

OTKA nyilvántartási szám: T 037911
Témavezető: Lengyel Imre

1

ZÁRÓJELENTÉS

Az agy egyes területein igen jelentős mennyiségű biológiailag aktív cink található. Ezen aktív cink szinaptikus vezikulákban vagy egyes fehérjékhez lazán kötődve tárolódik és neuronális aktivitás során képes mobilizálódni. Az így felszabaduló cink befolyásolja számos neurotranszmitter receptor funkcióját valamint képes modulálni proteinek valamint peptid modulátorok működését. Az azonban nem tisztázott, hogy e moduláló hatásoknak milyen fiziológias vagy patológias következményei lehetnek a neuronok működésének szabályozására, bár valószínűsíthető, hogy az aktivitások módosítása cinkkel számos sejten belüli változást idéz elő. Munkahipotézisünk az volt, hogy a neuronokban található cink jelentős szerepet tölt be sejszintű változások irányításában melynek egyik közvetítője a kalcium-calmodulin függő protein kináz II (CaMKII).

Pályázatunk négy éves időtartama alatt választ kerestünk és szereztünk számos specifikus kérdésre a cink központi idegrendszerben betöltött szerepéről. 1) Korábbi *in vitro* eredményeink azt mutatták, hogy a cink egy igen szokatlan mechanizmus útján befolyásolja a CaMKII aktivitását, ezért különös figyelmet szenteltünk a CaMKII és cink kapcsolatára illetve a cink által indukált autofoszforyláció lehetséges szerepére. A hatások pontosabb megismerése érdekében *in vitro* kísérletek mellett számos *ex vivo* és *in vivo* kísérletet indítottunk el. A biokémia mellett ezen kísérleteinkhez segítségül hívtuk a modern molekuláris biológia és elektrofiziológia eszköztárát. 2) A nemzetközi irodalomból tudtuk, hogy a cink szerepet játszik patológias folyamatok irányításában is. Kutatásainkban két olyan súlyos neurodegenerációhoz vezető folyamatot tanulmányoztunk melyben a sejtekből illetve setekben felszabaduló cink komoly szerepet játszhat. Ezek egyikében az Alzheimer kórban a cink jelátviteli folyamatokra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A másikban, a szenilis makula degeneráció (az Alzheimer kórhoz hasonló betegség a retinában) kialakulásának okait vizsgáltuk.

Reményeink szerint kísérleteink közelebb vezethetnek bennünket a cinkkel összefüggésbe hozható fiziológias és patológias folyamatok molekuláris mechanizmusainak megértéséhez.

1) Cink és CaMKII

Korábbi eredményeink azt mutatják, hogy *in vitro* a CaMKII aktivitása jelentős mértékben befolyásolható cinkkel. Bár alacsony cink koncentrációk mellett az enzim aktív (ez az aktivitás mindössze töredéke annak, amit calmodulin jelenlétében lehet mérni) magas cink koncentrációk esetén az enzim elveszti aktivitását. Továbbá az is szembetűnő volt, hogy az egyébként calmodulin aktivált enzim aktivitását teljesen meg lehetett gátolni cink jelenlétében. Az egyik, hogy a cink kötésekor a calmodulin kötés meggyengül, a másik pedig, hogy ez a cink kötés egy új autofoszforilációs reakciót indukál, melynek során CaMKII egy gátolt állapotba kerül, annak ellenére, hogy az egyébként "aktiváló" Thr286 foszforilációs helyek még mindig foszforiláltak. A cink indukálta gátló foszforiláció egy új, általunk azonosított helyen a Ser279 aminosavon történt.

