

OTKA ZÁRÓJELENTÉS

Pályázati azonosító: F038149

Témavezető: Dr. Csutora Péter

Bevezetés:

Az OTKA pályázat által támogatott kutatásunk fő célja a kapacitív Ca^{2+} beáramlás beindításáért felelős jelátviteli molekula, a Ca^{2+} influx faktor (CIF) sejten belüli termelésének és hatásmechanizmusának vizsgálata volt. Mivel előzetes kísérleteink feltételezték, hogy a CIF prekursorai között a glükóz-metabolizmus molekulái is szerepelhetnek, illetve diabéteszes betegek limfocitáiban a kapacitív Ca^{2+} beáramlás zavarát tapasztaltuk, kísérleteket végeztünk annak megállapítására is, hogy szerepet játszik-e a CIF kóros termelődése a diabéteszben megfigyelhető immunzavarok kialakulásában.

A kutatás során elvégzett munka és az elért eredmények a következő 3 fő csoportba oszthatók:

1. A CIF hatásmechanizmusának vizsgálata
2. A glükóz-metabolizmus és a Ca^{2+} homeosztázis kapcsolatának vizsgálata, különös tekintettel a CIF lehetséges prekursorainak vizsgálatára
3. A diabéteszes immunzavarok hátterének vizsgálata

1. A CIF hatásmechanizmusának vizsgálata

A kutatás munkatervében leírtak szerint egy korábbi kollaborációt felélénkítve azt vizsgáltuk, hogy miként hat a CIF a plazma membrán Ca^{2+} csatornáira: vajon az aktiváció közvetlen, vagy pedig a CIF egy másik molekulára hatva váltja ki a Ca^{2+} beáramlást?

Előzetes kísérleteink alapján azt feltételeztük, hogy a CIF a kalmodulin és a plazma membrán csatornái között fennálló direkt gátló kapcsolódás megszüntetésével aktiválja a csatornákat. Ehhez azonban a kalmodulin sokrétű kapcsolatai miatt más célpontokat is meg kellett vizsgálni. Korábbi kollaborátorunk (Victoria Bolotina, Department of Vascular Biology, Boston University, Boston, USA) olyan kísérletekbe kezdett, amelyek egy a Ca^{2+} jelátvitellel eddig kapcsolatba nem hozott molekula (Ca^{2+} -independens foszfolipáz A_2 , iPLA_2) és a kalmodulin kapcsolatát vizsgálták. Mivel az ő laborjuk rendelkezik az ioncsatorna mérésekhez szükséges műszerekkel és tapasztalattal, logikus döntésnek tűnt együttműködni velük, és egy hosszabb távú kollaborációs kutatásba fogtunk. A kollaboráció során ők az ioncsatorna méréseket, valamint az iPLA_2 enzim molekuláris biológiai manipulációját végezték. A mi feladatunk volt, és saját laborunkban végeztük a CIF izolálását, a CIF és iPLA_2 kalmodulin-sepharose oszlopkromatográfiát, különböző sejtenyészeti munkákat, az

iPLA₂ enzimátikus mérését ELISA kit segítségével, intracelluláris Ca²⁺ méréseket, és más, kisebb kísérleteket.

Röviden összefoglalva a következőket állapítottuk meg:

