada: je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta.

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan

Pomoć pri izradi:

ULOGA KALCIJA U PRIJENOSU SIGNALA

Narda Stipanović, 327

Sažetak

Ljudski organizam je izgrađen od velikog broja minerala, a jedan od najzastupljenijih je kalcij. Većina tog minerala se nalazi u kostima gdje ima funkciju održavanja gustoće i čvrstoće. Kalcij se ne može proizvesti u tijelu pa ga moramo uzimati hranom. Za njegovu apsorpciju osobito je važan vitamin D. Pronađeno je da Ca^{2+} nije raspoređen u cijeloj stanici, a tehnologija protočne citometrije nudi brojne prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike za mjerenje unutarstaničnog Ca^{2+} . Poremećaj normalnog signala Ca^{2+} doprinosi razvoju malignih fenotipova.

Unutarstanični protein, kalmodulin, posrednik je u mnogim djelovanjima kalcija jer mu omogućava gibanje iz jednog dijela stanice u drugi. Koncentracijom kalcijevih iona regulirana je propusnost pukotinskih spojeva.

Promjena unutarstanične homeostaze Ca^{2+} može inicirati nastanak tumora. Stanice raka koriste iste kanale kalcija i pumpe kao i nemaligne stanice. Prijelaz Ca^{2+} preko plazmatske membrane u stanicu, ključni je okidač ili regulator staničnih procesa za napredovanje tumora. Tumor označava skup izmijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast tkiva. Proces tijekom kojeg se normalne stanice pretvore u tumorske stanice se naziva neoplastičnom pretvorbom. Zloćudni tumor koji može biti opasan za život naziva se rakom (cancer).

Ključne riječi: kalcij, prijenos signala, rak

Rad sadrži: 23 stranica, 14 slika, 11 literalnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Doc. dr. sc. Mila Radan - član-mentor

Datum obrane: 27.09.2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Rudera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Undergraduate Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Course title: Biochemistry

Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan

Tehnickal assistance:

ROLE OF CALCIUM IN SIGNAL TRANSDUCTION

Narda Stipanović, 327

Abstract:

The human body is made of a large number of minerals, and one of the most commonly present is calcium. Most of this mineral is in bones where it has the function of maintaining the density and strength. Calcium cannot be produced in the body so we have to take it with food. Vitamin D is particularly important for its absorption. Ca^{2+} was not found throughout the cell and the flow cytometry technology offers many advantages over traditional techniques for measuring intracellular Ca^{2+} level. The disorder of normal Ca^{2+} signal contributes to the development of malignant phenotypes. Physiologically, calcium can be divided into either intracellular or extracellular.

Calcium-binding intracellular protein, calmodulin, is an intermediary molecule in many calcium activities because it allows its movement from one part of the cell to another.

Intracellular Ca^{2+} homeostasis changes in the cancer cell and change is also involved in tumor initiation. Cancer cells use the same calcium channels and pumps as non-malignant cells. Transition of Ca^{2+} through the plasma membrane is a key trigger of cellular processes in tumor progression. Tumor represents a set of changed cells that show an irregular and progressive tissue growth. The process of transforming normal cells into tumor cells is called a neoplastic transformation. A malignant tumor that can be life-threatening is called cancer.

Keywords: calcium, signal transduction, cancer

Thesis contains: 23 pages, 14 figures, 11 references

Original in: Croatian

Defence Committee:

1. Olivera Politeo – PhD. Associate prof. - chairperson
2. Franko Burčul – PhD. Assistant prof.- member
3. Mila Radan – PhD. Assistant prof.- supervisor

Defence date: 27.09.2018.

Printed and electronic (pdf version) of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od travnja do srpnja 2018. godine.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Mili Radan koja mi je svojim prenesenim znanjem pomogla u izradi ovog završnog rada.

Od srca zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i prijateljima na pruženoj potpori i vjeri u mene tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Proučiti ulogu kalcija u ljudskom organizmu.
- Proučiti ulogu kalcija kao sekundarnog prenositelja signala.
- Proučiti kako koncentracija kalcija utječe na organizam.

SAŽETAK

Ljudski organizam izgrađen je od velikog broja minerala, a jedan od najzastupljenijih je kalcij. Većina tog minerala nalazi se u kostima gdje ima funkciju održavanja gustoće i čvrstoće. Kalcij se ne može proizvesti u tijelu pa ga moramo uzimati hranom. Za njegovu apsorpciju osobito je važan vitamin D. Pronađeno je da Ca^{2+} nije raspoređen u cijeloj stanici, a tehnologija protočne citometrije nudi brojne prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike za mjerenje unutarstaničnog Ca^{2+} . Poremećaj normalnog signala Ca^{2+} doprinosi razvoju malignih fenotipova.

Unutarstanični protein, kalmodulin, posrednik je u mnogim djelovanjima kalcija jer mu omogućava gibanje iz jednog dijela stanice u drugi. Koncentracijom kalcijevih iona regulirana je propusnost pukotinskih spojeva.

Promjena unutarstanične homeostaze Ca^{2+} može inicirati nastanak tumora. Stanice raka koriste iste kanale kalcija i pumpe kao i nemaligne stanice. Prijelaz Ca^{2+} preko plazmatske membrane u stanicu, ključni je okidač ili regulator staničnih procesa za napredovanje tumora. Tumor označava skup izmijenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast tkiva. Proces tijekom kojeg se normalne stanice pretvore u tumorske stanice se naziva neoplastičnom pretvorbom. Zloćudni tumor koji može biti opasan po život naziva se rakom.

ključne riječi: kalcij, prijenos signala, rak

SUMMARY

The human body is made of a large number of minerals, and one of the most commonly present is calcium. Most of this mineral is in bones where it has the function of maintaining the density and strength. Calcium cannot be produced in the body so we have to take it with food. Vitamin D is particularly important for its absorption. Ca^{2+} was not found throughout the cell and the flow cytometry technology offers many advantages over traditional techniques for measuring intracellular Ca^{2+} level. The disorder of normal Ca^{2+} signal contributes to the development of malignant phenotypes. Physiologically, calcium can be divided into either intracellular or extracellular.

Calcium-binding intracellular protein, calmodulin, is an intermediary molecule in many calcium activities because it allows its movement from one part of the cell to another.

Intracellular Ca^{2+} homeostasis changes in the cancer cell and change is also involved in tumor initiation. Cancer cells use the same calcium channels and pumps as non-malignant cells. Transition of Ca^{2+} through the plasma membrane is a key trigger or cellular processes in tumor progression. Tumor represents a set of changed cells that show an irregular and progressive tissue growth. The process of transforming normal cells into tumor cells is called a neoplastic transformation. A malignant tumor that can be life-threatening is called cancer.

keywords: calcium, signal transduction, cancer

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1 OPĆI DIO	2
1.1 KALCIJ (Ca)	2
1.2 METABOLIZAM KALCIJA.....	3
1.2.1 PRIJENOS KALCIJA KROZ STANIČNU MEMBRANU	3
1.2.2 SKLADIŠTENJE.....	9
1.2.3 APSORPCIJA KALCIJA	9
1.3 FUNKCIJE KALCIJA U ORGANIZMU	9
1.3.1 STANIČNA SIGNALIZACIJA.....	10
1.4 KALCIJ U STANICAMA RAKA	12
2. TUMORI	14
2.1 POJEDINE TUMORSKE KLASIFIKACIJE	15
2.1.1 KLASIČNA KLASIFIKACIJA.....	15
2.1.2 HISTOGENSKA KLASIFIKACIJA TUMORA.....	15
2.1.3 BIOLOGIJA TUMORSKOG RASTA	16
3. METODA MJERENJA KONCENTRACIJE KALCIJA.....	17
3.1 RAZINE KALCIJA.....	17
3.1.1 NISKE RAZINE KALCIJA	17
3.1.2 VISOKE RAZINE KALCIJA.....	17
3.2 CITOMETRIJA.....	18
3.3 DRUGE METODE VEZANE ZA CITOMETRIJU	18
4. FLUOROSCENTNI INDIKATORI.....	19
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. LITERATURA	23

