行政院國家科學委員會專題研究計畫　成果報告

Calreticulin 及其抗體在自體免疫疾病之研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC91-2314-B-040-013-
執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日
執行單位：中山醫學大學免疫學研究所

計畫主持人：蔡嘉哲

計畫參與人員：徐再靜　盧威伶　謝雨帆

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中　華　民　國 92 年 8 月 7 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 成 果 報 告 □期中進度報告

Calreticulin 及其抗體在自體免疫疾病之研究

計畫類別：■ 個別型計畫　　□ 整合型計畫
計畫編號：NSC 91－2314－B－040－013－
執行期間：　91 年 08 月 01 日至　92 年 07 月 31 日

計畫主持人：蔡嘉哲　　中山醫學大學免疫學研究所

共同主持人：無

計畫參與人員：徐再靜 中山醫學大學醫學研究所

盧威伶 中山醫學大學免疫學研究所

謝雨帆 中山醫學大學免疫學研究所

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：■精簡報告 □完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：
□赴國外出差或研習心得報告一份
□赴大陸地區出差或研習心得報告一份
□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
□國際合作研究計畫國外研究報告書一份
處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
涉及專利或其他智慧財產權，□一年□二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學免疫學研究所

中　華　民　國　92　年　08　月　6　日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

計畫編號：NSC 91-2314-B-040-013

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：蔡嘉哲教授　中山醫學大學免疫學研究所

計畫參與人員：徐再靜　中山醫學大學醫學研究所

盧威伶 中山醫學大學免疫學研究所

謝雨帆 中山醫學大學免疫學研究所

中文摘要

過去本實驗室觀察到一位類肉瘤症（Sarcoidosis）病人的抗核抗體檢測，呈現 nuclear dot pattern，將病人血清與大白鼠肝細胞萃取物反應，會辨識 58KDa 蛋白。58KDa 蛋白經胺基酸定序，結果爲 Calreticulin（CRT）。CRT，是一種鈣離子結合蛋白，主要存在細胞內質網，其蛋白表現量超過細胞內全部蛋白的 0.1% （除紅血球細胞）。CRT 功能相當廣泛，除了與鈣離子結合外還扮演 chaperone 的角色幫助新生蛋白進行醣化、訊號傳遞、細胞附著（cell adhesion）、吞噬及亦爲一種自體抗原。N 端 CRT（1~180A.a）稱 vasostatin，是 CRT 的 epitope 部份，同時也會抑制腫瘤生長。因此我們利用 cloning 方式，取得 CRT 及 vasostatin 之 cDNA，進而蛋白表現，以探討 vasostatin 與 Sarcoidosis 和自體免疫疾病間之關係。我們利用 ELISA 及 Western blot 分析 Sarcoidosis 血清中之 CRT 及 vasostatin 抗原皆呈陰性，因此推測 nuclear dot 並非由 CRT 抗體所造成。另外，亦利用 ELISA 分析 123 位自體免疫風濕疾病患者中 vasostatin 抗體的表現，結果發現有 12 位（9.7% ）是具有抗 vasostatin 自體抗體，其中 70 位 RA 患者有 9 位（12% ）、32 位 SLE 有 1 位（3% ）、21 位 Sjögren's syndrome 有 2 位（9.5% ）呈現陽性反應。綜合以上的結果我們發現抗 CRT 自體抗體與自體免疫疾病是有相關，同時與文獻指出抗 CRT 抗體會非專一性的出現在各種疾病是一致的。

關鍵詞：Sarcoidosis, Calreticulin(CRT), vasostatin, 自體抗體, 自體免疫疾病

Abstract

Our previous study had shown that serum from a patient with sarcoidosis had nuclear dot staining pattern detected by indirect immunofluoresence (IIF). In immunoblot -ting the sera recognized a 58KDa protein using purified rat extracts as an antigen. The protein was later identified as Calreticulin (CRT). CRT is found predominantly in the endoplasmic reticulum of most eukaryotic cells, but is also present in other intracellular locations in different cell types, including the nucleus, cytoplasm, cytoplasmic granules and the cytoplasm side of the plasma membrane. These comprise functions of CRT with the lumen of the ER (chaperone and Ca^{2+} storage and signaling) and CRT-dependent modulation of cellular functions at the extra-ER sites (cell adhesion and gene expression). CRT is a human autoantigen that is intimately associated with autoantigenic components of the Ro/SSA ribonucleoprotein (RNP) complex. Vasostatin, the amino terminal protein of the CRT molecule, can inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. In this study, recombinant CRT and vasostatin protein were purified from *Escherichia coli* and were used as substrate antigens in ELISA for screening anti-vasostatin antibodies in patients with sarcoidosis and various autoimmune diseases.