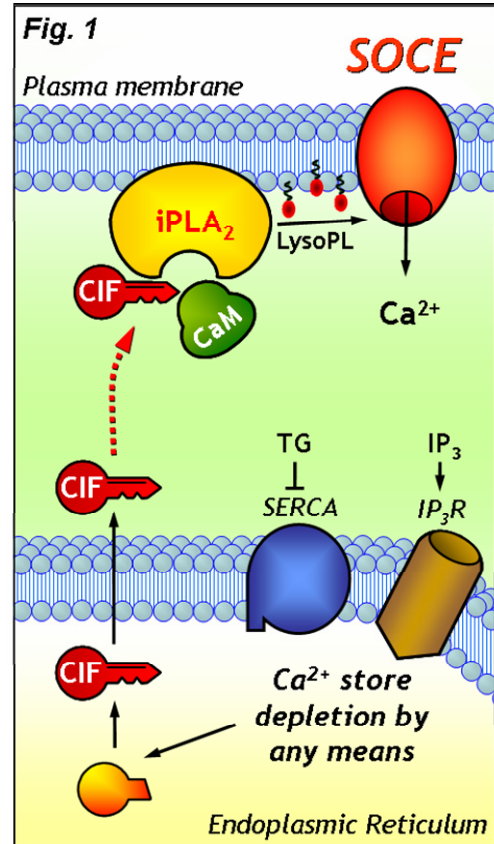
- Az iPLA₂ fehérje szükséges a kapacitív Ca²⁺ csatornák sikeres aktiválásához. Az iPLA₂ gátlása egy bromoenol-lakton nevű specifikus gátlószerral a Ca²⁺ csatornák inaktív állapotát váltja ki, amelyet a szokásos aktiválószerek nem tudnak visszafordítani. Továbbá, egy iPLA₂ antisense molekulával kezelt szövettenyésztési sejtekben gátolt a Ca²⁺ beáramlás.
- Ugyanígy gátolható a Ca²⁺ csatorna kalmodulin közvetlen adására (inside-out patch preparátumokban), illetve ez a gátlás megfordítható kalmodulin antagonisták hatására (pl. kalmidazol). Ez még magas Ca²⁺ koncentráció jelenlétében is igaz, tehát a CIF képes a kalmodulin – iPLA₂ kapcsolatot megbontani. CIF hatására a kalmodulinnal előzőleg inaktivált kalcium csatornák megnyílnak.
- CIF hatására a kalmodulinnal előzőleg inaktivált Ca²⁺ csatornák megnyílnak, ezt további kalmodulin adása nem képes visszafordítani. Ezek a Ca²⁺ csatorna preparátumok több más membránfehérjét is tartalmaznak, így jelen van a membránhoz kötve az iPLA₂ frakció egy része is.
- Thapsigargin adására (CIF szintézis beindul) a sejtekből lizálás után emelkedett iPLA₂ aktivitást tudtunk mérni, függetlenül attól, hogy mekkora volt a Ca²⁺ koncentráció.
- Sejtek homogenátumában CIF hozzáadását követően az EGTA hozzáadásához hasonló mértékű, megemelkedett in vitro iPLA₂ aktivitást detektáltunk, ami arra utal, hogy a CIF ilyen körülmények között is megszüntette a kalmodulin általi gátlást.
- Sejtlizátumot töltöttünk kalmodulin-sepharose oszlopra, mely így több fehérjét is megkötött. Az oszlopot eluáltuk különböző EGTA- és Ca²⁺-tartalmú oldatokkal, amely így elengedte a fehérjéket. CIF adására levált egy fehérjefrakció, amely tartalmazta az oszlopra feltöltött iPLA₂ aktivitás több, mint 70%-át.
- A kalmodulin – iPLA₂ kapcsolatot tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy a kapcsolat fiziológias intracelluláris viszonyok mellett is kialakul, illetve a CIF a kapcsolatot megszünteti. További fontos megállapításunk, hogy a kalmodulin a különböző iPLA₂ altípusokhoz (membrán-kötött, szabad citoplazmatikus, illetve rekombináns rövid forma) más és más pH és Ca²⁺ szint jelenlétében kötődik, ez megmagyarázhatja, hogy a CIF miért specifikusan az iPLA₂ β variánsára hat.

- Kollaborátorunk megmutatta, hogy az iPLA₂ által termelt lizofoszfolid termékek képesek közvetlenül aktiválni a plazma membrán Ca²⁺ csatornáit.

A fenti eredmények ismeretében egy teljesen új modellt írtunk le a kapacitív Ca²⁺ csatornák aktiválódásának magyarázatára (1. ábra). Modellünk szerint az endoplazmatikus retikulum Ca²⁺ raktárak kiürülése után CIF termelődik, amely a gátló kalmodulint leszakítja az iPLA₂ fehérjéről, ami ezzel aktívvá válik. A membránhoz kötött iPLA₂ különböző lizofoszfolid termékei révén megnyitja a sejtmembrán Ca²⁺ csatornáit, utat engedve a fiziológiai szempontból oly fontos Ca²⁺ beáramlásnak.

