

PhD értekezés tézisei

AZ ÉLŐ SEJT SZABÁLYOZOTT Ca^{2+}
PERMEABILITÁSA: Ca^{2+} INFLUX FAKTOR

Dr. Csutora Péter

Programvezető: Dr. Kellermayer Miklós
Témavezető: Dr. Miseta Attila

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Klinikai Kémiai Intézet

2001

Bevetés

Az élő sejtek Ca^{2+} homeosztázisa

Számos intracelluláris jelátviteli mechanizmus a citoplazma Ca^{2+} szintjének szabályozásán alapul. Lángfotometriás mérések tanúsága szerint az élő sejtek Ca^{2+} tartalma sejtvízre vonatkoztatva 1-2 mmol/l, tehát megegyezik az extracellulárisan található Ca^{2+} mennyiségével. Ez a módszer azonban nem veszi figyelembe sem a sejten belüli kompartmentalizációt, sem pedig az ionizált (szabad) és kötött állapotban lévő Ca^{2+} ionok viszonyait. A fluoreszcens Ca^{2+} indikátorok megjelenésével kiderült, hogy nem stimulált sejtekben a citoplazma szabad Ca^{2+} szintje ($[Ca^{2+}]_i$) rendkívül alacsony, a 10^{-7} M-os tartományban van. Ez a koncentráció érték azonban csak a jéghegy csúcsa, ugyanis a citoplazmában lévő Ca^{2+} ionok több, mint 99%-a fehérje természetű pufferektől van dinamikusan kötve (parvalbumin, calbindin-D, calretinin), és így láthatatlan a kelátor természetű fluoreszcens indikátorok (pl. Fura-2, Fluo-3) vagy kemilumineszcens fehérje indikátorok (pl. aequorin) számára. A lángfotometriásan mérhető és a citoplazmában található szintek különbözősége, vagyis a sejten belüli Ca^{2+} 99%-a az endoplazmatikus (ER), illetve izomban a szarkoplazmatikus (SR) hálózatban helyezkedik el, nagyrészt fehérjékhez és chaperone-okhoz (calreticulin, calnexin, calmegin, junctate) kötve. Talán kevésbé ismert a mitokondriumnak szerepe a Ca^{2+} homeosztázisban, azonban újabb adatok szerint ezek aktívan részt vesznek a $[Ca^{2+}]_i$ szint ingadozásainak térbeli és időbeli szabályozásában, a dinamikus Ca^{2+} tárolásban, és az ER felé való negatív és pozitív visszacsatolásban.

A 100 nM-os $[Ca^{2+}]_i$ fenntartására a sejt meglehetősen sok ATP-t áldoz, a Ca^{2+} ionokat specializált ATPáz fehérjék a sejten kívülre, illetve az ER-ba szállítják.

Ca^{2+} influx mechanizmusok

A Ca^{2+} , mint intracelluláris jelátvivő molekula akkor fejtheti ki sokrétű hatását, amikor az extracelluláris térből a sejtbe áramlik, és a $[Ca^{2+}]_i$ fluoreszcens indikátorokkal mérve 100 nM-tól 1000 nM-ra emelkedik. A másodlagos folyamatok beindulásában több tényezőnek van szerepe, így számít a Ca^{2+} influx amplitúdója, sebessége, és tér-idő mintázata is. Kiváló okát tekintve alapvetően három különböző Ca^{2+} influx mechanizmus létezik:

1) Legtöbb esetben a membrán depolarizáció által szabályozott Ca^{2+} válaszról tudunk, amely az ingerlékeny sejtek (ideg- és izomsejtek) fő Ca^{2+} influx mechanizmusa. Itt az extracelluláris Ca^{2+} beáramlása a sejtbe a feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} csatornák és a ryanodine receptorok közös munkájának eredménye.

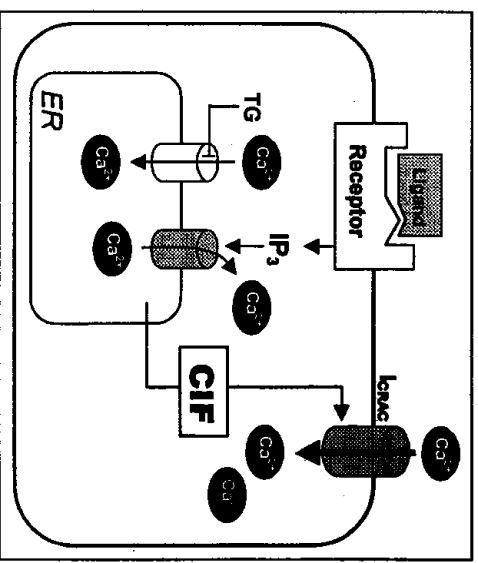
2) Receptoron keresztül beindított direkt Ca^{2+} influx. Ilyen módon hat az ATP, glutamát, acetylcholin, diacylglicerol, vagy az arachidonsav, amelyek másodlagos jelátvitel nélkül, közvetlenül is képesek Ca^{2+} permeabilitás fokozódást okozni egyes sejtekben.

3) Kapacitativ Ca^{2+} influx. Definícióját tekintve a kapacitativ Ca^{2+} válasz is egy receptoron keresztül, de indirekt válasz, amelyben a Ca^{2+} influx-ot megelőzi egy jelátviteli kaskád rendszer beindulása, és annak hatására a Ca^{2+} ionok kiáramlása az ER/SR-ból. Nem ingerlékeny sejtekben ez a mechanizmus a $[Ca^{2+}]_i$ emelésének legfontosabb módja, és ennek általánosan elfogadott modelljét ismertetem részletesen.