Gátló foszforiláció lehetséges szerepe LTP-ben

Felmerült annak kérdése, hogy a Ser279 gátló foszforilációnak lehet-e szerepe a tanulási folyamatokban. Korábbi adatok azt mutatták, hogy a CaMKII T286 foszforilációjának fenntartása szükséges és elégséges feltétel a hosszú távú potenciáció (LTP) fenntartásához. Mivel ez a hely felelős az enzim autonóm (calmodulin független) aktivitásának kialakításáért így feltételezték hogy a foszforiláció mellett az autonóm aktivitás is fennmarad hosszab távon mely szubsztrát fehérjék folyamatos foszforilációját vonja maga után. Bár számos kísérleti eredmény utalt arra, hogy ez a „dogma” nem helytálló, konkrét kísérletes bizonyíték arra nem létezett, hogy a CaMKII autonóm aktivitása nem marad meg az LTP késői fázisaiban. Bár a CaMKII aktivitásának mérése nem bonyolult annak elektrofiziológiai mérésekkel való kombinálása nagyon nehéz és időigényesnek bizonyult. A befektetett energia azonban megtérülni látszik, mert eredményeink 2004 év végi European Journal of Neuroscience-ben történt közlését követően a 2005 évi Society for Neuroscience konferencián már a lehetséges gátló foszforilációt beépítették a CaMKII működését modellező munkákba. Mivel eredményeink publikálása megtörtént, csak röviden összefoglalva ismertetnénk ezt a munkát.

Professzor T.V.P. Bliss laboratóriumával (Mill Hill, London, UK) együttműködve sikerült megmérnünk a CaMKII teljes és autonóm aktivitását tetanusz

és tetraethyl ammonium indukálta LTP-ben hipocampális szeletek CA1-es régiójában. Azt találtuk, hogy bár a CaMKII T286 foszforilációjának emelkedése hosszú távon fennmarad az LTP indukcióját követően, az enzim autonóm aktivitása a stimulus megszűnte után csaknem azonnal visszatér a stimulálás előtti kindulási állapotba. Ez csak úgy lehetséges, ha a T286 foszforilációja mellett egy az enzimet gátló folyamat indul el. Ennek egyik lehetséges útja egy gátló foszforiláció bekapcsolása. Korábbi eredményeink alapján javaslatot tettünk arra, hogy ez a gátló foszforilációs hely S279. Továbbiakban ennek bizonyítását kíséreltük meg.

S279A mutáns CaMKIIa fehérje és az azt túltermelő transzgenikus egerek előállítás.

A S279 foszforilációs hely szerepének megértése érdekében ezen hely alanin mutánsát állítottuk elő. A Dr Howard Schulmann által rendelkezésünkre bocsátott vad típusú SR α CaMKII plazmidot felhasználva létrehoztunk egy Ser279Ala mutáns enzimet. Ehhez először a plazmidból kihasítottuk azt az 1.5 kbp DNS szakaszt mely az enzim kódolásáért felelős. Tisztítás után a DNS fragmentet az úgynevezett pAlter-Max vektorhoz ligáltuk. Ezt a ligátumot azután JM109 E.Coli sejtekbe transzformáltuk, melyeket LB agarra ültettük ki chloramphenicol jelenlétében. A telepekből ezután sikerült DNS-t izolálni QIAprep Spin miniprep kittel és végül a mutagenézishoz használandó DNS plazmidot Qiagen plasmid maxi kittel nyertük ki. A pont mutációt az „altered sites II mammalian mutagenesis” rendszerrel végeztük, melyhez a következő oligot terveztük: 5'-CCACTGTGGCCGCCTGCATGCAC. Pont mutáció létezését és pontosságát többszöri szekvenálással is ellenőriztük. Az így keletkezett mutánst pAlter-CaMKII S279A-nek kereszteltük. Mivel sikerült emlős rendszerbe inzertálnunk mind a vad típusú és mutáns vektort, így lehetővé vált azok transzfekciója COS 7 sejtekbe. 48 órával a transzfekció után a sejteket egy proteáz és foszfatáz gátlókat tartalmazó homogenizációs pufferben tártuk fel. A teljes sejt lizátumból eltávolítottuk a nagy sejtörmelékét és a feltáratlan sejteket egy 500 g centrifugálással, majd az így nyert felülúszót CaMKII aktivitásméréseknek vetettük alá, illetve a maradékot fagyasztottuk -80 C-on. Az aktivitásmérések eredményei azt mutatta, hogy a pont mutáció nem változtatta meg az enzim calcium-calmodulin függő aktivitását.