Anti-vasostatin autoantibody was detected in 12 (9.7%) of 123 different autoimmune rheumatic diseases and three (15%) of 52 with cytoplasmic positive of ANA pattern. These sera with anti-vasostatin autoantibody included nine patients (12%) with RA, one (3%) with SLE, two (9.5%) with Sjögren's syndrome. We also demonstrated that CRT was not a protein of the nuclear dots in sarcoidosis by Western blot and ELISA.

In conclusion, the CRT peptide analogus reacted in ELISA with sera from patients with SLE, SS, RA, which in agreement with previous observations, suggesting that anti-CRT autoantibodies are not restricted to any subset of the diseases.

Key word: indirect immunofluoresence,
Calreticulin, vasostatin, sarcoidosis

簡介

1974 年 Ostwald 及 MacLennan 在兔子肌肉肌漿網（sarcoplasmic reticulum）內

發現一種鈣離子結合蛋白，當時命名爲 HACBP（high affinity calcium binding protein calreticulin）(1)。直到 1989 年後才發現它是非肌肉細胞內質網（endoplasmic reticulum）中主要鈣離子結合蛋白，因此將它改命爲 Calreticulin（CRT）(2)。McCauliffe 等人指出人類 CRT 是 single copy 基因，位於第 19 對染色體短臂上，mRNA 含有 1251 nucleotide open reading frame，轉譯爲 417 胺基酸，其分子量爲 46KDa；但經 SDS-PAGE 後分子量爲 60KDa(3)。成熟 CRT 蛋白分爲三個不同的功能區（functional domain），分別爲 N-domain、P domain 及 C-domain，每個區域功能都不同。N-domain（1~180 胺基酸）：它會利用其 N domain 中的 KLGFFKR 胺基酸序列，結合到固醇類接受器（steroid receptor）上的 DNA binding domain 及細胞膜內的 integrin á subunt 上，而調控基因轉錄(4)及細胞分化、生長、移動、附著和持細胞形態(5, 6)。1998 年 Sandra E. Pike 等人發現 N 端爲主要抑制腫瘤生長部份，因此將 N 端命名爲 calreticulin vasostatin(7) 2002 年 Yao 等人指出 vasostatin 可以與 lamin $á_5$、$â_1$、r_1 結合，而降低內皮細胞增生、血管新生及腫瘤生長(8)。P-domain（181~280 胺基酸）：將幫助及穩定醣蛋白進行醣化作用，以及與鈣離子結合。C-domain（281~417 胺基酸）：帶較多個電荷胺基酸，所以與鈣離子結合力高但親和性低。末端含有 KDEL retention sequence，主要讓 CRT 保留在內質網內(3)。抗 CRT 抗體會出現在各種不同的自體免疫疾病，包括：全身性紅斑狼瘡（SLE）、類風濕性關節炎（RA）、乾燥症（SS）、coeliac disease、congenital heart block 及其他寄生蟲感染疾病，如：瘧疾（malaria）、蟠尾絲蟲症（onchocerciasis）、血吸蟲病（schistosomiasis）及蝨（tick）感染(2, 9)。1989 年 Lieu 等人合成熟 CRT N 端第 6~19 胺基酸所組成的 peptide，以競爭性酵素免疫分析法（ELISA），確定 N-domain 爲 CRT 主要抗原決定位（epitope）(10, 11)。

研究動機

過去本實驗室觀察到一位類肉瘤症病人的抗核抗體檢測呈現 nuclear dot pattern，將病人血清與大白鼠肝細胞萃取物反應，會辨識 58KDa 蛋白。58KDa 蛋白經胺基酸定序，結果爲 Calreticulin。因此我們利用 cloning 方式，取得 CRT 及 vasostatin 之 cDNA，進而蛋白表現，以探討 vasostatin 與 Sarcoidosis 和自體免疫疾病間之關係。

材料與方法

血清來源：收集最近一年內來台中中山醫學大學附設醫院求診病患血清，經臨床風濕科醫師診斷爲自體免疫風濕疾病共 123 人，包括全身紅斑性狼瘡 32 位、Sjögren's syndrome 21 位、類風濕性關節炎 70 位。正常血清 25 位（健康捐血者，