A kapacitativ Ca^{2+} influx mechanizmusa

Amikor a sejtet serkentő ágens hozzákötődik receptorához, a sejten belüli egy G-proteinhez vagy tirozin-kinázokhoz kapcsolt folyamat hatására inozitol 1,4,5-trifoszfát (IP₃) keletkezik, amely az ER felszínén lévő receptorhoz kötődve annak Ca^{2+} csatornáit megnyitja, és a Ca^{2+} ionok kiáramlanak a citoplazmába.

Ezt igen hamar követi egy másodlagos Ca^{2+} beáramlás, amely során a sejt környezetéből a megnyitló úgynevezett kapacitativ csatornákon át a Ca^{2+} ionok a sejtbe áramlanak. Az így létrejövő megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ szint számos biológiai folyamat kulcsfontosságú része, és hiányában nem jöhet létre például a T-sejtek aktiválása, a citokinok termelése, az inzulin és a nyál szekréciója, az ivarsejtek fertilitációja, a trombociták granulumainak kiürítése, vagy az erek összehúzódása. A kapacitativ Ca^{2+} influx kiváltása kísérleti körülmények között lehetséges IP₃ nélkül is, ugyanis egy



thapsigargin (TG) nevű molekula irreverzibilisen bontja az Ca^{2+} ATPáz-át, és hatására a Ca^{2+} ionok az ER-ből a citoplazmába áramlanak.

Ez idő szerint a kapacitativ Ca^{2+} influx aktiválásának pontos részletei nem ismertek, így többek között az sem, hogy milyen módon jut el az információ az ER kiürüléséről a plazma membrán Ca^{2+} csatornához. Három fő, egymást nem teljesen kizáró elmélet létezik, amely ezt a folyamatot próbálja magyarázni: 1) az ER IP_3 receptorai és a plazmamembrán közötti fizikai kapcsolat segít a csatornák aktiválásában; 2) vezikuláris transzport mechanizmusok; 3) egy jelátvivő molekula (Ca^{2+} influx faktor, CIF) jut el az ER-ből a plazmamembránhoz, amely ott a csatornák megnyitását eredményezi.

1) Az első, „konformációs kapcsolás” elmélet szerint fizikai kontaktus van az ER-membránjában található IP_3 receptorok és a plazma membrán Ca^{2+} csatornáik között, és az IP_3 receptorához való kötődése egyúttal a kapacitativ Ca^{2+} influx-ot is kiváltja. Az elmélet igazolását hátráltatja, hogy a kapacitativ Ca^{2+} csatornák pontos molekuláris mibenléte még ma sem pontosan ismert, és a fehérjeszekvencia hiányában nemigen lehet ko-purifikációs és egyéb sejt- és molekuláris biológiai kísérleteket tervezni. Pár éve kiderült, hogy a *Drosophila melanogaster* fényre érzékeny membrán-csatornáik egyben Ca^{2+} csatornák is (transient receptor potential channel, TRP), és azóta ezen csatornák kutatására terelődött a hangsúly. Kimutatták, hogy emlös sejtekbe bejuttatott izolált TRP csatornák kapcsolódhatnak az IP_3 receptorokhoz, és ez a kapcsolatot beindíthatja a Ca^{2+} beáramlását a sejtbe. További kutatások az aktin citoskeleton rendszer szerepére utalnak a kapacitativ Ca^{2+} influx létrejöttében. A konformációs kapcsolás hipotézis legnagyobb hiányossága, hogy az IP_3 -tól független folyamatokat (pl. szfingozinok és egyéb aktivátorok) és a farmakológias szerek hatását (pl. TG) nem tudja kielegítően magyarázni.

2) *Xenopus laevis* oocitákon végzett kísérletek azt mutatták, hogy vezikuláris transzportért felelős egyes fehérjéket (pl. SNAP-25) blokkolva gátolni lehetett a kapacitativ Ca^{2+} influx létrejöttét. Innét eredt a hipotézis, mely szerint vezikulák szállítják az aktivátort vagy magát a Ca^{2+} csatornát a membránhoz, és ezek membránba épülése váltja ki a Ca^{2+} beáramlást. Később hasonló eredményeket mutattak be emlös vese sejteken is, azzal a kiegészítéssel, hogy a vezikulák képződését

blokkoló breifling. A nem bontotta teljesen a Ca^{2+} influx-ot. Bár ez a hipotézis kétségtelenül érdekes, a kapacitativ Ca^{2+} beáramlással kapcsolatos, évek alatt gyűjtött kísérleti adatok csak kevés részével kompatibilis.

3) A harmadik elmélet – melynek vizsgálatával magam is foglalkoztam – azt mondja, hogy miután a Ca^{2+} ionok az ER-ből kiáramlanak, egy kis molekulasúlyú másodlagos jelátvivő keletkezik az ER-ban, és ez diffúzióval vagy más módon eljut a plazma membránhoz, ahol közvetlenül a Ca^{2+} csatornákra hatva megnöveli a plazma membrán Ca^{2+} permeabilitását.

Ismereteink a CIF-ről

Mit tudunk kutatásainkat megelőzően a CIF-ről? Igazából nem sokat. A Roger Tsien által karakterizált, tisztaságban a mi preparátumunktól messze elmaradó CIF számos nonspecifikusan aktív szennyeződést is tartalmazott, így az általa használt biokémiai szeparációs technikák eredményeit kellő óvatossággal kell kezelnünk. Töle tudjuk a következő jellemzőket: kis molekulasúly, kb. 500-700 Da, nem fehérje természetű, negatív töltésű, foszfátzsal elbontható, erősen saválló molekula.