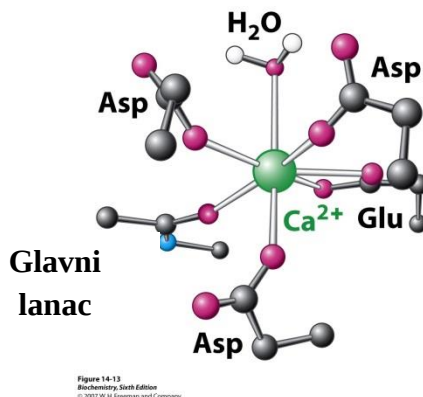
1. UVOD

Ljudski organizam izgrađen je od brojnih minerala, a jedan od najzastupljenijih je kalcij. Većina kalcija nalazi se u kostima gdje održava gustoću i čvrstoću istih. Kalcij se ne može proizvesti u tijelu pa ga moramo uzimati hranom. Ovaj mineral sudjeluje u mnogim vitalnim funkcijama i igra važnu ulogu u putovima prijenosa signala. Kalcij može djelovati u prijenosu signala koji proizlazi iz aktivacije ionskih kanala ili kao drugi glasnik izazvan neizravnim putevima prijenosa signala. Prva pouzdana mjerenja Ca^{2+} iona izvršena su injektiranjem fotoproteina (aquorin) u divovsko, prstenasto mišićno vlakno. Pronađeno je da Ca^{2+} nije raspoređen u cijeloj stanici te da se unutarstanična heterogenost Ca^{2+} promatra u različitim stanicama. S vremenom, tehnologija je uznapredovala pa danas protočna citometrija nudi brojne prednosti u odnosu na tradicionalne tehnike za mjerenje unutarstaničnog Ca^{2+} . Preispituje se promjena unutarstaničnog Ca^{2+} sa drugim parametrima stanice, uključivši analizu staničnog ciklusa, promjene u integritetu stanične membrane i indukciju markera apoptoze. Poremećaj normalnog signala Ca^{2+} doprinosi razvoju malignih fenotipova.

1.1 KALCIJ (Ca)

Kalcij je kemijski element smješten u skupinu zemno-alkalijskih metala. Kemijski simbol u periodnom sustavu elemenata mu je Ca. U prirodi je jedan od najrasprostranjenijih elemenata, mekan, sjajan bijelo-srebrni metal koji polako reagira sa vodenom parom, kisikom i dušikom iz zraka. Gorenjem na zraku daje blještavu narančasto-crvenu svjetlost. Kalcijeve soli su često dobro topljive u vodi, no uključene su i iznimke poput hidroksida, sulfata, fosfata i karbonata.¹

U ljudskom tijelu prema zastupljenosti nalazi se na petom mjestu. Kalcij postoji u 3 fiziokemijska stanja u plazmi: oko 50% je slobodno (ionizirano), 10% je u obliku kompleksa sa malim difuzibilnim organskim i anorganskim anionima, a 40% je vezano za proteine plazme. Biološki aktivni oblik je frakcija slobodnog kalcija. Njegova koncentracija u plazmi je regulirana sa kalcij regulirajućim hormonom 1,25 – dihidroksi-vitaminom D₃ i paratireoidnim hormonom (PTH). Uobičajan način vezanja kalcija je njegova koordinacija sa šest atoma kisika iz proteina i jednim kisikom iz vode. (Slika 1.) Kalcij se veže sa proteinima na negativno nabijena mjesta iz čega vidimo da je vezanje ovisno o pH. Fiziološki, kalcij se može podijeliti na unutarstanični ili izvanstanični. Unutarstanični kalcij ima važnu ulogu u kontrakciji mišića, metabolizmu glikogena i diobi stanica dok izvanstanični kalcij osigurava ione kalcija za mineralizaciju kostiju, koagulaciju krvi, održavanje razine unutarstaničnog kalcija i potencijala plazmatske membrane.

