

PhD értekezés tézisei

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

*Dr. Csutora Péter*

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

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Klinikai Kémiai Intézet

2001

# Bevezetés

## Az élő sejtek $\text{Ca}^{2+}$ homeosztázisa

Számos intracelluláris jelátviteli mechanizmus a citoplazma  $\text{Ca}^{2+}$  szintjének szabályozásán alapul. Lángfotometriás mérések tanúsága szerint az élő sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  tartalma sejtvízre vonatkoztatva 1-2 mmol/l, tehát megegyezik az extracellulárisan található  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségével. Ez a módszer azonban nem veszi figyelembe sem a sejten belüli kompartmentalizációt, sem pedig az ionizált (szabad) és kötött állapotban lévő  $\text{Ca}^{2+}$  ionok viszonyait. A fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  indikátorok megjelenésével kiderült, hogy nem stimulált sejtekben a citoplazma szabad  $\text{Ca}^{2+}$  szintje ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) rendkívül alacsony, a  $10^{-7}$  M-os tartományban van. Ez a koncentráció érték azonban csak a jéghegy csúcsa, ugyanis a citoplazmában lévő  $\text{Ca}^{2+}$  ionok több, mint 99%-a fehérje természetű pufferekhez 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 különbsége, vagyis a sejten belüli  $\text{Ca}^{2+}$  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 mitokondriumok szerepe a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisban, azonban újabb adatok szerint ezek aktívan részt vesznek a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint ingadozásainak térbeli és időbeli szabályozásában, a dinamikus  $\text{Ca}^{2+}$  tárolásban, és az ER felé való negatív és pozitív visszacsatolásban.

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

## $\text{Ca}^{2+}$ influx mechanizmusok

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

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

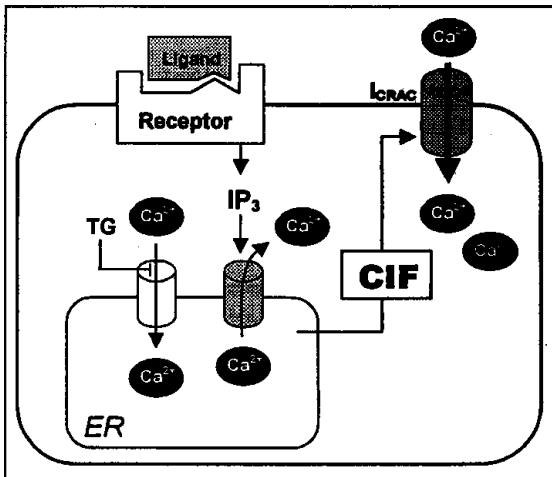
2) Receptoron keresztül beindított direkt  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Ilyen módon hat az ATP, glutamát, acetilkolin, diacil-glicerol, vagy az arachidonsav, amelyek másodlagos jelátvitel nélkül, közvetlenül is képesek  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitás fokozódást okozni egyes sejtekben.

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

### A kapacitív $\text{Ca}^{2+}$ influx mechanizmusa

Amikor a sejtet serkentő ágens hozzákötődik receptorához, a sejtben belül egy G-proteinhez vagy tirozin-kinázokhoz kapcsolt folyamat hatására inozitol 1,4,5-trifoszfát ( $\text{IP}_3$ ) keletkezik, amely az ER felszínén lévő receptorához kötődve annak  $\text{Ca}^{2+}$  csatornáit megnyitja, és a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok kiáramlanak a citoplazmába.

Ezt igen hamar követi egy másodlagos  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás, amely során a sejt környezetéből a megnyíló úgynevezett kapacitív csatornákon át a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok a sejtbe áramlanak. Az így létrejövő megemelkedett  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint számos biológiai folyamat kulcsfontosságú része, és hiányában nem jöhet létre például a T-sejtek aktiválása, a citokinek



termelése, az inzulin és a nyál szekréciója, az ivarsejtek fertilizációja, a trombociták granulumainak kiürítése, vagy az erek összehúzódása. A kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx kiváltása kísérleti körülmények között lehetséges  $\text{IP}_3$  nélkül is, ugyanis egy

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

Ez idő szerint a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx aktiválásának pontos részletei nem ismertek, így többek között az sem, hogy milyen módon jut el az információ az ER kiürüléséről a plazma membrán  $\text{Ca}^{2+}$  csatornáihoz. Három fő, egymást nem teljesen kizáró elmélet létezik, amely ezt a folyamatot próbálja magyarázni: 1) az  $\text{IP}_3$  receptorai és a plazmamembrán közötti fizikai kapcsolat segít a csatornák aktiválásában; 2) vezikuláris transzport mechanizmusok; 3) egy jelátvivő molekula ( $\text{Ca}^{2+}$  influx faktor, CIF) jut el az ER-ből a plazmamebránhoz, amely ott a csatornák megnyílását eredményezi.