Hanley és munkatársai Tsien alapötletéből merítve 1995-ben kidolgoztak egy új izolációs technikát, amely egy csak intracelluláris aktivitással rendelkező, tehát valódi CIF-et eredményezett. A szerkezet megismerésére Irányuló, többféle megközelítéssel végzett közös kísérleteink a következő eredményeket hozták: a CIF hőstabil (100°C, 2 óra), alkalikus pH-ra igen érzékeny, spektroszkópia glükóz nyomait mutatta ki, UV-érzékeny (220-300 nm, 5 perc), aktivitása nem csökken savas depurinációra, érzékeny hidrazin-kezelésre, amely a pirimidin és ribóz struktúrákat roncsolja, a szerves kémiai meghatározások közül negatív Dische-reakciót (deoxiribonukleotidok) mutat, de pozitív az Euler-Hahn- (ribonukleotidok), Lowry-foszfátz- (foszfátok) és a nátróli-rezorcinol-kénsav-reakciót (cukrok) illetően.

Mind ezek alapján valószerűsíthető, hogy a CIF egy foszforilált nukleotid-cukor, amely feltételezés saját izolációs kísérleteinkkel és HPLC illetve egyéb tisztítási továbbfejlesztéseink eredményével is kompatibilis. Hasonló molekulák, például a cADPr vagy a NAADP ismert Ca^{2+} jelátvivő molekulák, de ezek az ER deplecióját okozzák, míg a CIF egy ezt követő mechanizmus része.

A Ca^{2+} influx következményei

A sejten belül meglehetősen sok folyamat függ a Ca^{2+} mindenkori szintjétől, illetve a kapacitativ Ca^{2+} influx hatására bekövetkező $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésétől: például izomkontrakció (troponin C, miozin könnyű lánc kináz); proliferáció, fertilizáció, tanulás és memória, immunvédekezés (calcineurin, transzkripciós faktorok, Ca^{2+} /calmodulin dependens protein kináz); szekréció és membrán ingerlékenység (ioncsatornák, synaptotagmin); metabolizmus (foszforiláz kináz); vezikula közlekedés és sejtosztódás (annexinek); sejtosztódás és tumornivázio (S100 fehérjék); ATP és szteroid szintézis (mitokondriális enzimek); apoptózis (kaspázók).

Fontos megjegyezni, hogy különböző amplitúdójú, sebességi és tér-idő mintázattal Ca^{2+} influxok más és más folyamatokat indítanak be. Hosszú ideig tartó $[Ca^{2+}]_i$ emelkedések például egy NF-AT nevű, míg a rövid $[Ca^{2+}]_i$ emelkedések egy másik, NF- κ B nevű transzkripciós faktort aktiválnak. Jó példa erre az IL-2 szintézise. Ahhoz, hogy az IL-2 termelés a limfocitákban beinduljon, egy tartós, legalább 40 percen át tartó 1 μ M-os $[Ca^{2+}]_i$ emelkedésre van szükség, míg a T-sejtek teljes aktiválódása csak 2 órás emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ hatására következik be.

Elainte azt hitték, hogy a kapacitativ Ca^{2+} influx csak fiziológias és gyógyszerttel indukálható folyamatok része, de nem vesz részt pathológias állapotok kialakulásában és fenntartásában. Később egyre több összefüggést ismertek fel a $[Ca^{2+}]_i$ és egyes körképek pathomechanizmusa között. Napjainkban már bizonyos, hogy a kapacitativ Ca^{2+} influx csökkenése vagy túlzott aktiválása is szerepet játszik a diabetes, diabeteses szövődmények, cardiomyopathiák, pancreatitis, és psoriasis kialakulásában, vagy például az idegsejtek trauma utáni káros működésében. Legújabb eredmények szerint ugyanez a folyamat kapcsolatos egyes malignus tumorerok kialakulásával, az Alzheimer-kórban megfigyelhető amiloid lerakódással, de azt is leírták, hogy a kapacitativ Ca^{2+} influx gátolja a renin szekrécióját. Mindezek a példák tovább hangsúlyozzák a kapacitativ Ca^{2+} influx és annak feltételezett aktivátorai, így a CIP kutatását.

Kérdésfelvetés

Az élő sejtek Ca^{2+} homeosztázisának megismerésével kapcsolatban végzett munkám során a következő fő kérdésekre kerestem a választ:

1. Ismert, hogy az ER Ca^{2+} raktárai nemcsak fehérje természetűek, hanem dinamikus Ca^{2+} kötésre képes az ER néhány kis molekula is, így az oxalát, szukcinát, vagy a glükóz-6-foszfát. Vajon ezek csek a már bejuttott Ca^{2+} kötésében vesznek részt, vagy pedig membrán transzportjuk során segítik is a Ca^{2+} felvételt az ER-ba, egyfajta együttes kompartmentalizációt létrehozva?
2. A Hanley és munkatársai által izolált CIP extraktum *Xenopus laevis* oocitákba injektálva Ca^{2+} dependens Cl csatornákat aktivált. Vajon az így mérhető Cl áramok valódi Ca^{2+} influx következményeként jönnek-e létre? Lehet-e egy olyan biológiai assay-t kifejleszteni, amely direkt módon mutatja a CIP hatására bekövetkező Ca^{2+} mozgásokat?
3. Melyek a CIP injektálását követően megfigyelhető Ca^{2+} influx főbb jellemzői? Hasonlít-e ez az influx korábban leírt Ca^{2+} hullámokra?
4. Milyen sejtekből lehet CIP-et izolálni? A CIP és az általa stimulált folyamat univerzális, vagy csak bizonyos sejtekre jellemző? Milyen módon lehet aktiválni a sejteket a CIP termelésének beindításához? Melyek a fiziológias stimulatorok? Egyáltalán a CIP *de novo* szintetizálódik, vagy az ER-ban aktív formában raktározódik nyugvó, nem aktivált sejtekben is?
5. Lehet-e a Ca^{2+} influx intracelluláris morfológiájából következtetni a CIP termelésének helyére? Biokémiai frakcionálással vagy egyéb módon elkülöníthető-e az a sejtalkotó vagy celluláris kompartment, amelyben a CIP szintetizálódik?
6. Mi a CIP kémiai szerkezete, ill. milyen szeparálási technikákkal lehet az aktivált sejtekből a lehető legtisztább CIP-et kinyerni?