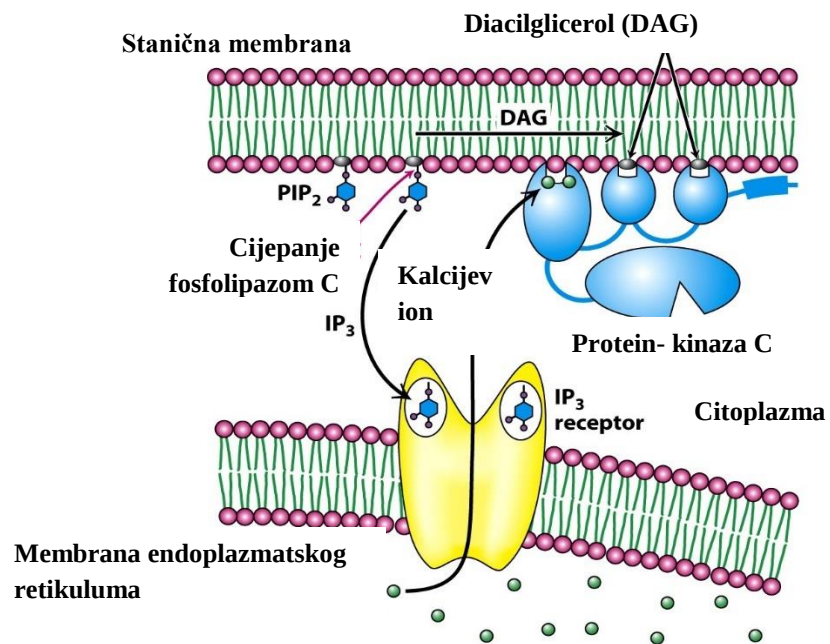


Slika 1. Vezno mjesto kalcija⁴

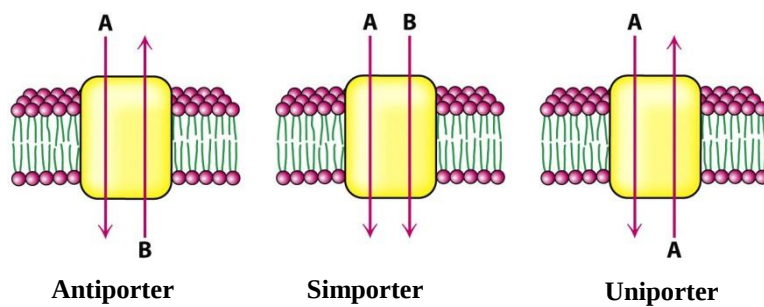
1.2 METABOLIZAM KALCIJA

1.2.1 PRIJENOS KALCIJA KROZ STANIČNU MEMBRANU

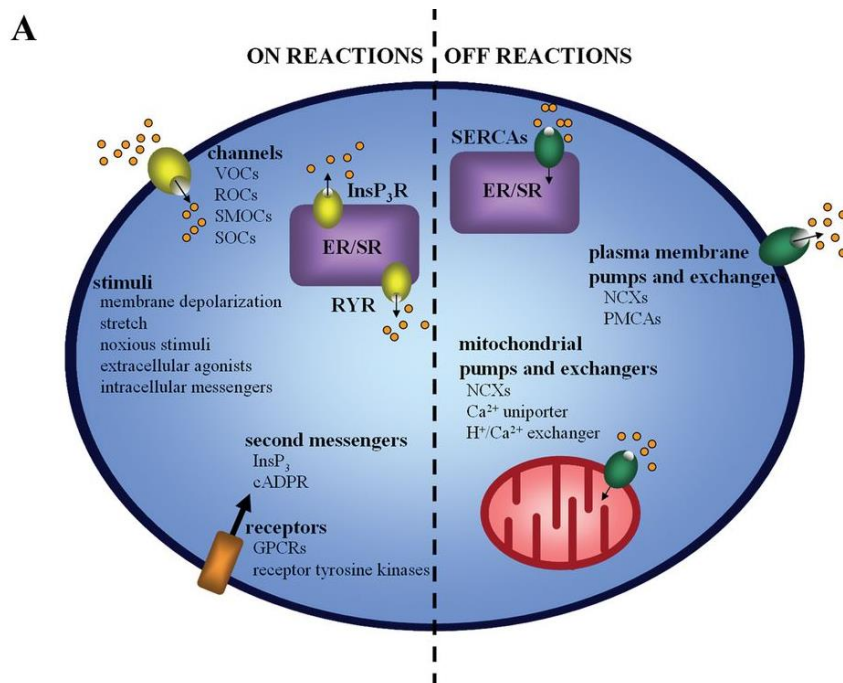
Stanična membrana je izgrađena od lipidnog dvosloja. Lipidni dvosloji su obično fosfolipidi koji imaju hidrofilnu glavu i dva hidrofobna repa. Molekule su orijentirane tako da su hidrofilne fosfatne glave usmjerene prema vodi na obje strane dvosloja, a hidrofobni repovi u unutrašnjosti dvosloja. Putem difuzije ili aktivnim transportom vrši se prijenos lipidnim dvoslojem. Brzina samog transporta ovisi o topljivosti tvari koja se prenosi. Za prijenos iona kalcija koriste se bjelančevinasti kanali i energija u obliku ATP-a. Koncentracija kalcija u citosolu 10000 puta je manja od one u izvanstaničnoj tekućini. Kalcijske crpke održavaju staničnu koncentraciju kalcija u konstantnoj ravnoteži. Jedna kalcijeva crpka ubacuje kalcijeve ione u mitohondrije ili sarkoplazmatski retikulum (SR), a druga kalcijeva crpka se nalazi na staničnoj membrani i izbacuje kalcij iz stanice. Osim kalcijevom crpkom, kalcijevi ioni se prenose i putem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportera koji transportira ione kalcija iz stanice, a u stanicu ione natrija. Unutarstanične razine Ca^{2+} se moraju održavati niskim kako bi se spriječilo taloženje karboksiliranih i fosforiliranih spojeva koji sa Ca^{2+} stvaraju slabo topljive soli. ²



Slika 2. Prijenos kalcija ⁴

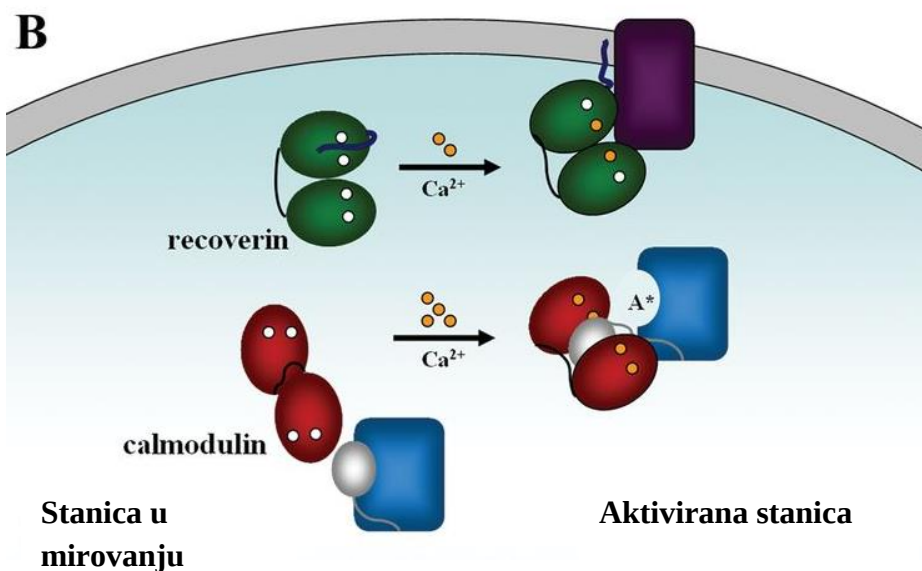


Slika 3. Vrste transportera ⁴



Slika 4. Uloga kalcija u staničnoj signalizaciji ¹¹

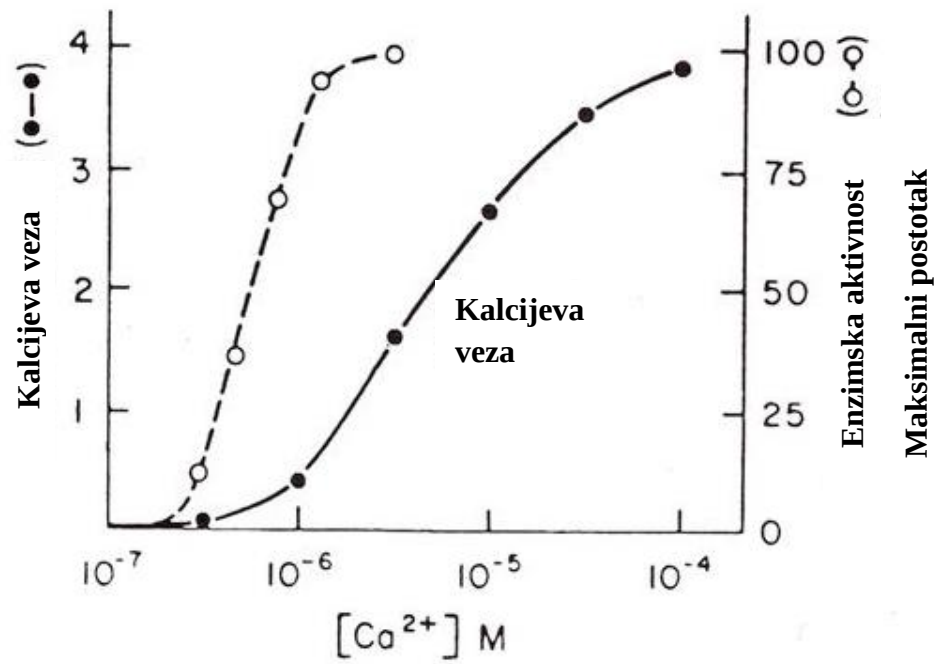
Povećanje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} je uzrokovano reakcijama koje su potaknute različitim podražajima. Povećanje se odvija zbog oslobađanja iz unutarstaničnih područja kao što su endoplazmatski retikulum / sarkoplazamtski retikulum (ER / SR), preko kanala kao što su inozitol (Ins 1,4,5) P3 ili rianodinski receptor (InsP3R i RyR) ili pak ulazom vanjskog Ca^{2+} kroz različite kanale. Proces uključuje naponske operatore hlapljive organske spojeve (VOC), receptore (ROC), druge operatorne glasnike; supramolekularni organizacijski centri (SMOCs) i skladišni kanal (SOCs). Otpuštanje Ca^{2+} iz ER / SR pokreću drugi glasnici, uključujući Ins (1,4,5) P3 (InsP3) i cikličku ADP-ribozu (cADPR). Oni su rezultat signalnih kaskada koje iniciraju receptori koji se nalaze u plazmi. Neki od takvih receptora su G-protein-vezani receptori (GPCRs) i receptorske tirozinske kinaze. Tijekom "isključnih reakcija", Ca^{2+} je uklonjen iz citoplazme jer se ponovno izdvaja u ER / SR putem enzima SERCA koji je pohranjen u mitohondrijima Ca^{2+} uniporterom ili preko NCXs (Na^{+} / Ca^{2+}) i H^{+} / Ca^{2+} . Ca^{2+} može biti istisnut iz stanice i preko NCX i plazma membranske Ca^{2+} ATPaze (PMCA).