1) Az első, „konformációs kapcsolás” elmélet szerint fizikai kontaktus van az ER-membránjában található  $\text{IP}_3$  receptorok és a plazma membrán  $\text{Ca}^{2+}$  csatornái között, és az  $\text{IP}_3$  receptorához való kötődése egyúttal a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx-ot is kiváltja. Az elmélet igazolását hátráltatja, hogy a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  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 membráncsatornái egyben  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák is (transient receptor potential channel, TRP), és azóta ezen csatornák kutatására terelődött a hangsúly. Kimutatták, hogy emlős sejtbe bejuttatott izolált TRP csatornák kapcsolódhatnak az  $\text{IP}_3$  receptorokhoz, és ez a kapcsolat beindíthatja a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlását a sejtbe. További kutatások az aktin citoskeleton rendszer szerepére utalnak a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx létrejöttében. A konformációs kapcsolás hipotézis legnagyobb hiányossága, hogy az  $\text{IP}_3$ -tól független folyamatokat (pl. szfingozinok és egyéb aktivátorok) és a farmakológias szerek hatását (pl. TG) nem tudja kielégítően magyarázni.

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

blokkoló brefeldin-A nem bénította teljesen a  $\text{Ca}^{2+}$  influx-ot. Bár ez a hipotézis kétségtelenül érdekes, a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  ionok az ER-ből kiáramlanak, egy kis molekulású másodlagos jelátvivő keletkezik az ER-ban, és ez diffúzióval vagy más módon eljut a plazma membránhoz, ahol közvetlenül a  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákra hatva megnöveli a plazma membrán  $\text{Ca}^{2+}$  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. Tőle tudjuk a következő jellemzőket: kis molekulású, kb. 500-700 Da, nem fehérje természetű, negatív töltésű, foszfáttal 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 ( $100^{\circ}\text{C}$ , 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 negatív Dische-reakciót (dezoxiribonukleotidok) mutat, de pozitív az Euler-Hahn- (ribonukleotidok), Lowry-foszfátáz- (foszfátok) és a naftol-rezorcinol-kénsav-reakciót (cukrok) illetően.

Mindezek alapján valószínűsíthető, 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  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvivő molekulák, de ezek az ER deplécióját okozzák, míg a CIF egy ezt követő mechanizmus része.

## A $\text{Ca}^{2+}$ influx következményei

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

Fontos megjegyezni, hogy különböző amplitúdójú, sebességű és tér-idő mintázatú  $\text{Ca}^{2+}$  influxok más és más folyamatokat indítanak be. Hosszú ideig tartó  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedések például egy NF-AT nevű, míg a rövid  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedések egy másik, NF- $\kappa$ B nevű transzkripció 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  $\mu\text{M}$ -os  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedésre van szükség, míg a T-sejtek teljes aktiválódása csak 2 órás emelkedett  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hatására következik be.

Eleinte azt hitték, hogy a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx csak fiziológiás és gyógyszerrel indukálható folyamatok része, de nem vesz részt pathológiás állapotok kialakulásában és fenntartásában. Később egyre több összefüggést ismertek fel a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  és egyes kórképek pathomechanizmusa között. Napjainkban már bizonyos, hogy a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx csökkenése vagy túlzott aktivitása is szerepet játszik a diabetes, diabeteses szövődmények, cardiomyopathiák, pancreatitis, és psoriasis kialakulásában, vagy például az idegsejtek trauma utáni kóros működésében. Legújabb eredmények szerint ugyanez a folyamat kapcsolatos egyes malignus tumorok kialakulásával, az Alzheimer-kórban megfigyelhető amiloid lerakódással, de azt is leírták, hogy a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx gátolja a renin szekrécióját. Mindezek a példák tovább hangsúlyozzák a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx és annak feltételezett aktivátorai, így a CIF kutatását.