A csatornák aktivitásának megszűnése ugyanilyen sorrendben zajlik le: amint a stimulus megszűnik, az endoplazmatikus hálózat Ca²⁺ raktárai feltöltődnek, és a CIF termelése leáll, a citoplazmában található CIF pedig degradálódik. CIF hiányában a kalmodulin hozzákötődik az iPLA₂ enzimhez, amely inaktiválódik, és a lizofoszfolidok csökkenő szintje nem tudja a csatornát nyitva tartani; a kapacitív Ca²⁺ influx leáll.

Míndez azt jelenti, hogy a CIF nem direkt módon aktiválja a plazma membrán Ca²⁺ csatornáit, hanem egy újonnan felfedezett enzimatikus kaszkádon keresztül, amelynek megismerése számos potenciális farmakológiai alkalmazást tesz lehetővé.



Ide vonatkozó eredményeinket a következő folyóiratokban mutattuk be:

Smani, T., Zakharov, S.I., Leno, E., **Csutora, P.**, Trepakova, E., Bolotina, V.M.: Ca²⁺-independent phospholipase A2 is a novel determinant of store-operated Ca²⁺ entry.

J. Biol. Chem. 278: 11909-11915 (2003)

Impakt faktor: 6.482

Smani, T., Zakharov, S.I., **Csutora, P.**, Leno, E., Trepakova, E.S., Bolotina, V.M.: A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway.

Nature Cell Biol. 6: 113-120 (2004)

Impakt faktor: 20.649

Munkánkat több hazai és nemzetközi konferencián mutattuk be, melyek közül feltétlenül kiemelném a következő négyet, amelyeken mint meghívott előadó szerepeltem:

2003. május - XXXIII. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg – Kovács Tibor díjas Emlékelőadás

(Csutora, P., Smani, T., Miseta, A., Bolotina, V.: A kapacitív kalcium csatornák aktiválásának új modellje: kalmodulin és kalcium-independens foszfolipáz A₂)

2003. július - Gordon Research Conference on Calcium Signalling, Mt. Holyoke College, South Hadley, MA, USA – Poszter és Poszter előadás

(Smani, T., Zakharov, S.I., Csutora, P., Leno, E., Bolotina, V.B.: Calcium-independent phospholipase A₂ is a crucial determinant in store-operated calcium influx pathway)

Nagy megtiszteltetés, hogy meghívást kaptunk a kalcium metabolizmussal foglalkozó legfontosabb nemzetközi konferenciára, a kétévenként megrendezett Gordon konferenciára. Poszterünket a bíráló bizottság kiválasztotta, így egy előadást is tarthattunk munkánkból, amelyet nagy érdeklődés kísért. A Gordon konferencián való részvételt összekapcsoltam kísérletes munkával: 6 hetet töltöttem Boston-ban, kollaborátorunk laborjában. Ezalatt kidolgoztam egy módszert, amellyel az iPLA₂ aktivitását radioaktív prekursor módszerrel igen kis mintából is mérni lehet, valamint befejeztem néhány kísérletet közös cikkünkhöz.

2004. szeptember – European Life Scientist Organization (ELSO) 4th Conference, Nice, France – Előadás

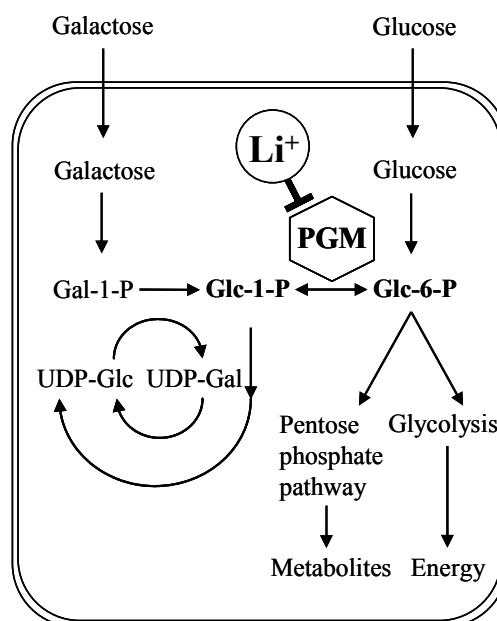
(Csutora, P.: Calcium influx factor is synthesized by the endoplasmic reticulum)

2005. július - Gordon Research Conference on Calcium Signalling, The Queen's College, Oxford, UK – Poszter