Slika 5. Konformacijska promjena nakon senzorskog vezanja kalcija ¹¹

Konformacijska promjena koja nastaje kada senzori vežu Ca^{2+} omogućava da ti proteini budu u interakciji sa svojim proteinskim ciljevima. U slučaju kalmodulin (CaM), Ca^{2+} vezani oblik veže se na autoinhibičnu domenu (siva boja) svog ciljnog enzima (plava), što rezultira izlaganjem aktivnog mjesta (A^*). Za oporavak, Ca^{2+} vezanje rezultira istiskivanjem mijelonilne skupine. Ovaj protein je ciljni protein (ljubičasto) i prikazuje se na plazmatskoj membrani.

C



Slika 6. Usporedba krivulje Ca^{2+} veze sa CaM (●) i krivulje aktivacije enzima njegove ciljne cikličke nukleotidne fosfodiesteraze (○).¹¹

Ovisnost o enzimskoj aktivnosti na Ca^{2+} vezanom stanju CaM je prikazano u grafu. Također je uočljiva i razina Ca^{2+} koja je potrebna za aktivaciju enzima koja je posljedica pozitivne kooperativnosti kroz koju CaM veže Ca^{2+} .

1.2.1.1 MEHANIZAM PUMPANJA Ca^{2+} POMOĆU ENZIMA SERCA

1. Ciklus započinje s enzimom u nefosforiliziranom stanju, sa dva kalcijeva iona. Cjelokupnu konformaciju enzima u tom stanju nazvat ćemo E_1 . U konformaciji sa vezanim ionom Ca^{2+} koju ćemo nazivati $E_1-(\text{Ca}^{2+})_2$, sarkoplazmatska /endoplazmatska retikulum kalcij ATPaza (SERCA) može izmjenjivati kalcijeve ione samo sa kalcijevim ionima sa citoplazmatske strane membrane.
2. U konformaciji E_1 enzim može vezati ATP. Domene N, P, i A se preslaguju i zatvaraju se oko vezanog ATP-a. Kalcijevi ioni su zarobljeni unutar enzima.
3. Fosforilna skupina se zatim prenosi sa molekule ATP na Asp 351.
4. Otpuštanjem molekule ADP, mijenja se konformacija enzima, ali i membranska domena. Takva konformacija se naziva E_2 ili ako je u fosforiliranom obliku $E_2\text{-P}$. U konformaciji $E_2\text{-P}$ vezno se mjesto za Ca^{2+} razara i kalcijevi ioni se otpuštaju na suprotnu stranu membrane od one na koju su ušli. Konformacijski prijelaz iz E_1 u E_2 se naziva izokretanjem.
5. Fosforilaspartatni ostatak se hidrolizira, a fosfat otpušta.
6. Otpuštanjem fosfata nestaju interakcije koje su činile konformaciju E_2 stabiliziranom i enzim se vraća u stanje E_1 .⁴

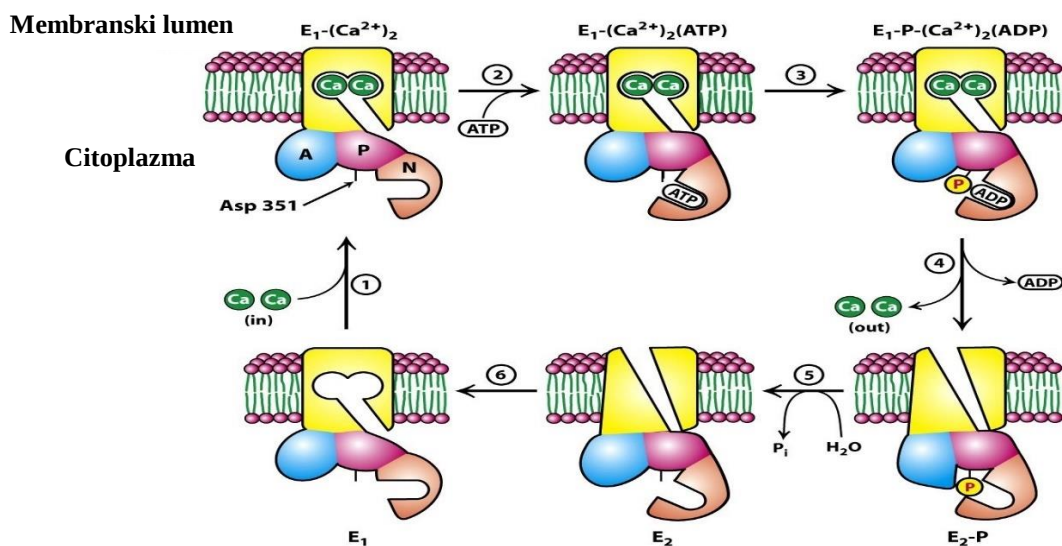


Figure 13-5
Biochemistry, Sixth Edition

Slika 7. Pumpanje kalcija⁴

1.2.2 SKLADIŠTENJE

Sarkoplazmatski retikulum je unutarstanični prostor za pohranjivanje Ca^{2+} . Tijekom mirovanja kalcijevi ioni su aktivnim transportom uvučeni u SR. Prilikom mirovanja, crpka s pogonom na ATP smanjuje koncentraciju kalcijevih iona u citoplazmi i povećava razinu unutar SR.

1.2.3 APSORPCIJA KALCIJA

Divalentni kationi se slabo apsorbiraju kroz crijevnu sluznicu. Oko sedam osmina dnevno unesenog kalcija se ne apsorbira, već se izlučuje izmetom dok preostala osmina se izlučuje mokraćom. Važnu ulogu u povećanju apsorpcije kalcija iz probavnog sustava ima vitamin D. Aktivni proizvod vitamina D je 1,25 – dihidroksikolekalciferol koji nastaje u bubrezima. 1,25-dihidroksikolekalciferol djeluje na pospješene apsorpcije kalcija poticanjem stvaranja proteina koji veže kalcij u epitelnim crijevnim stanicama. Mehanizmom negativne povratne sprege kontrolira se koncentracija 1,25 – dihidroksikolekalciferola i Ca^{2+} u plazmi. Porastom koncentracije kalcijevih iona, smanjuje se razina 1,25-dihidroksikolekalciferola, a time se smanjuje i apsorpcija kalcija iz probavnog sustava. Hormon kalcitonin luči štitna žlijezda, a ima funkciju smanjenja koncentracije iona kalcija u krvi. ²

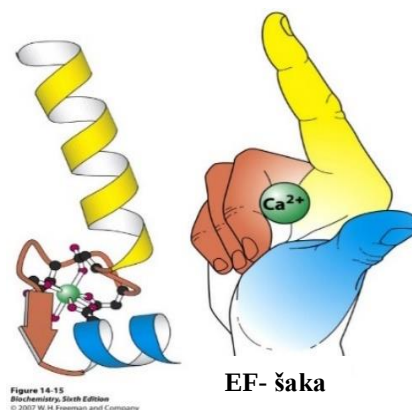
1.3 FUNKCIJE KALCIJA U ORGANIZMU

Većina kalcija se nalazi u kostima i zubima. Osim što kalcij služi kao gradivni element kostura, važan je za rad živčanog i mišićnog sustava, regulira krvni tlak i zgrušavanje krvi te srčani ritam.