## Kérdésfelvetés

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

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

7. Mi a CIF hatásmechanizmusa, pontosan milyen csatornáko. Milyen 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  $IP_3$  receptorok membránhoz való kapcsolódása a CIF hatásához? Beleillik-e a CIF a konformációs hipotézisbe, vagy esetleg cáfolja azt?
9. Vannak-e olyan pathológiai folyamatok és betegségek, amelyek a CIF működésének vagy mennyiségének kóros voltán alapszanak?



A  $\text{Ca}^{2+}$  influx faktor izolálása

A CIF – szerepéből és feltételezett szintetikus mechanizmusából adódóan – olyan sejtekből nyerhető ki, amelyekben előzőleg az ER  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmát kiürítettük. Ennek elérésére emlős primér sejtek (humán T-sejtek, trombociták, patkány pankreász béta-sejtek, érfali simaizomsejtek, szívizomsejtek) vagy kultúrák (Jurkat humán T-limfóma sejtek, J774 makrofágok, HeLa sejtek) esetében a már említett thapsigargin (TG) nevű növényi alkaloidot használtuk, amely irreverzibilisen bénítja az ER  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz-át, és így a "lcak" csatornán át az ER  $\text{Ca}^{2+}$  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 mutánst használtam, amelyben a PMR1 gén kiütése révén hiányzik az ER/Golgi  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz-a, és így nem képes az ER/Golgi  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztrálására.

A CIF izolálását a következő módszerrel végeztem: a TG-nal kezelt emlős (2  $\mu\text{M}$ , 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  $\text{BaCl}_2$ -al kezeltem (10 mM) a vicinális foszfátok (pl.  $\text{IP}_3$ ) kicsapása érdekében. Újabb centrifugálás után a felülúszót liofilizáltam, majd az így kapott pelletet 100%-os metanolban extraháltam (15 perc, rázás). A felülúszót centrifugálás után Sep-Pak Vac  $\text{C}_{18}$  (1 cc) oszlopon tisztítottam, majd beszárítás után ( $\text{N}_2$  gáz, 30°C) 100 mM-os ecetsavban feloldottam, és 30 kDa filteren ultrafiltráltam. Az így kapott extrakt CIF aktivitását – ha nem tisztítottam tovább – ebben az állapotban meghatároztam a *Xenopus oocita* bioassay segítségével.

A  $\text{Ca}^{2+}$  influx faktor fiziko-kémiai vizsgálata

A molekula pontos szerkezetének megismerése érdekében a fent vázolt tisztítás nem elegendő, további szeparálásra és fiziko-kémiai illetve műszeres analízisre van szükség. További tisztításhoz az ecetsavas extraktot először BioGel P-2 (Bio-Rad) gél-kromatográfiás oszlopon futtattam 100 mM-os ecetsavat használva eluensként. Az oszlopról 0.5 ml-es frakciókat nyertem, amelyekből UV abszorbanciát 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 )élő 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-ról 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 eltávolít. 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 sóatlanítást, és más módszereket használtam.

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

#### Az extraktumok CIF aktivitásának mérése *Xenopus* oocitákban

Albínó *Xenopus laevis* békákból a hasfalon át sebészeti módszerrel oocitákat nyertem. Az oociták folliculáris szövetét kollagenáz segítségével eltávolítottam, majd egyszerre kb. 25 oocitába sztereomikroszkóp alatt 14 nl 5 mM-os Fura-2 fluoreszcens  $Ca^{2+}$  indikátort injektáltam. A bioassay-t egy Olympus IX-70-es invertált fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztem el, amely fel volt szerelve digitális kamerával és gyors filter-váltóval (340 és 380 nm-es filterek a ráciometrikus Fura-2 fluoreszcencia mérésére). Két órát vártam, hogy az injektálás helye teljesen bezáródjon, majd egy-egy oocitát  $Ca^{2+}$ -mentes médium-ban egy házilag készített cellában a mikroszkóp tárgyasztalára helyeztem, és az oocitába a tárgyasztalra szerelt és CIF-extraktummal megtöltött injektor tűjét beleböktem. 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 kezdettől 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 fluoreszcens 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 fluoreszcencia emelkedést okoztak.