(Csutora, P., Péter, K., Zarayskiy, V., Litvinov, D., Bolotina, V.M.: Calcium influx factor (CIF) and store-operated Ca²⁺ entry: CIF properties, production and action)

2. A glükóz-metabolizmus és a Ca²⁺ homeosztázis kapcsolatának vizsgálata, különös tekintettel a CIF lehetséges prekursorainak vizsgálatára

A foszfo-glükomutáz (PGM) enzim a glükóz-1-foszfát (Glc-1-P) – glükóz-6-foszfát (Glc-6-P) átalakulást végzi (2. ábra). Laboratóriumunk korábbi megfigyelése, hogy olyan élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtekben, amelyekben a PGM aktivitása lecsökkent vagy hiányzik genetikai modifikáció következtében, a Ca²⁺ sejten belüli raktározása és a Ca²⁺ által közvetített jelátviteli mechanizmusok megváltoznak. Munkánk során ezért azt vizsgáltuk, hogy a PGM gátlás és a Ca²⁺ homeosztázis közti kapcsolat fennáll-e emlős sejtekben is, illetve, hogy milyen információt tudunk nyerni ezen kísérletekből a CIF lehetséges prekursoraira vonatkozóan.



A következő eredményeket kaptuk:

- A PGM in vitro gátlását elő lehet idézni lítium adagolásával is, ugyanis a lítium a PGM enzimet bénítja, azáltal, hogy a magnézium ionokat leszorítja az enzimről. Megmutattuk, hogy ez a gátlás in vivo is kiváltható.
- Lítium hozzáadására a Glc-1-P / Glc-6-P arány megemelkedett, jelezve, hogy a PGM in vivo gátlásának hatására felborult a glükóz-metabolitok egyensúlya. ATP méréseink ugyanakkor megmutatták, hogy a sejten belüli energetikai folyamatok nem sérültek, így a következményes Ca^{2+} szint változások nem energetikai okokból alakultak ki.
- Lítium hatására megemelkedett az élesztő sejtek Ca^{2+} tartalma, amennyiben a médium galaktóz tartalmazott, de nem, ha kellő mértékű glükóz is rendelkezésre állt. A lítium hatására megemelkedett a Ca^{2+} beáramlás mértéke ($^{45}\text{Ca}^{2+}$ felvétel), de a sejten belüli Ca^{2+} eloszlás nem változott meg. Ezek a változások visszafordíthatók voltak magnézium adagolásával, ami kompetitív módon felfüggesztette a PGM lítium általi gátlását.
- Emlős sejteken vizsgálva azt találtuk (patkány, Jurkat-sejtek, emberi limfociták), hogy a lítium hatásosan csökkentette a PGM aktivitását, amely a Glc-1-P / Glc-6-P arány megemelkedéséhez vezetett. Megfigyelhető volt ugyanakkor egy kompenzatorikus PGM génexpresszió emelkedés, ez azonban nem tudta visszafordítani a PGM lítium általi gátlását. Ez az eredmény azért is különösen érdekes, mert a lítium kezelés nemcsak kísérletesen érhető el, hanem mániás-depressziós bipoláris betegek terápiájának legfontosabb módszere is. Továbbá, leírtak lítium-kezelt betegekben olyan mellékhatásokat, amelyek kapcsolatban állhatnak a Ca^{2+} szint változásaival. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a lítium általi PGM gátlás és a következtében kialakuló metabolikus változások szerepet játszhatnak a lítium hatásmechanizmusában és/vagy mellékhatásainak kialakításában.
- További fontos megfigyelésünk, hogy PGM-deletált élesztő sejtek minden további stimulus nélkül CIF-et termelnek, vagyis a PGM gátlása elegendő volt az endoplazmatikus hálózat Ca^{2+} raktározásának olyan mértékű felborulásához, hogy a CIF szintézise be tudjon indulni. Ez a megfigyelés azért is figyelemreméltó, mert bizonyítja, hogy amennyiben a CIF prekursorai között glükóz-metabolitok is szerepelnek, azok a PGM által katalizált folyamat előtti molekulák köréből kerül ki.
- A CIF prekursorainak vizsgálatában további előrelépést hozott a CIF biokémiai tisztításának továbbfejlesztése. Megmutattam, hogy a CIF a nukleotidokhoz hasonló HPLC motilitást mutat, azonban viszonylag kevés UV-abszorbenciája arra utalhat, hogy a nukleotid bázis és a cukor oldallánc kapcsolata nem hagyományos (hasonlóan a cADP-ribóz ciklikus szerkezetéhez). Radioaktívan jelölt prekursor kísérleteink folyamatban vannak.