1.3.1 STANIČNA SIGNALIZACIJA

Unutarstanični protein koji veže kalcij, kalmodulin, posrednik je u mnogim djelovanjima kalcija jer mu omogućava gibanje iz jednog dijela stanice u drugi. Kalmodulin pripada porodici proteina konfiguracije EF-šake koja se sastoji od uzvojnice, petlje te druge uzvojnice. Kalmodulin sadrži četiri vezna mjesta za kalcij. (Slika7.) Aktivacija kalmodulina dolazi nakon što se koncentracija kalcija poveća na približno $0,5\mu\text{M}$. Kompleks kalcija/ kalmodulina zatim se veže na različite ciljne proteine, uključujući protein-kinaze. CaM-kinaze se aktiviraju pomoću kalcij/kalmodulin kompleksa, a one fosforiliraju metaboličke enzime, ionske kanale i transkripcijske faktore. (Slika8.)^{3, 7}

Kalcij također ima utjecaj na pukotinski spoj (engl. *gap junction*). Pukotinski spoj je vodeni kanal kod eukariota još poznat i kao kanal stanica-stanica. Takav naziv ima jer služi kao put za prolaz između unutrašnjosti stanica koje se dodiruju. Koncentracijom kalcijevih iona regulirana je propusnost pukotinskih spojeva. Postupno zatvaranje tih spojeva je uzrokovano porastom unutarstanične koncentracije Ca^{2+} iona. Pukotinski spoj se sastoji od dviju nasuprotnih cilindričnih jedinica zvanih koneksoni, a konekson se sastoji od šest podjedinica. Konformacijske promjene kao što su klizanja i zakretanja vrše također kalcijevi ioni, a rezultat je otvaranje i zatvaranje pukotinskih spojeva.^{4, 6}



Slika 8. EF-šaka⁴

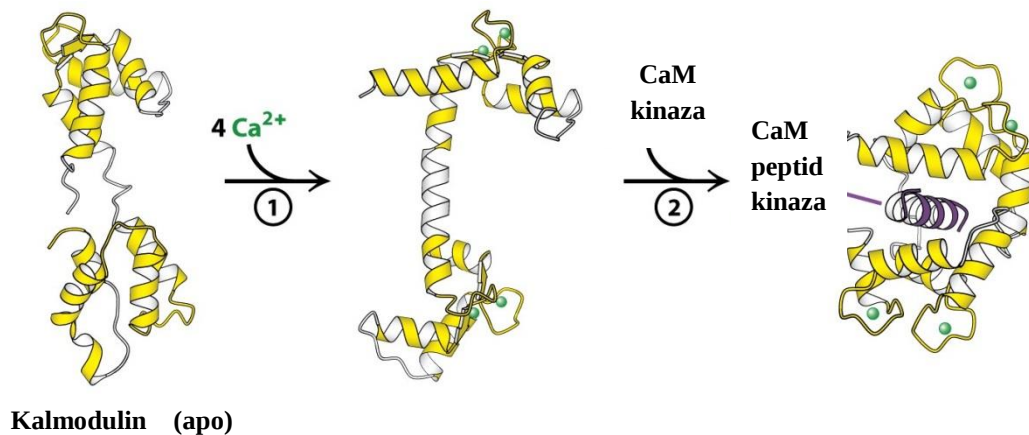


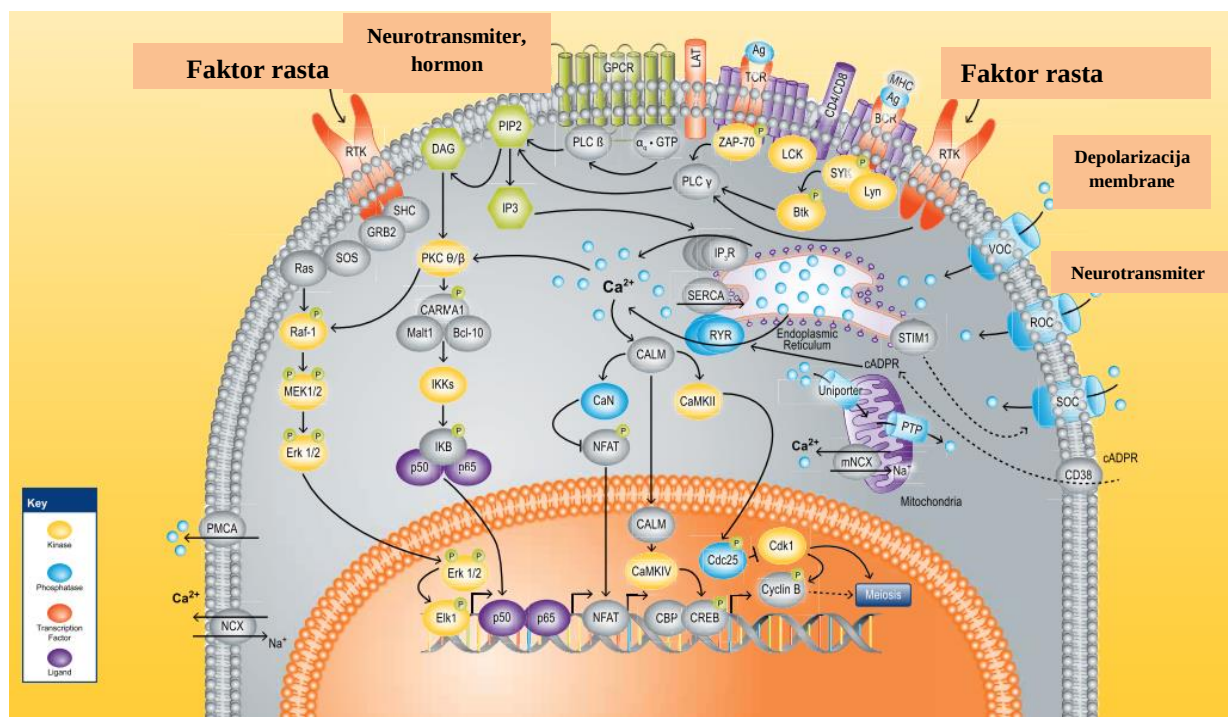
Figure 14-16b
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

Slika 9. Vezanje kalmodulina na α -uzvojnicu ⁴

1.3.1.1 PROVOĐENJE SIGNALA

Specifični površinski stanični receptor prima signal iz okoliša te se primljena poruka zatim pretvara u drugačiji kemijski oblik. Postupak provođenja najčešće obuhvaća više stupnjeva. Signal se višestruko pojačava prije nego što izazove odgovor. Ukupni proces signalizacije je pod nadzorom sustava povratne sprege.