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

## Az extraktum. CIF aktivitásának mérése elektrofiziológiai módszerekkel

Kollaborációban végeztünk whole cell voltage clamp és patch clamp méréseket mind a CIF aktivitásának meghatározására, mind pedig az ionszelektivitás, gátolhatóság, stimulálási kinetika vizsgálatára. Target sejtékként használtunk szövettényészeti RBL (rat basophilic leukemia), Jurkat, és egér aorta simaizomsejteket, valamint primér frissen izolált humán perifériás 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 szimulációs modellt 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 számított 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 képéhez, amely a modell felállításakor megadott és feltételezett paraméterek helyességét mutatja.

## CIF szintézis feltárt sejtekben és izolált ER-ban

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

# Eredmények

## 1. számú közlemény

Ebben a közleményben a glükóz-6-foszfát és  $\text{Ca}^{2+}$  ionok sejten belüli együttes kompartmentalizációjának kérdéskörét tanulmányoztuk. Mikroszómákat izoláltam patkány szívből, májból és agyból, majd azt vizsgáltam, hogy ezek a mikroszómák *in vitro* milyen mértékben veszik fel a glükóz-6-foszfátot. Májsejtekben a glükóz-6-foszfátáz aktivitás magas, szemben az agysejtekkel és a szívizomsejtekkel, amelyeknek nem feladata a glükóz exportja, és így glükóz-6-foszfátáz aktivitásuk is alacsony.

A hipotóniás oldatban tartott mikroszómák glükóz-6-foszfát felvételét zsugorodásuk 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 megnöveli az ATP-dependens  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztráció mértékét, amelyet fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  mérésekkel határoztam meg. Továbbá, a mikroszómák gyors filtrációja után végzett enzimatis méreseink megmutatták, hogy ez a folyamat fordítva is igaz, tehát  $\text{Ca}^{2+}$  ionok és ATP hozzáadása fokozza a glükóz-6-foszfát importot az endoplazmatikus retikulum mikroszómákba. Ennek eredményeként a passzív ekvilibriumnál akár 3-4-szer magasabb glükóz-6-foszfát koncentráció is kialakulhat a mikroszómákban. Ez a glükóz-6-foszfát kocentráció emelkedés nem jelentkezett, ha csak  $\text{Ca}^{2+}$  vagy csak ATP volt jelen, és akkor sem, ha a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok és ATP mellé TG-t vagy egy  $\text{Ca}^{2+}$  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 hipotézisként is szolgálnak annak magyarázására, hogy intakt sejtekben az extracelluláris glükóz szint növekedésekor miért alakul ki fokozott  $\text{Ca}^{2+}$  szekvesztráció az endoplazmatikus retikulumban.

## 2. számú közlemény

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

Az így izolált CIF extraktumok tesztelésére egy bioassay-t fejlesztettem ki, amely során a CIF-eket fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  indikátorral feltöltött albínó *Xenopus laevis* oocitákba injektáltam, majd a  $\text{Ca}^{2+}$  influx mértékét direkt fluoreszcens és konfokális mikroszkópiás képalkotó eljárással detektáltam. A  $\text{Ca}^{2+}$  hullámok az injektálás pontján indultak, még akkor is, ha az oociták saját ER-át centrifugálással elkülöníttem a többi sejtalkotótól és az injektálás helyétől. Kontroll sejtekből készített extraktok nem okoztak  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedést, és az sem, ha az aktív CIF-et extracellulárisan adtam az oocitához. A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedés függött az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjától, de nem függött az  $\text{IP}_3$  rendszer épségétől, amely mutatja, hogy a CIF közvetlenül a plazma membrán csatornáin fejt ki hatását.

A CIF hatására bekövetkező  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedés elemzésére készített számítógépes modell kompatibilis egy kb. 700 Da molekulásúlyú jelátvivő molekula diffúziójával és hatásaival. Whole cell patch clamp méréseink azt is megmutatták, hogy az oocitában aktívnak mért CIF preparátumok Jurkat sejteken egy  $\text{Ca}^{2+}$  szelektív csatornát nyitnak meg ( $I_{\text{CRAC}}$ ), amely lényegesen gyorsabban aktiválódik, mint amikor a patch pipetta  $\text{Ca}^{2+}$  kelátort vagy  $\text{IP}_3$ -ot tartalmaz.