7. Mi a CIF hatásmechanizmusa, pontosan milyen csatornáko. Jü ki hatását? Csak egy fajta vagy több csatornán is hat? Ha a csatornán közvetlenül hat, vajon a hatás reverzibilis? Blokkolható-e a csatorna úgy, hogy a CIF sem képes megnyitni?
8. Működhet-e a CIF az inozitol-rendszerrel függetlenül? Kell-e az IP₃ receptorok membránhoz való kapcsolódása a CIF hatásához? Beleillik-e a CIF a konformációs hipotézisbe, vagy esetleg cáfolja azt?
9. Vannak-e olyan patológiai folyamatok és betegségek, amelyek a CIF működésének vagy mennyiségének kóros voltán alapszanak?

9.) Anyag és módszer

A Ca²⁺ influx faktor izolálása

A CIF – szerepéből és feltételezett szintetikus mechanizmusából adódóan – olyan sejtekből nyerhető ki, amelyekben előzőleg az ER Ca²⁺ tartalmát kiürítettük. Ennek elérésére emlős primer sejtek (humán T-sejtek, trombociták, patkány pankreasz béta-sejtek, emlési simaizomsejtek, szívizomsejtek) vagy kultúrák (Jurkat humán T-tilimóma sejtek, J774 makrofágok, HeLa sejtek) esetében a már említett thapsigargin (TG) nevű növényi alkaloidot használtuk, amely irreverzibilisen bénítja az ER Ca²⁺ ATPáz-át, és így a "leak" csatornán át az ER Ca²⁺ ionjai a citoplazmába áramlanak. CIF-et sikeresen izoláltam élesztőből is (*Saccharomyces cerevisiae*), itt azonban a TG helyett genetikai úton egy, a TG hatásának megfelelő fenotípussal rendelkező mutánszt használtam, amelyben a PMR1 gén kiütése révén hiányzik az ER/Golgi Ca²⁺ ATPáz-a, és így nem képes az ER/Golgi Ca²⁺ szelkvesztrálására.

A CIF izolálását a következő módszerrel végeztem: a TG-nal kezelt emlős (2 µM, 15 min, 25°C) vagy mutáns élesztő sejteket sósavval extraháltam (200 mM, 30 min, 25°C), majd az extraktumot centrifugáltam, és a felülúszót neutralizálás után BaCl₂-al kezeltem (10 mM) a vízinátlis foszfátok (pl. IP₃) kicsapása érdekében. Újabb centrifugálás után a felülúszót lyofilizáltam, majd az így kapott pelletet 100%-os metanolban extraháltam (15 perc, rázás). A felülúszót centrifugálás után Sep-Pak Vac C18 (1 cc) oszlopon tisztítottam, majd beszáritás után (N₂ gáz, 30°C) 100 mM-os ecetsavban feloldottam, és 30 kDa filteren ultrafiltráltam. Az így kapott extrakt CIF aktivítását – ha nem tisztítottam tovább – ebben az állapotban meghatároztam a *Xenopus* oocita bioassay segítségével.

A Ca²⁺ influx faktor fiziko-kémiai vizsgálata

A molekula pontos szerkezetének megismerése érdekében a fent vázolt tisztítás nem elegendő, további szeeparálásra és fiziko-kémiai illetve műszeres analízisre van szükség. További tisztításhoz az ecetsavas extraktot először BioGel P-2 (Bio-Rad) gél-kromatográfiás oszlopon fittaltam 100 mM-os ecetsavat használva eluensként. Az oszlopról 0.5 ml-es frakciókat nyertem, amelyekből UV abszorbananciát és CIF aktivitást mértem. A CIF aktivitás a 14-15. frakcióban található, míg meglehetősen sok szennyező anyag eltávozik a 10-13. és 16-21. frakcióval. Az aktív frakciókat

kombináltam, majd az extrakt további tisztítását anion ^{Lej} HPLC oszlop segítségével végeztem el. Erre a célra egy Keystone Partisil 10 SAX oszlopot választottunk, melyet mások sikeresen használtak nukleotid foszfátok szeparálására. Lineáris sógrádiensünk 5 - 750 mM ammónium dihidrogén-foszfátból állt, melynek pH-ját lineárisan 2,8-ről 3,7-re növeltem a futás során. 1 ml-es frakciókat nyertem, melyekből CIF aktivitást mértem. Hasonlóan a P-2 oszlophoz ez a lépés is sok UV-pozitív szennyeződést eltávolított. A CIF a 24. és 25. frakcióban található legnagyobb koncentrációban, itt a só koncentrációja kb. 280 mM, amely dialízissel eltávolítható (100 és 500 Da zsákok). További tisztításra reverz-fázisú HPLC-t, kémiai sóvalantást, és más módszereket használtam.

A kromatográfálás és egyéb tisztítás mellett azt is szükségesnek láttuk, hogy egyszerű fiziko-kémiai és enzimatiskus vizsgálatokat végezzünk a CIF sajátosságainak meghatározására.