Ide vonatkozó eredményeinket a következő folyóiratokban mutattuk be:

Csutora, P., Strassz, A., Boldizsár, F., Németh, P., Sipos, K., Aiello, D.P., Bedwell, D.M., Miseta, A.: Inhibition of phosphoglucomutase activity by lithium alters cellular calcium homeostasis and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*.

Am. J. Physiology (Cell Physiology) 289: C58-67 (2005)

Impakt faktor: 3.939 (2004-es adat)

Csutora, P., Karsai, Á., Nagy, T., Vas, B., Kovács, G.L., Rideg, O., Bogner, P., Miseta, A.: Lithium induces phosphoglucomutase activity in various tissues of rats and in bipolar patients.

Int. J. Neuropsychopharmacol. – 2005. Nov 1;1-7 (2005)

doi: 10.1017/S146114570500622X

Impakt faktor: 4.128 (2004-es adat)

3. A diabéteszes immunzavarok hátterének vizsgálata

2004-ben előkészítettünk néhány fontos kísérletet a CIF és a diabétesz kapcsolatának vizsgálatára, amely a pályázati munkaterv részét képezi. Diabéteszben az immunrendszer kóros működése több módon jelentkezik, de talán legszembetűnőbb a T-sejtek által termelt citokinek mennyiségének csökkenése. Előzetes adataink azt megmutatták, hogy ennek közvetlen hátterében a kapacitív Ca^{2+} influx csökkenése vagy teljes eltűnése szerepel. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy vajon ez a csökkenés a csatorna szintjén történő gátlás miatt figyelhető-e meg, vagy pedig a CIF molekula szintézise, vagy egyéb aktiváló tényezők hiánya-e a közvetlen kiváltó ok.

A következő eredményeket kaptuk:

- Izolált humán limfocitákat és Jurkat-sejteket magas glükóz-koncentrációjú szövettenyésztési médiumban tartottunk 1 hétig, majd a sejtekből CIF-et izoláltunk. Az izolált CIF bioaktivitása nem különbözött a normál glükóz-koncentrációjú médiumban tartott sejtektől, amely arra utal, hogy az emelkedett glükóz-szint nem gátolja a CIF termelését. Ugyanezt az eredményt kaptuk néhány diabéteszes betegből izolált fehérvérsejt esetében is.
- Megvizsgáltuk, hogy ki lehet-e váltani az intracelluláris Ca^{2+} szintjének normális mértékű emelkedését a Ca^{2+} csatornák direkt aktiválásával hiperglikémiás körülmények között tartott sejtekben? Kontroll és magas glükóz-koncentráció mellett tartott izolált fehérvérsejteken meghatároztuk az endoplazmás retikulum kiürítésével indukálható Ca^{2+} influx mértékét, majd a sejtekhez adenofosztin A-t adtuk a csatornák direkt aktiválására. Eredményeink szerint a csatornák direkt stimulálása sem volt képes helyreállítani a csökkent Ca^{2+} beáramlást, amely arra utal, hogy a hiperglikémia következtében a csatornák válaszkészsége lecsökken.

- Újabb irodalmi adatok azt mutatták, hogy diabéteszben a megnőtt diacil-glicerol termelés és ezen keresztül protein-kináz C aktiválás, valamint a hexózamin metabolitok emelkedett termelődése közvetlenül is képesek a kapacitív Ca^{2+} csatornák működésének gátlására. Ez, valamint a diabéteszes betegekben található normális mértékű CIF termelés (lásd fent) arra enged következtetni, hogy a diabéteszes immunzavarok hátterében nem a CIF termelésének zavara áll.

Mindent összefoglalva, az OTKA pályázat támogatásával végzett kutatásunk újszerű és közérdekű eredményeket hozott, amelyek szignifikáns mértékben növelik ismereteinket a kapacitív Ca^{2+} influx szabályozásáról és a CIF által mediált jelátviteli folyamatokról.