Većina signalnih molekula ne ulazi u stanice. Specifični proteini u staničnoj membrani djeluju kao receptori koji vežu signalne molekule i prenose u samu unutrašnjost stanice. Vezno mjesto na izvansaničnom dijelu, specifično prepoznaje signalne molekule (ligande). Za daljnji prijenos poruke sa kompleksa receptor-ligand služe male molekule koje nazivamo drugim glasnicima. Pri stvaranju drugih glasnika postoji mogućnost višestrukog pojačanja signala. Konačni učinak signalnog puta je poticanje crpki i enzima. Nakon završetka staničnog odgovora, signalni se proces mora prekinuti kako bi stanica mogla odgovoriti na novi signal. Signalni proces koji nije završen ispravno, može izazvati neželjene posljedice. ⁴



Slika 10. Put provođenja signala¹⁰

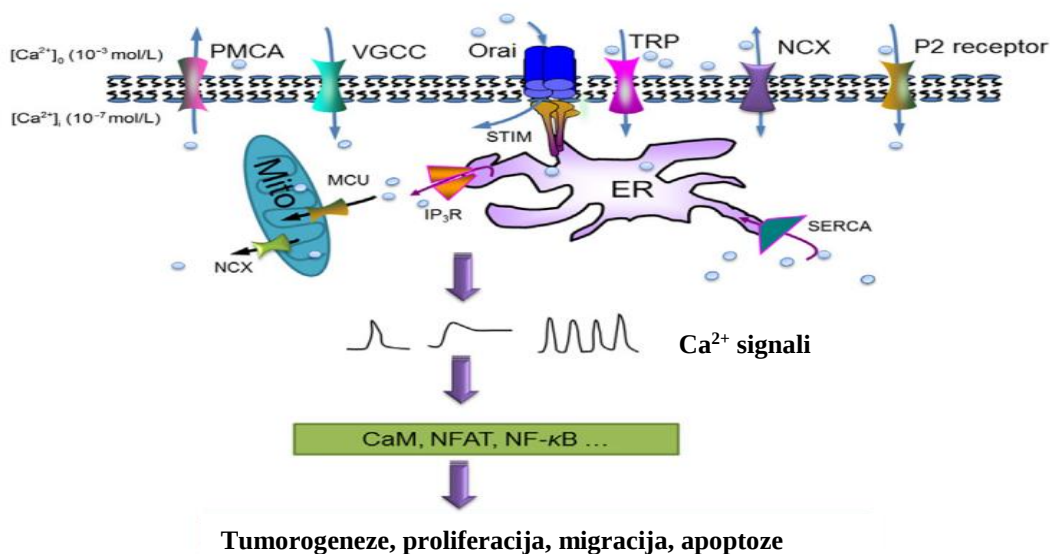
1.4 KALCIJ U STANICAMA RAKA

Promjena unutarstanične homeostaze Ca^{2+} može inicirati nastanak tumora. Produljeno unutarstanično povećanje Ca^{2+} može biti štetno te potaknuti staničnu smrt. Ca^{2+} signali mogu imati oblik valova ili šiljaka. Signalne oscilacije moraju biti prostorno-vremenski blisko regulirane. Kalcijev signal također ima ulogu u procesima važnim za rak kao što je proliferacija i migracija. Veličina, kinetika i prostorni profil citoplazmatskog Ca^{2+} signala sve je važniji u određivanju koji će kalcijev odgovor biti aktivan, kada, te koliko dugo. Stanice raka koriste iste kanale kalcija i pumpe kao i nemaligne stanice. TRP kanali su predloženi kao nova terapijska strategija. Kanali uključeni u biologiju raka su: CRAC, ORAI, STIM, arahidonat- regulirani Ca^{2+} kanal i SOCE. Među članovima Ca^{2+} ATP-aza, SERCA je najbolji te odgovoran za nadopunjavanje endoplazmatskog retikuluma sa Ca^{2+} .⁸

Tablica 1. Kanali/ transporteri u stanicama određenog tipa raka

Kanali/transporteri		Tip raka
IP ₃ R	IP ₃ R 1	Gliom
	IP ₃ R2	Limfocitna leukemija
	IP ₃ R3	Glioma,želučani, rak d.crijeva,vrata i glave
Ca ²⁺ -ATPase	SERCA2	Rak debelog crijeva
	SERCA3	Tumori želuca,pluća, melanom
	SPCA1, SPCA2	Rak dojke
VGCC	Ca _v 1.2	Rak debelog crijeva i jednjaka
	Ca _v 2.3, Ca _v 3.1	Gliom
	Ca _v 3.2	Rak d.crijeva,prostate,jajnika
TRP	TRPC3	Rak dojke i jajnika
	TRPC6	Rak dojke i jednjaka,glioma
	TRPM1	Melanom
	TRPM7, TRPM8	Rak gušterače i rak dojke
	TRPV1, TRPV2	Rak mjehura i prostate
	TRPV4, TRPV6	Rak kože,prostate
Orai i STIM	Orai 1	Gliom,gušterača,bubrega
	Orai 3	Rak dojke,prostate,pluća
	STIM 1, STIM 3	Melanom,rak dojke

Promjenjena stanična lokalizacija,promjenjena aktivnost kroz mutacije gena i promjene u aktivnosti ili izražavanju,povezane su sa specifičnim procesima. Ove promjene se često održavaju u promjenama Ca²⁺ protjecanja preko plazmatske membrane. Prijelaz Ca²⁺ preko plazmatske membrane u stanicu, ključni je okidač ili regulator staničnih procesa za napredovanje tumora, uključujući proliferaciju, migraciju i apoptozu. ⁷



Slika 11. Važni Ca^{2+} kanali / transporteri / pumpe vezani za razvoj raka ⁷

2. TUMORI

Tumor označava skup izmjenjenih stanica koje pokazuju nepravilan i progresivan rast tkiva. Nastanak tumora može uslijediti poremećajem regulacije bilo koje vrste stanica u tijelu, stoga razlikujemo više stotina različitih tumora. Tumor potječe od latinske riječi tumor koja označava oteklinu, a drugi naziv joj je još i novotvorina odnosno neoplazma. Rak je zloćudni tumor koji može biti opasan po život. Znanost koja se bavi proučavanjem novotvorina jest onkologija. Rast novotvorina može biti nesvrhovit, autonoman, parazitarni, nepravilan i neorganiziran.

2.1 POJEDINE TUMORSKE KLASIFIKACIJE

2.1.1 KLASIČNA KLASIFIKACIJA

Tablica 2. Klasična klasifikacija tumora

Klasična klasifikacija tumora	DOBROĆUDNI	ZLOĆUDNI
RAST	Ekspanzivan Polagan Nema lokalne invazije ni metastaza	Infiltrativan Brži rast Lokalna invazija Metastaze (širenje krv/limfa)
MAKRO	Oštro ograničen Dobro opskrbljen krvlju	Nepravilna oblika Česte nekroze
MIKRO	Diferencirane stanice (nalikuju zrelim stanicama) Kromatin raspršen Jezgrice neuočljive	Atipične stanice Pleomorfne jezgre Hiperkromatični kromatin Uočljive jezgrice i mitoze

2.1.2 HISTOGENSKA KLASIFIKACIJA TUMORA

Histogenska klasifikacija nam govori o tkivnom podrijetlu koje utvrđujemo mikroskopski. ⁵

1. epitelni
2. mezenhimalni
3. tumori limfocita i hematopetskih stanica
4. neuralni tumori i srodne novotvorine
5. tumori potpornih stanica živčanog tkiva
6. tumori spolnih stanica

2.1.3 BIOLOGIJA TUMORSKOG RASTA

Proces tijekom kojeg se normalne stanice pretvore u tumorske stanice se naziva neoplastičnom pretvorbom. Genske razlike su kvantitativne i kvalitativne.