Az extraktumok CIF aktivitásának mérése Xenopus oocitákban

Albinó *Xenopus laevis* békákából a hasfalon át sebészeti módszerrel oocitákat nyertem. Az oociták follikuláris szövetét kollagenáz segítségével eltávolítottam, majd egyszerezte kb. 25 oocitába sztereomikroszkóp alatt 14 nl 5 mM-os Pura-2 fluorezcens Ca^{2+} indikátort injektáltam. A bioassay-t egy Olympus IX-70-es invertált fluorezcens mikroszkóp segítségével végeztem el, amely fel volt szerelve digitális kamerával és gyors filter-váltóval (340 és 380 nm-es filterek a rációmetrikus Pura-2 fluorezcencia mérésére). Két órát vártam, hogy az injektálás helye teljesen bezáródjon, majd egy-egy oocitát Ca^{2+} -mentes médium-ban egy házálag készített cellában a mikroszkóp tárgyasztalára helyeztem, és az oocitába a tárgyasztalra szerelt és CIF-extraktummal megöltött injektor tűjét beledobtam. Ezt követően 10 percen keresztül, 3 másodperces időközönként egy-egy képet készítettem 340 illetve 380 nm-es gerjesztésnél, 510 nm-es emissziós filteren át. A kezdetől számítva kb. 30 másodperc után 5 mM Ca^{2+} -ot adtam a médiumhoz, további 1 perc után pedig 14 nl CIF extraktot injektáltam az oocitába. A 10 perc elteltével számítógép segítségével elemeztem a fluorezcens arány (340/380) növekedését. Ha az extraktunk tartalmazott CIF-t, akkor kb. 90-140%-os növekedést kaptam a Ca^{2+} hozzáadása előtti állapothoz képest, míg negatív extraktok maximum 5-8%-os fluorezcencia emelkedést okoztak.

Alternatív módszerként végeztem aktivitás mérést radioizotóp módszerrel is, a ⁴⁵Ca izotóp beáramlását mértem, és eredményeink megfelelnek a várakozásoknak.

Az extraktumok CIF aktivitásának mérése elektrofiziológiai módszerekkel
Kollaborációban végeztünk whole cell voltage clamp és patch clamp méréseket mind a CIF aktivitásának meghatározására, mind pedig az ionszelektivitás, gátlhatóság, stimulálási kinetika vizsgálatára. Target sejteket használtunk szövettenyészetű RBL (rat basophilic leukemia), Jurkat, és eger aorta simaizomsejteket, valamint primer frissen izolált humán periferiás T-sejteket.

A Ca^{2+} hullámok számítógépes elemzése

A CIF által kiváltott Ca^{2+} influx elemzését nemcsak a mikroszkóposan nyert adatokból végeztük el, hanem egy kollaborációban készült számítógépes stimulációs modell is alkalmaztunk. Ez a modell egy komplex rendszert állított fel, amely a CIF és a Ca^{2+} ionok diffúzióján alapult. A számítások figyelembe vették a CIF szármított és a Ca^{2+} ionok mért diffúziós együtthatóit, a CIF feltételezett termelési és lebomlási kinetikáját, a CIF molekulák méretét, interakcióit a citoplazmával a diffúzió során, az oociták geometriai viszonyait, és más paramétereket. A modellprogram által elkészített görbék meglepően jól illeszkedtek a CIF által kiváltott Ca^{2+} hullámok kísérletesen kapott morfológiai képehez, amely a modell felállítása során megadott és feltételezett paraméterek helyességét mutatja.

CIF szintézis feltárt sejtekben és izolált ER-ban

Lejárt szavatosságú, transzfuzóra már nem alkalmas intakt humán trombocitákból a szokásos módon CIF extraktot izoláltam. Egy másik tasak sejtait ultrahangos szonikálással feltártam, majd a feltárt sejteket kezeltem TG-nal extrahálás előtt. Egy harmadik megközelítésként trombocitákból homogenizálás után gradiens-ultracentrifugálásal ER mikroszómákat nyertem. A mikroszómákat egy intracelluláris állapotokat megkövetítő sóoldatba helyeztem, melyhez ATP-t és glikózt is adtam. TG-kezelés után az ER mikroszómákat ultracentrifugálásal eltávolítottam, majd a felülúszót extraháltam és annak CIF aktivitását megmértem.

Eredmények

1. számnú közlemény

Ebben a közleményben a glükóz-6-foszfát és Ca^{2+} ionok sejtben belüli együttes kompartmentalizációjának kérdéskörét tanulmányoztuk. Mikroszómákat izoláltam patkány szivból, májból és agyból, majd azt vizsgáltam, hogy ezek a mikroszómák in vitro milyen mértékben veszik fel a glükóz-6-foszfátot. Mássejteken a glükóz-6-foszfátáz aktivitás magas, szemben az egysejtekkel és a szívizomsejtekkel, amelyeknek nem feladata a glükóz-6-foszfátáz aktivitásuk is alacsony.

A hipotonias oldatban tartott mikroszómák glükóz-6-foszfát felvételét zsongorodásuk jelzi, amelynek mértékét a fényszórás változásának detektálásával határoztam meg. Mindhárom típusú mikroszóma szelektíven veszi fel a glükóz-6-foszfátot, más cukrok és kémiaiag rokon anyagok nem jutnak át a membránjukon. Megfigyeléseink szerint a glükóz-6-foszfát felvétele megnöveveli az ATP-dependens Ca^{2+} szekvesztráció mértékét, amelyet fluoreszcens Ca^{2+} mérésével határoztam meg. Továbbá, a mikroszómák gyors filtrációja után végzett enzimátikus méréseink megmutatták, hogy ez a folyamant fordítva is igaz, tehát Ca^{2+} ionok és ATP hozzáadása fokozza a glükóz-6-foszfát importot az endoplazmatikus retikulum mikroszómákba. Ennek eredményeként a passzív egyensúlyiállásnál akár 3-4-szer magasabb glükóz-6-foszfát koncentráció is kialakulhat a mikroszómákban. Ez a glükóz-6-foszfát koncentráció emelkedés nem jelentkezik, ha csak Ca^{2+} vagy csak ATP volt jelen, és akkor sem, ha a Ca^{2+} ionok és ATP mellé TG-t vagy egy Ca^{2+} ionofórt, ionomycin-t adtunk.