ANA 檢查陰性）當作陰性對照，以老鼠抗 CRT 單株抗體 SPA-601（Stressgen）當作陽性對照。

質體構築過程及純化蛋白質：首先從人類纖維母細胞中萃取 RNA，經 RT-PCR 取得 CRT 及 vasostatin cDNA，再與 pET Directional TOPO Expression kit(Invitrogen) 進行接合反應，形成 pET101/D-TOPO-CRT 及 pET101/D-TOPO-Vasostatin cDNA，再轉型到 TOP10 competent cell，37℃隔夜培養。從培養基上挑數顆菌落，放入 3ml 含 50ì g/ml carbenicillin 之 LB 培養液中，放入 37℃培養箱中震盪隔夜培養，準備抽質體 DNA。將萃取的質體 DNA 利用 *EcoR* I 及 *Sac* I 進行確認及 DNA 定序分析。確認後的 pET101/D-TOPO-CRT 及 pET101/D-TOPO-Vasostatin cDNA 再轉型到表現蛋的 *E.coli* BL21 Star™(DE3)進行培養，從培養基上挑數顆菌落，放入 3ml 含 50ì g/ml carbenicillin 之 LB 培養液中，放入 37℃培養箱中震盪培養，當菌液量達 OD_{600nm}=0.6 時，加入終濃度爲 0.8mM IPTG（MDBio）的菌液震盪培養 3 小時之後取樣品，經處理後利用聚丙烯醯胺凝膠電泳法 SDS-PAGE 以及 Western blot 確認結果。由於 pET101/D-TOPO 載體表現 fusion 之蛋白，其 C 端含有 6 個 histidine 會和管柱中帶正電的 nickle 結合，因此藉由 Ni-NTA 管柱得到 vasostain 蛋白。

酵素免疫分析法（ELISA）：來分析病人血清中是否含 vasostatin 抗體存在。

實驗結果

首先利用以間接免疫螢光法分析類肉瘤症患者血清抗核抗體，結果爲典型的 Nuclear dot。另外也利用 CRT 單株抗體觀察到 CRT 主要分佈於細胞質。經 RT-PCR 後的 CRT 產物爲 1251 bp，而質體長度爲 5753 bp，與 CRT 接合後全長爲 7004 bp；RT-PCR 的 vasostatin 產物爲 591 bp，與質體接合後爲 6344 bp。將兩種質體定序，定序的結果在第 57 的位置由 C 變 T，但並不影響胺基酸改變。將構築成功的質體送入能表現蛋白的 *E.coli* BL21 Star™（DE3），之後挑選幾顆菌落進行篩選並進行誘導，然而 CRT 表現量小，甚至不表現蛋白因此我們著手於 vasostatin 的誘導，我們以 0.8 mM IPTG 37℃培養 3 小時誘導 vasostatin 蛋白產生，所得到的結果以 15% SDS-PAGE 及 Western blot 分析 vasostatin，其分子量約 23KDa。另外爲了得到較純的 vasostatin 蛋白，因此將大量表現之 vasostatin 蛋白通 Ni-NTA 親和性管柱，經大量緩衝液沖洗後，再以不同濃度 imidazole 將蛋白析出。將取得到的 vasostatin 當抗原，利用 ELISA 分析 123 位自體免疫風濕疾病患者中是否有抗 vasostatin 抗體存在，結果發現有 12 位（9.7% ）具有抗 vasostatin 自體抗體，其中 70 位 RA 患者有 9 位（12% ）、32 位 SLE 有 1 位（3% ）、21 位 Sjögren's syndrome 有 2 位（9.5

% ）呈現陽性反應。另外我們也利用不同的方法收集 HeLa 細胞（total HeLa、核質分離）及重組的 vasostatin 蛋白爲抗原，利用 Western blot 分析類肉瘤症患者血清，並沒有發現病患血清中含有辨識 CRT 抗體存在。