Glavne karakteristike progresije od normalne do maligne stanice:

1. Stalni poticaj na staničnu proliferaciju
2. Izbjegavanje usporavanja proliferacije
3. Izbjegavanje apoptoze
4. Gubitak ograničenja proliferacije
5. Neoangiogeneza
6. Invazija, metastaziranje i kolonizacija

Osim toga promjene u staničnom energetske metabolizmu i izbjegavanje imunološkog nadzora je također ključno u progresiji. Što su stanice manje diferencirane, brže rastu. ⁵

Stupnjevi razvoja:

1. Inicijacija
2. Promocija
3. Konverzija
4. Progresija
5. Klonalna ekspanzija
6. Klonalna selekcija

3. METODA MJERENJA KONCENTRACIJE KALCIJA

Površinski markeri pokazuju se korisnima za detektiranje promjena unutarstaničnog kalcija. Mjerenja Ca^{2+} se mogu povezati sa određenim fizičkim svojstvima stanica kao što su električna imedancija, indikator volumena stanice i pokazatelj veličine stanice. Mjerenje protoka kalcija u cjelovitoj krvi zahtjeva korake izolacije koji ometaju aktivaciju trombocita. Digitalna video mikroskopija, konfokalna laserska skenirana mikroskopija, a nedavno i multifoton mikroskopija je omogućila preciznu prostornu analizu intracelularne ionske aktivnosti. Konfokalna mikroskopija omogućuje točnu prostornu i vremensku analizu unutarstaničnog Ca^{2+} uz mjerenje njegove koncentracije.

3.1 RAZINE KALCIJA

3.1.1 NISKE RAZINE KALCIJA

Niska razina kalcija u krvi naziva se hipokalcijemija, a uzrokovana je niskom razinom albumina u krvi. Hipokalcijemija s vremenom može zahvatiti mozak i uzrokovati neurološke simptome.

3.1.2 VISOKE RAZINE KALCIJA

Visoka razina kalcija u krvi naziva se hiperkalcijemijom. Hiperkalcijemiju mogu uzrokovati bilo povećana želučano-crijeva apsorpcija ili povećano uzimanje kalcija. Međutim, najčešći uzrok hiperkalcijemije je hiperparatireoza. Hiperkalcijemiju imaju često ljudi s rakom. Rak bubrega, pluća ili jajnika često luči velike količine proteina koji imaju učinke slične onima paratireoidnog hormona.

3.2 CITOMETRIJA

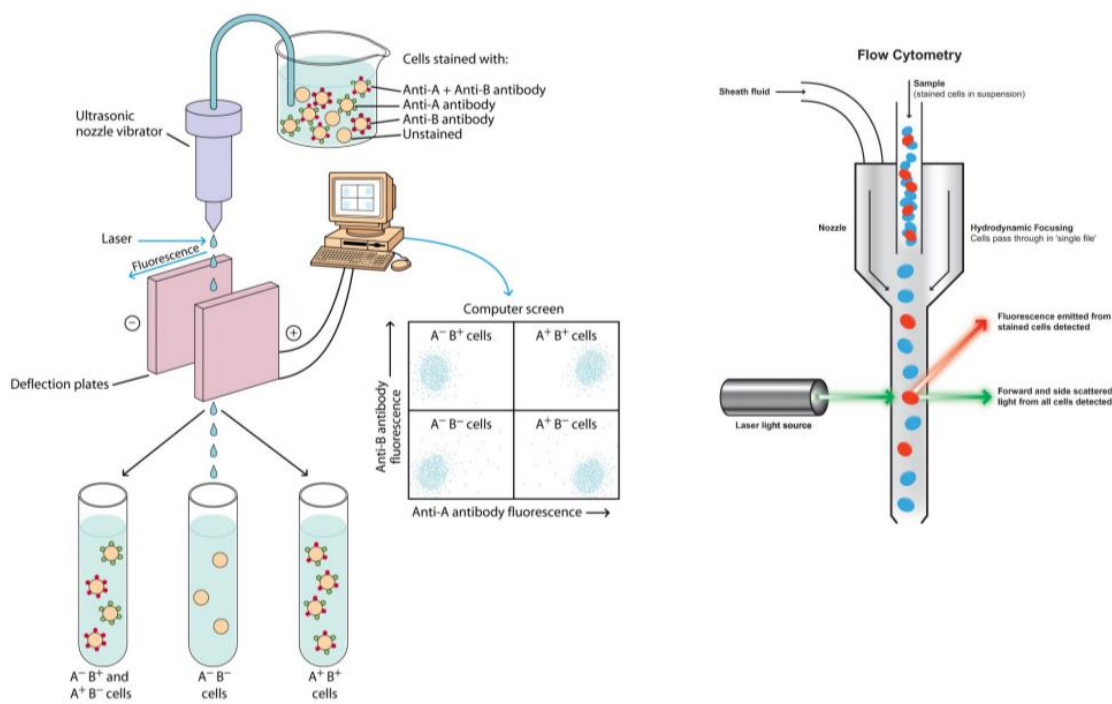
Za visoku preciznost analiza, protočni citometar zahtjeva da se tok tekućine za prijenos stanica prenosi glatko na relativno sporu brzinu. Tijekom umjeravanja citometrije za detekciju Ca^{2+} koristi se ionomicin koji služi kao stanica koja propušta mjerenja unutarstaničnog Ca^{2+} . Citometrija je izvrsna metoda za analizu heterogenosti stanica radi promjena u unutarstaničnom Ca^{2+} . Prednosti citometrije su osjetljivost sustava na mjerenja s istim stanicama iz velikog broja stanica, te sortiranje stanica na temelju promjene u Ca^{2+} . Isto tako postoje i određena ograničenja. Specifične stanice se teško izoliraju ako nemamo smjesu različitih stanica već jednoličnu suspenziju.⁹

Tablica 3. Prednosti i ograničenja citometrije

PREDNOSTI	OGRANIČENJA
Definiranje heterogenosti	Teža kontrola koncentracije izvanstaničnog Ca^{2+}
Definiranje ciljane populacije stanice	Teže pružanje kinetičke analize
Kombinacija s drugim bojama i indikatorima	Nemogućnost praćenja stanice s vremenom
	Ograničen raspon valnih duljina
	Teža kalibracija

3.3 DRUGE METODE VEZANE ZA CITOMETRIJU

Polietilen glikol (PEG) mikrosfere su karakterizirane protočnom citometrijom i fluorescencijom. PEG su polimerne čestice koje imaju sposobnost adsorpcije organskih spojeva i smatra se glavnim nosačem lijeka. U prisutnosti SIgA primijećeno je povećanje postotka apoptotičkih stanica. Najviši apoptozni indeks je opažen kada su stanice tretirane sa PEG mikrosferama s adsorbiranom SIgA. Kolostralni SIgA adsorbiran PEG mikrosferama ima antitumorski učinak na ljudske MCF – 7. Pročišćeni SIgA je prilagođen za 4 g/L do koncentracije od 100 ng/mL. Alikvoti se pohranjuju na -80 °C, a zatim upotrebljavaju za pokuse.



Slika 12. Protočni citometar ⁹

4. FLUORESCENTNI INDIKATORI

Izbor kombinacije fluorescentnih boja ili boja za otkrivanje Ca^{2+} ovisi i o protočnoj citometriji i laserskom sustavu koji će se koristiti. Najčešće korišteni Ca^{2+} indikatori su kemijski fluorescentne sonde. Postalo je popularno koristiti više boja za analizu različitih parametara.