Ezek az adatok megmutatták, hogy glükóz-6-foszfátáz aktivitástól független, glükóz-6-foszfát-szelektív transzport fehérje működik az endoplazmatikus retikulum membránjában. Eredményeink ezen kívül alternatív hipotézist is szolgáltatnak annak magyarázására, hogy inaktív sejtben az extracelluláris glükóz szint növekedésekor miért alakul ki fokozott Ca^{2+} szekvesztráció az endoplazmatikus retikulumban.

2. számnú közlemény

Ezen közleményünk számit CIF kutatásunk első jelentős beszámolójának. A már leirt izolálási technikára építve CIF extraktumot izoláltam humán Jurkat T-lymfóma sejtéből, amelyeknek ER Ca^{2+} ATPáz-át előzőleg TG-nal bennítottam az ER Ca^{2+} koncentráció csökkentése céljából. Hasonló módon tisztítottam CIF-et egy mutáns élesztőből is, amelyek ER/Golgi Ca^{2+} ATPáz enzime genetikai manipuláció következtében hiányzik.

Az így izolált CIF extraktumok tesztelésére egy bioassay-t fejlesztettem ki, amely során a CIF-eket fluoreszcens Ca^{2+} indikátorral feltöltött albínó *Xenopus laevis* oocitákba injektáltam, majd a Ca^{2+} influx mértékét direkt fluoreszcens és konfokális mikroszkópiás képalkotó eljárással detektáltam. A Ca^{2+} hullámok az injektálás pontján indultak, még akkor is, ha az oociták saját ER-át centrifugálásal elköltöníttem a többi sejtalkotótól és az injektálás helyétől. Kontroll sejtéből készített extraktok nem okoztak $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést, és az sem, ha az aktív CIF-et extracellulárisan adtam az oocitához. A $[Ca^{2+}]_i$ növekedés függött az extracelluláris Ca^{2+} koncentrációjától, de nem függött az IP_3 rendszer épségétől, amely mutatja, hogy a CIF közvetlenül a plazma membrán csatornáin fejt ki hatását.

A CIF hatására bekövetkező $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés elemzésére készített számítógépes modell kompatibilis egy kb. 700 Da molekulatömegű jelátvivő molekula diffúziójával és hatásával. Whole cell patch clamp méréseink azt is megmutatták, hogy az oocitában aktívnak mért CIF preparátumok Jurkat sejtiken egy Ca^{2+} szelektív csatornát nyitnak meg (Icavc), amely lényegesen gyorsabban aktiválódik, mint amikor a patch pipetta Ca^{2+} kelátort vagy IP_3 -ot tartalmaz.

3. számnú közlemény

Egészben a legutóbbi időköz ügy tartották, hogy kapacitív Ca^{2+} influx csak nem ingerlékeny sejtben fordul elő, és nem érinti az izom- és idegsejteket. Kollaborátoraink a közelműltben leírtak egy 3 pS konduktívitású Ca^{2+} csatornát aorta simaizomsejtben, amely az ER Ca^{2+} raktáráinak kiürítése után aktiválódik, vagyis kapacitív Ca^{2+} csatornának tekinthető. Sem Ca^{2+} , IP_3 , vagy más másodlagos jelátvivő molekula nem volt képes aktiválni ezt a csatornát izolált inside-out membrán patch preparátumokon.

A jelen közleményben arról számolunk be, hogy az általani kesztőből és humán tromboocitákból izolált CIF hozzáadása ezt a csatornát azonnal aktiválja, és a fiziológias Ca^{2+} áramokkal megegyező elektrofiziológiai történéseket eredményez. Továbbá, permeabilizált, majd TG-al kezelt tromboociták hozzáadása izolált inside-out membrán patch preparátumokhoz szintén aktiválta a vizsgált csatornát, amely a permeabilizált tromboociták által termelt *in vivo* CIF kiáramlásának eredményeként jött létre.

Azt is bemutatjuk, hogy tromboocitából izolált CIF extraktumokat HPLC-vel tovább tudtam tisztítani, és az így előállított különlegesen tiszta CIF frakciók mind *Xenopus* oocitákba injektálva, mind a fent ismertetett patch mérésekben aktívnak bizonyultak.

Ezek az adatok dokumentálják az első fiziológiásan is működő kapacitativ Ca^{2+} csatornát és annak valószínű aktivátorát érfaei simaizomszövetekben.

4. számú közlemény

Annak ellenére, hogy a Ca^{2+} influx biológiai szerepéről kiterjedt ismereteink vannak, keveset tudunk a kapacitativ és egyéb Ca^{2+} influx csatornák elektrofiziológiai és molekuláris jellemzőiről és aktiválódásuk folyamatairól. Kollaborátoraink nemrég beszámoltak arról, hogy az ER Ca^{2+} depleció által aktivált Ca^{2+} csatornák (Icrac) mellett létezik egy hasonló módon aktivált nonszelektív csatorna (Icrwn) is Jurkat sejtekben és humán perifériás leukocitákban.

Ez a közleményünk bemutatja, hogy mindkét csatorna aktiválása fokozódik CIF hozzáadásakor. A CIF hatás analízise egy reverzibilis aktiválódást mutat, a csatorna a CIF eltávolításakor inaktívulódik, ismételt hozzáadására újra aktiválódik izolált inside-out patch preparátumokon. A leirt kísérletes eredmények további bizonyítékul szolgálnak a CIF, mint diffúzió útján terjedő másodlagos jelátvivő molekula létezésére. A közleményben azt is leírjuk, hogy a nonszelektív csatorna nemcsak CIF, hanem egy másik másodlagos jelátvivő, diacil-glicerol hatására is aktiválódik. E kettős aktivációs mechanizmus a nonszelektív csatornák kiterjedt szerepét sugallja a vizsgált sejtekben.