討論：

本實驗室過去純化 58KD 蛋白經胺基酸定序，當時共定出 19 個胺基酸，其序列：DPAIYFKEQFLDGDAWTNR 與 NCBI 基因庫進行比對，是大白鼠的 calreticulin。而我們依據已發表的 MN-004343 人類 CRT 基因進行 cloning 實驗，若加以比對，結果相似度高達 78%（15/19）。我們曾經萃取 3 種不同細胞株（如：HeLa、HEp2 及 human neonatal foreskin fibroblast）之 total RNA，經 RT-PCR 後取得 CRT 及 vasostatin cDNA，再與載體進行接合反應並轉型後，萃取質體 DNA 經核酸定序分析種細胞株都在第 57 核酸的位變 T結transition），但不影響轉譯後的胺基酸改變。另外，在 HeLa 及 Hep2 細胞之 CRT 核酸序列還有其它核酸突變，甚至 sense mutation），其可能的原因有二種：（1）HeLa 及 Hep2 細胞本身爲癌細胞，因此可能是 CRT 基因已突變。（2）在 RT-PCR 及 PCR 基因放大過程中使 CRT 基因載入 PET101/D-TOPO 的載體，轉型到 *E.coli* BL21 Star（DE3）進行表現蛋白。嘗試不同誘導蛋白表現條件包括不同 IPTG 濃度、溫度及抗生素，但 CRT 蛋白表現量始終非常低，所以我們認爲可能載體無法啓動 CRT 基因表現或者是 CRT 蛋白本身是多功能性蛋白可能會回饋抑制細菌功能或其它未知原因影響。我們利用 Ni-NTA 親和性管柱純化 vasostatin 抗原，純化過程不斷調整緩衝液濃度，然而大量的 vasostatin 始終在沖洗液中流失，對此問題我們推測可能是 vasostatin 在純化過程時結構改變所導致。Corbett 指出 CRT 的四級結構會受到 ER 環境改變而改變，如 Ca^{2+}、Zn^{2+}、ATP 等等(12)。我們以 ELISA 的結果作爲分析抗 vasostatin 自體抗體在這些不同的風濕免疫疾病中之分佈情形。ELISA 結果與之前文獻的結果相似顯示抗 CRT 抗體非專一性的出現在各種疾病(13)。(14, 15)

References

1. Ostwald, T. J., and D. H. MacLennan. 1974. *J Biol Chem 249:974*.
2. Eggleton, P., K. B. Reid, U. Kishore, and R. D. Sontheimer. 1997. *Lupus 6:564*.
3. McCauliffe, D. P., F. A. Lux, T. S. Lieu, I. Sanz, J. Hanke, M. M. Newkirk, L. L. Bachinski, Y. Itoh, M. J. Siciliano, M. Reichlin, and et al. 1990. *J Clin Invest 85:1379*.
4. Burns, K., B. Duggan, E. A. Atkinson, K. S. Famulski, M. Nemer, R. C.

Bleackley, and M. Michalak. 1994. *Nature 367:476*.

5. Coppolino, M. G., M. J. Woodside, N. Demaurex, S. Grinstein, R. St-Arnaud, and S. Dedhar. 1997.. *Nature 386:843*.
6. St-Arnaud, R., G. A. Candeliere, and S. Dedhar. 1996. *Front Biosci 1:d177*.
7. Pike, S. E., L. Yao, J. Setsuda, K. D. Jones, B. Cherney, E. Appella, K. Sakaguchi, H. Nakhasi, C. D. Atreya, J. Teruya-Feldstein, P. Wirth, G. Gupta, and G. Tosato. 1999. *Blood 94:2461*.
8. Yao, L., S. E. Pike, and G. Tosato. 2002. *J Leukoc Biol 71:47*.
9. Eggleton, P., and D. H. Llewellyn. 1999. *Scand J Immunol 49:466*.
10. Lieu, T. S., M. M. Newkirk, J. D. Capra, and R. D. Sontheimer. 1988. *J Clin Invest 82:96*.
11. Eggleton, P., F. J. Ward, S. Johnson, M. A. Khamashta, G. R. Hughes, V. A. Hajela, M. Michalak, E. F. Corbett, N. A. Staines, and K. B. Reid. 2000. *Clin Exp Immunol 120:384*.
12. Corbett, E. F., K. M. Michalak, K. Oikawa, S. Johnson, I. D. Campbell, P. Eggleton, C. Kay, and M. Michalak. 2000. *J Biol Chem 275:27177*.
13. Routsias, J. G., A. G. Tzioufas, M. Sakarellos-Daitsiotis, C. Sakarellos, and H. M. Moutsopoulos. 1993. *Clin Exp Immunol 91:437*.
14. Wu, Y. Y., T. C. Hsu, T. Y. Chen, T. C. Liu, G. Y. Liu, Y. J. Lee, and G. J. Tsay. 2002. *Clin Exp Immunol 128:347*.
15. Tsay, G. J., C. L. Wang, T. Y. Chen, C. N. Huang, and T. C. Hsu. 1996. *J Formos Med Assoc 95:905*.