## 3. számú közlemény

Égészen a legutóbbi időkig úgy tartották, hogy kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  influx csak nem ingerlékeny sejtekben fordul elő, és nem érinti az izom- és idegsejteket. Kollaborátoraink a közelmúltban leírtak egy 3 pS konduktivitású  $\text{Ca}^{2+}$  csatornát aorta simaizomsejtekben, amely az ER  $\text{Ca}^{2+}$  raktárainak kiürítése után aktiválódik, vagyis kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  csatornának tekinthető. Sem  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{IP}_3$ , 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 általa készített és humán trombocitákból izolált CIF hozzáadása ezt a csatornát azonnal aktiválja, és a fiziológiás  $Ca^{2+}$  áramokkal megegyező elektrofiziológiai történéseket eredményez. Továbbá, permeabilizált, majd TG-al kezelt trombociták hozzáadása izolált inside-out membrán patch preparátumokhoz szintén aktiválta a vizsgált csatornát, amely a permeabilizált trombociták által termelt *in vivo* CIF kiáramlásának eredményeként jött létre.

Azt is bemutatjuk, hogy trombocitából 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 kapacitív  $Ca^{2+}$  csatornát és annak valószínű aktivátorát érfali simaizomsejtekben.

#### 4. számú közlemény

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

Ez a közleményünk bemutatja, hogy mindkét csatorna aktivitása fokozódik CIF hozzáadásakor. A CIF hatás analízise egy reverzibilis aktiválódást mutat, a csatorna a CIF eltávolításakor inaktiválódik, ismételt hozzáadására újra aktiválódik izolált inside-out patch preparátumokon. A leírt 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. Fura-2-vel feltöltött albinó *Xenopus* oocitákat centrifugáltam, hogy az ER-t *in vivo* elkülönítem a többi sejtalkotótól. Ezt követően az oocitákat TG-nal kezeltem 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 trombocitákból 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 aktivitást lehet izolálni. Sőt, nemcsak a mikroszómák savas extrahálásával tudtam CIF-et nyerni, hanem a mikroszómák lecentrifugálása után azok felülszójából is kimutattam a CIF aktivitást, amely jelzi, hogy a termelt CIF valóban exportra kerül.

Adataink igazolják, hogy az endoplazmatikus hálózaton kívüli ~~sejt~~ más sejtalkotó nem kell a CIF alapvető szintéziséhez.

## Összefoglalás

1. Emlős és élesztő sejtekből, amelyekben az ER  $\text{Ca}^{2+}$  raktárait kiürítettük, egy kis molekulású molekult ( $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást idéztünk elő az adott sejtekben. Az extrakt kívülről nem hat, és  $\text{Ca}^{2+}$  szenzitív indikátorral különböző  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációk jelenlétében végzett kísérleteink megmutatták, hogy valódi  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásról van szó. A  $\text{Ca}^{2+}$  hullám terjedése megfelel egy kb. 600-700 Da molekulású anyag diffúziójának sebességével, és különbözik minden eddig leírt  $\text{Ca}^{2+}$  hullám terjedési tulajdonságaitól.

3. Megmutattuk, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  influx nem függ az ER és a plazma membrán fizikai kapcsolatától, tehát  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás ott is történik, ahol a membrán közelében nem található ER. A  $\text{Ca}^{2+}$  influx akkor is létrejött, ha CIF extraktunkkal együtt  $\text{IP}_3$  blokkolókat (heparin ill. monoklonális receptor-blokkoló) injektáltunk a sejtbe, mutatva, hogy a hatás nem függ az oociták saját ER-ának állapotától.

4. Elektrofiziológiai módszerekkel megmértük, hogy a CIF a plazma membrán egy  $\text{Ca}^{2+}$  specifikus csatornáját (IC<sub>RAC</sub>, Calcium release activated calcium current) közvetlenül képes aktiválni már kis koncentrációban is, míg nagyobb dózisban egy non-szelektív  $\text{Ca}^{2+}$  csatornát (IC<sub>RAN</sub>, Calcium release activated non-selective cation current) is megnyit. 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 kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás apparátusával, és fizioológias működésük során maguk is használják ezt a folyamatot. Az endothelin és a vazopresszin például CIF-en keresztül fejtik ki hatásukat.