5. számú közl. ny

Ebben a munkánkban arra kerestük a választ, hogy a CIF vajon az endoplazmatikus hálózatban szintetizálódik-e, illetve hogy milyen sejtalkotók jelenléte szükséges a szintéziséhez. Pura-2-vel feltöltött albinó *Xenopus* oocitákat centrifugáltam, hogy az ER-t *in vivo* elkülönísem a többi sejtalkotótól. Ezt követően az oocitákat TG-nal kezelttem az ER kiürítése céljából, majd a membránon keresztüli Ca^{2+} beáramlást fluoreszcens mikroszkópiával detektáltam. A Ca^{2+} ionok térbeli eloszlása és a kísérletet szimuláló számítógépes modell analízise azt mutatta, hogy a Ca^{2+} beáramlást kiváltó molekula (CIF) diffúziója az ER-ből kellett, hogy induljon.

Azt is megvizsgáltam, hogy humán tromboocitákból és patkány májsejtből izolált ER mikroszóma frakció képes-e önálló CIF szintézisre. Eredményeink szerint TG-nal kezelt ER vezikulákból az intakt sejtekből izolálható CIF-el megegyező hatású CIF aktivítást lehet izolálni. Sőt, nemcsak a mikroszómak seves extrahálásával tudtam CIF-et nyerni, hanem a mikroszómak lecentrifugálása után azok feloldásából is kimutattam a CIF aktivítást, amely jelzi, hogy a termelt CIF valóban exportra kerül.

Adataink igazolják, hogy az endoplazmatikus hálózatban lévő **sejtalkotó nem kell a CIF alapvető szintéziséhez.**

Összefoglalás

1. Emlős és élesztő sejtekből, amelyekben az ER Ca^{2+} raktárát kiirtottuk, egy kis molekulasúlyú molekulát (Ca^{2+} influx faktor, CIF) tudtunk izolálni, amelynek előzetes vizsgálatokkal megállapított fiziko-kémiai paraméterei megegyeznek a korábban feltételezett és részben leírt paraméterekkel.

2. Extraktunkat egy másik sejtbe injektálva Ca^{2+} beáramlást idéztünk elő az adott sejtben. Az extrakt kivételül nem hat, és Ca^{2+} szenzitív indikátorral különböző Ca^{2+} koncentrációk jelenlétében végzett kísérleteink megmutatták, hogy valódi Ca^{2+} beáramlásról van szó. A Ca^{2+} hullám terjedése megfelel egy kb. 600-700 Da molekulásulvíz anyag diffúziójának sebességével, és különbözik minden eddig leírt Ca^{2+} hullám terjedési tulajdonságaitól.

3. Megmutattuk, hogy a Ca^{2+} influx nem függ az ER és a plazma membrán fizikai kapcsolatóitól, tehát Ca^{2+} beáramlás ott is történik, ahol a membrán közelében nem található ER. A Ca^{2+} influx akkor is létrejött, ha CIF extraktunkkal együtt Ips blokkolókat (heparin ill. monoklonális receptor-blokkoló) injektáltunk a sejtbe, mutatva, hogy a hatás nem függ az oociták saját ER-ának állapotától.

4. Elektrofiziológiai módszerekkel megértük, hogy a CIF a plazma membrán egy Ca^{2+} specifikus csatornáját (lcwac, Calcium release activated calcium current) közvetlenül képes aktiválni már kis koncentrációban is, míg nagyobb dózisban egy non-selektív Ca^{2+} csatornát (lcwm, Calcium release activated non-selective cation current) is megnyitja. A csatorna aktiválása reverzibilis, CIF kimosására a csatorna záródik, ismételt hozzáadására újra aktiválható.

5. Elsőként írtuk le, hogy ingerlékeny sejtek (érfali simaizomsejt) is rendelkeznek a kapacitativ Ca^{2+} beáramlás apparátusával, és fiziológias működésük során maguk is használják ezt a folyamatot. Az endothein és a vazopresszin például CIF-en keresztül fejtik ki hatásukat.

6. CIF a Ca^{2+} molekulát számos sejttypusból sikeresen izoláltunk (T-sejtek, J774 makrofágok, élesztő, pankreasz béta-sejtek, trombociták, érfali simaizomsejtek, HeLa-sejtek), és élettani hatásait elemeztük. Számnunkra is meglepő volt, hogy feltárt sejtek és izolált ER mikroszómák is képesek a CIF szintézisére TG kezelést követően. Ez az eredmény különösen az ER mikroszómák esetében figyelemre méltó, ugyanis semmilyen más sejalkotó nem volt jelen *in vitro*, és azért is, mert az esetleges CIF prekursoroknak már az ER-ban kellett lenniük a TG hozzáadásakor.

7. A diabétes és egyéb patológias körülmények mellett megfigyelhető kapacitativ Ca^{2+} influx csökkenés magyarázatát segíthetik izolált ER mikroszómákon végzett Glc-6-P és Ca^{2+} ion felvételi méréseink. Magas plazma glükóz-szint a két ion együttes kompartmentalizációja útján fokozhatja az ER dinamikus raktárainak Ca^{2+} affinitását, amely a CIF csökken szintézisét eredményezheti, ezáltal gátolva a kapacitativ Ca^{2+} beáramlást.

8. Bár a CIF pontos molekuláris szerkezete még nem ismert, sikerült egy meglehetősen homogén és tiszta extraktumot előállítani különféle szeparációs technikák alkalmazásával. Amennyiben nagy mennyiségű extraktot készítettünk, megnyitlik az új olyan műszerek használata előtt, mint például a tömegspektrométer vagy az NMR, amelyek segítségével a CIF kémiai mibenlétét is felfedhetjük.