Indikatori kalcija kategorizirani su u nekoliko skupina po njihovim emisijama:

1. Skupina s plavim emisijama: quin 2, indo 1, benzotiaza i fura 2
2. Skupina zelenih: fura 2, BTC, fluo 3, kalcij zelena i BAPTA
3. Žuta i narančasta skupina: kalcij narančasta, kalcij tamnocrvena i rhod 2
4. Crveno i blizu infracrvene emisije: fura crveno

Druga razmatranja u odabiru pokazatelja jest njihova kemijska forma. No, ipak najvažnije razmatranje pri odabiru indikatora je njegov Ca^{2+} vezujući afinitet koji se odražava u konstanti

disocijacije. Pokazatelji visokog afiniteta mogu emitirati svijetlu fluorescenciju i puferirati unutarstanični Ca^{2+} . Jedan od razloga upotrebe indikatora sa niskim afinitetom je radi mjere razine Ca^{2+} u subcelularnim organelima.

Laserski sustavi temeljeni na UV tehnologiji zahtijevaju specijalizaciju optičke komponente koja povećava trošak i smanjuje ukupni intenzitet signala. UV zračenje je više citotoksično od zračenja drugih valnih duljina. ⁹

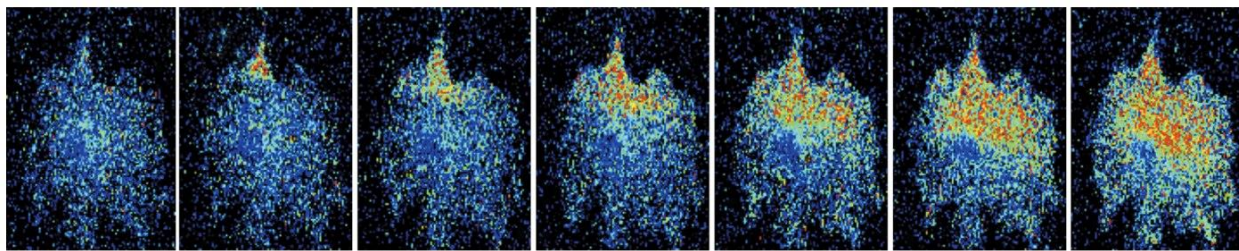


Figure 14-14b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

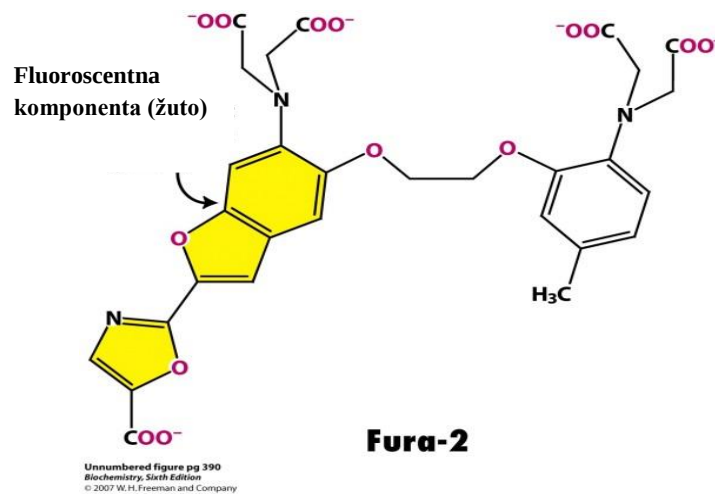
Slika 13. Serijski prikaz širenja kalcija u stanici ⁴

POJEDINI INDIKATORI:

- Quin - 2:
 - puferira stanični Ca^{2+}
 - nakon uzbude na 339 nm, pokazuje se 5-6 puta povećanje emisije fluorescencije kada je vezan na Ca^{2+} , a emitirana fluorescencija se smanjuje kad se uzbudi na 365 nm.
- Indo - 1:
 - trenutno se kvantitativna, ratiometrijska Ca^{2+} mjerenja provode sa indo 1 obilježenim trombocitima koji koriste UV lasere. Nakon UV ekstrakcije imamo raspon od plave do ljubičaste (omjer ljubičaste i plave otkriva unutarstanični Ca^{2+})
 - ima prednost nad quin 2 radi: veća selektivnost za Ca^{2+} ; pomak valne duljine emisije nakon vezivanja Ca^{2+} ; povećana kvantna učinkovitost fluorescencije i manji afinitet za Ca^{2+}

- Fura - 2:
- ionski indikatori djeluju kao kelatori za određeni ion, a zatim vezanje iona na indikator mijenja svojstva fluorescencije

Druge opcije obilježavanja trombocita mogu biti sa fluo 3 ili fura redom. Fura red svijetli u odsutnosti Ca^{2+} .



Slika 14. Fura-2 ⁴

5. ZAKLJUČAK

- Ljudski organizam izgrađen je od brojnih minerala, a kalcij je jedan od najzastupljenijih.
- Jako je bitan za vitalne funkcije i signalne puteve kod čovjeka.
- Signalni proces koji nije završen ispravno, može izazvati neželjene posljedice.
- Promjena unutarstanične homeostaze Ca^{2+} može inicirati nastanak tumora. Produljeno unutarstanično povećanje Ca^{2+} može biti štetno.
- Kako bi se spriječilo stvaranje slabo topljivih soli, unutarstanične razine Ca^{2+} se moraju održavati niskima, a to se postiže pumpanjem Ca^{2+} iz citoplazme u izvanstanični prostor. Prihvatljiva razina kalcija je od 6,7 do 8,8mg/dL krvi jer u suprotnom dolazi do stanja hiperkalcijemije.
- Metode mjerenja kalcija su s vremenom uznapredovale, a jedna od preciznijih je protočna citometrija.

6. LITERATURA

1. *Filipović I., Lipanović S.*; Opća i anorganska kemija; ŠKOLSKA KNJIGA, Zagreb, 1995. 897
2. *Guyton A.C.*; Fiziologija čovjeka i mehanizmi bolesti; MEDICINSKA NAKLADA, Zagreb, 1995. 212
3. *Cooper A.*; Biophysical Chemistry; RSC Pub, (2004.)
4. *Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L.*; Biokemija; ŠKOLSKA KNJIGA, Zagreb 1991. 389, 360, 356, 391, 389
5. *Damjanov I., Seiwerth S., Jukić S., Nola M.*; Patologija, peto prerađeno i dopunjeno izdanje; MEDICINSKA NAKLADA; Zagreb, 2018.
6. *Abzhanov A., Kuo W.P., Hartmann C., Grant B.R., Grant P.R., Tabin C.J.*; The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches; NATURE;(2006); **442**: 563-567
7. *Chaochu Cuia,b, Robert Merrittb,c, Liwu Fua, Zui Panb,c,d,n*; Targeting calcium signaling in cancer therapy; China, (2016.); **7**: 3–17
8. *Gregory R.Monteith, Felicity M. Davis, Sarah J. Roberts-Thomson*; Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences; The Journal Of Biological Chemistry; 287: **38**; 31666- 31670
9. *Scott W. Burchiel,* Bruce S. Edwards,† Fritz W. Kuckuck,† Fredine T. Lauer,* Eric R. Prossnitz,‡ John T. Ransom,§ and Larry A. Sklar*; Analysis of Free Intracellular Calcium by Flow Cytometry: Multiparameter and Pharmacologic Applications; **21**; 221- 229
10. Calcium Signaling pathway; <https://www.abcam.com/pathways/calcium-signaling-interactive-pathway>
11. *Jessica L. Gifford, Michael P. Walsh, Hans J. Vogel*; Structures and metal-ion- binding properties of the Ca²⁺- binding helix- loop- helix EF- hand motifs; Biochemical Journal; (2007) , **405**; 199-221