6. CIF a. <sup>1</sup>ítású molekulát számos sejttypusból sikeresen izoláltunk (T-sejtek, J774 makrofágok, élesztő, pankréasz béta-sejtek, trombociták, érfali simaizomsejtek, HeLa-sejtek), és élettani hatásait elemeztük. Számunkra 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 sejtalkotó nem volt jelen *in vitro*, és azért is, mert az esetleges CIF prekursoroknak már az ER-ban kellett lenniük a TG hozzáadásakor.

7. A diabetes és egyéb patológiás körülmények mellett megfigyelhető kapacitív  $Ca^{2+}$  influx csökkenés magyarázatát segíthetik izolált ER mikroszómákon végzett G<sub>6</sub>-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 csökkent szintézisét eredményezheti, ezáltal gátolva a kapacitív  $Ca^{2+}$  beáramlást.

8. Bár a CIF pontos molekuláris szerkezete még nem ismert, sikerült egy meglehetősen homogén és tiszta extraktumot előállítani különféle szeparálási technikák alkalmazásával. Amennyiben nagy mennyiségű extraktot készítünk, megnyílik az út 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 gyomornedv szekrécióját, a sejtek proliferációját, az érfali simaizmok tónusát, vagy a szívizomsejtek diasztolés relaxációját szabályozzák.

# Publikációs jegyzék

## A tézisek alapját képező, folyóiratban megjelent közlemények:

1. Chen, P. Y., **Csutora, P.**, Veyna-Burke, N. A., Marchase, R. B.:  
The sequestration of glucose-6-phosphate and  $\text{Ca}^{2+}$  are mutually enhanced in microsomes from liver, brain, and heart.  
Diabetes 47: 874-881 (1998).
2. **Csutora, P.**, Su, Z., Kim, H. Y., Bugrim, A., Cunningham, K. W., Nuccitelli, R., Keizer, J. E., Hanley, M. R., Blalock, 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., **Csutora, 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., **Csutora, P.**, Hunton, D., Shoemaker, R. L., Marchase, R. B., Blalock, J. E.: A store-operated non-selective cation channel in lymphocytes is activated directly by  $\text{Ca}^{2+}$  influx factor (CIF) and diacylglycerol.  
Am. J. Physiology - Cell Physiology, közlés alatt (elfogadva 2001. február)

## A tézisek alapját képező, bírálat alatt álló közlemény:

1. **Csutora, P.**, Bugrim, A., Hunton, D. L., Marchase, R. B.  
Calcium influx factor is synthesized by the endoplasmic reticulum.  
J. Biol. Chem. C0:00686/2000

## Egyéb, minősített folyóiratban megjelent közlemények:

1. Miseta, A., **Csutora, 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., **Csutora, P.**, Sipos, K., Wheatley, D. N.: Phenylalanine utilisation for protein synthesis in  $\beta$ -phenylpyruvic acid treated *Escherichia coli* cells.  
Microbios 87: 123-133 (1996).

3. Bogner, . **Csutora, P.**, Cameron, I. L., Wheatley, D. N., Miseta, A.: Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids. Biophysical Journal 75: 3085-3091 (1998).
4. Miseta, A., **Csutora, P.** Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms. Mol. Biol. Evol. 17: 1232-1239 (2000).

Folyóiratban megjelent előadáskivonatok:

1. **Csutora, 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, **Csutora, 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., **Csutora, P.**, Veyna-Burke, N. A., Marchase, R. B. The sequestration of glucose-6-phosphate and  $Ca^{2+}$  are mutually enhanced in microsomes from liver, brain, and heart. FASEB Journal 12: A435 (1998).
4. **Csutora, 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. **Csutora, 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., **Csutora, P.**, Dell'Italia, L. J., Lucchesi, P. A., Marchase, R. B. Extracts from hypertrophied dog myocardium induce  $Ca^{2+}$  influx in *Xenopus* oocytes. FASEB Journal 13: A439 (1999).
7. Trepakova, E. S., **Csutora, 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: I496 (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).