Az előzőekben leírtakból könnyen megérthető, hogy a CIF kutatása kiemelkedő jelentőséggel bír nemcsak alap kutatás jellegét tekintve, hanem azért is, mert az általa mediált folyamatok felelősek létfontosságú élettani folyamatok helyes működéséért. Kutatásunknak messzenyúló klinikai hatásai lehetnek: a CIF pontos szerkezetének és metabolizmusának megismerése megnyithatja az utat a CIF stimulálásán vagy gátlásán keresztül ható farmakológiai készítmények előtt, amelyek az immunrendszer aktivitását, az inzulin, a nyál és gyomormedv szekrécióját, a sejtek proliferációját, az érfali simaizomk tonusát, vagy a szívizomsejtek diastolés relaxációját szabályozzák.

Publikációs jegyzék

A tézisiek alapját képező, folyóiratban megjelent közlemények:

1. Chen, P. Y., **Csautora, P.**, Veyna-Burke, N. A., Marchase, R. B.: The sequestration of glucose-6-phosphate and Ca²⁺ are mutually enhanced in microsomes from liver, brain, and heart. *Diabetes* 47: 874-881 (1998).

2. **Csautora, P.**, Su, Z., Kim, H. Y., Bugrim, A., Cunningham, K. W., Nuccitelli, R., Keizer, J. E., Hanley, M. R., Bialock, J. E., Marchase, R. B.: Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 121-126 (1999).

3. Trepakova, E. S., **Csautora, P.**, Hunton, D. L., Marchase, R. B., Cohen, R. A., Bolotina, V. M.: Calcium influx factor (CIF) directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275: 26158-26163 (2000).

4. Su, Z., **Csautora, P.**, Hunton, D., Shoemaker, R. L., Marchase, R. B., Bialock, J. E.: A store-operated non-selective cation channel in lymphocytes is activated directly by Ca²⁺ influx factor (CIF) and diacylglycerol. *Am. J. Physiology - Cell Physiology*. közlés alatt (elfogadva 2001. február)

A tézisiek alapját képező, hírvírt alatt álló közlemény:

1. **Csautora, P.**, Bugrim, A., Hunton, D. L., Marchase, R. B. Calcium influx factor is synthesized by the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* CO:00686/2000

Egéb. művésztett folyóiratban megjelent közlemények:

1. Miseta, A., **Csautora, P.**, Sipos, K., Wheatley, D. N. The acid extractable amino acid pool in *Escherichia coli*: possible role in energy-dependent amino acid accumulation and protein synthesis. *Microbios* 84: 207-219 (1995).
2. Miseta, A., **Csautora, P.**, Sipos, K., Wheatley, D. N.: Phenylalanine utilisation for protein synthesis in δ -phenylpyruvic acid treated *Escherichia coli* cells. *Microbios* 87: 123-133 (1996).

3. Bogner, P., **Csautora, P.**, Cameron, I. L., Wheatley, D. N., Miseta, A.: Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camels. *Biophysical Journal* 75: 3085-3091 (1998).

4. Miseta, A., **Csautora, P.** Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1232-1239 (2000).

Folyóiratban megjelent elbődáskunatok:

1. **Csautora, P.**, Borbely, Cs., Miseta, A., Bogner, P.: The relationship of potassium content and rubidium influx in different mammalian erythrocytes. *Cell Biology International* 20: 233 (1996).

2. Bogner, P., Miseta, A., Ludány, A., Szarka, Á., **Csautora, P.**, Wheatley, D. N., Kellermayer, M.: The physico-chemical basis of ouabain-resistant rubidium influx in different mammalian erythrocytes. *Molecular Biology of the Cell* 7: 253a (1996).

3. Chen, P. Y., **Csautora, P.**, Veyna-Burke, N. A., Marchase, R. B. The sequestration of glucose-6-phosphate and Ca²⁺ are mutually enhanced in microsomes from liver, brain, and heart. *FASEB Journal* 12: A435 (1998).

4. **Csautora, P.**, Kim, H. Y., Cunningham, K. W., Hanley, M. R., Marchase, R. B. An endoplasmic reticulum-independent calcium influx factor is conserved from yeast to man. *FASEB Journal* 12: A435 (1998).

5. **Csautora, P.**, Bugrim, A., Hunton, D. L., Keizer, J. E., Marchase, R. B. Calcium influx factor is synthesized by the endoplasmic reticulum. *FASEB Journal* 13: A1034 (1999).

6. Hunton, D. L., **Csautora, P.**, Dell'Italia, L. J., Lucchesi, P. A., Marchase, R. B. Extracts from hypertrophied dog myocardium induce Ca²⁺ influx in *Xenopus* oocytes. *FASEB Journal* 13: A439 (1999).

7. Trepakova, E. S., **Csautora, P.**, Marchase, R. B., Cohen, R. A., Bolotina, V. M. Direct activation of single store-operated cation channels by calcium influx factor in smooth muscle cells. *Circulation* 100: 1496 (1999).

8. Trepakova, E. S., **Csutora, P.**, Gericke, M., Marchase, R. B., Cohen, R. A., Bolotina, V. M.: Store-operated non-selective cation channels directly activated by calcium influx factor (CIF) in smooth muscle cells. Biophys. J. 78: 193a (2000).
9. **Csutora, P.**, Trepakova, E.S., Hunton, D.L., Hayes, B.K., Cohen, R.A., Bolotina, V.A., Marchase, R.B.: Calcium influx factor - purification and direct activation of store-operated cation channels in isolated patches from smooth muscle cells. FASEB Journal 14: A580 (2000).
10. McFerrin, H.E., **Csutora, P.**, Su, Z., Blalock, J.E., Marchase, R.B. Calcium influx factor releases sequestered calcium from inside-out plasma membrane vesicles. FASEB Journal 14: A581 (2000).