Az igen nagy nemzetközi érdeklődés miatt egy transzgenikus egér törzs előállításába is belekezdünk Dr Sántha Miklós társ pályázóval. A cirkuláris plazmidról (pCMVmCamKIIa) Cfr10I restrikciós enzimes hasítás révén kivágtuk a transzkripció egységet (CMVmCamKII) és a fragmentet agarózgélből izoláltuk. A tisztított, lineáris CMVmCamKII transzgént 2 ng/μl koncentrációban használtuk mikroinjektálásra. Transzgenikus állatok előállítására a hagyományos pronukleusz mikroinjekciót alkalmaztuk. Petesejt donornak a B6 X CBA F1 egértörzset választottuk. 6-8 hetes nőstény egereket vemhes kanca szérum (PMSG-Pregnant Mares Serum Gonadotropin) (Sigma) és 48 óra múlva human chorion gonadotropin (HCG) (Sigma) intraperitoneális oltásával (5 unit/egér) szuperovuláltattunk. A megtermékenyített petesejteket a petevezetőből izoláltuk és a kumuluszsejtektől rövid hyaluronidáz enzimes kezeléssel választottuk el. A petesejteket többször átmostuk M2 mediumban és utána összegyűjtöttük. Mikroinjektálásra Hoffman optikával és kondenzorral felszerelt Nikon Eclipse TS 100 mikroszkópot és Leitz-típusú mikromanipulátort használtunk. A megtermékenyített petesejtek hím pronukleuszát 2 ng/μl linearizált, tisztított DNS-vel injektáltuk. A mikroinjektálás végén az ép, egészséges petesejteket izoláltuk és Swiss vazektomizált hímekekkel párosított, B6 X CBA F1 áterhes nőstények petevezetőjébe ültettük vissza.

1352 petesejtet mikroinjektáltunk a linearizált, mutáns CamKII transzgénnel és 614 petesejtet ültettünk vissza álvemhes nőstények petevezetőjébe. 75 megszületett utód közül 11 egér (11.67%) hordozta a transzgént, amit PCR reakcióval és dot blot hibridizációval mutattunk ki. A transzgenikus állatok és ellenkező nemű, vad típusú F1 (C57/B6 X CBA) egerek keresztezése révén heterozygóta transzgenikus vonalakat hoztunk létre. Az utódokat PCR reakcióval és dot blot hibridizációval genotipizáltuk. A 11 vonalból 1 nem öröközte utódaira a transzgént (mozaicizmus), 1 nőstény (984) pedig sterilnek bizonyult. A beépült transzgének kópiaszámát dot blot hibridizációval becsültük meg.

A transzgén kifejeződését Real time RT-PCR technikával határoztuk meg. A heterozygóta transzgenikus utódok májából, szivéből és agyából totál RNS-t preparáltunk, reverz transzkripcióval cDNS-é írtuk át és minden mintából elvégeztük a transzgén és egy belső kontroll gén (egér β-aktin) amplifikációját. A transzgének

Témavezető: Lengyel Imre

határértékhez tartozó ciklusszámát (C_t) saját belső kontrolljaikhoz normalizáltuk (ΔC_t). Ez a kvantitatív technika pontos képet ad a transzgén expressziójának mértékéről. Negatív kontrollként (K), egy nem-transzgenikus alomtársat használtunk. Azt találtuk, hogy 9 transzgenikus vonal közül 1 igen magas (1112), 3 közepes (1092, 1116, 1135) és 2 alacsony (962, 993) szinten expresszálta a transzgént. Két transzgenikus vonalban (981, 935) nem tudtunk transzgén expressziót kimutatni. A transzgenikus állatok szervei közül a legmagasabb expressziót az agyban detektáltuk, kevesebb transzkript volt kimutatható a májból és a szívből.

A jól expresszáló transzgenikus vonal (1112-es vonal) heterozygota egyedeinek keresztezése révén homozygota transzgenikus vonalat alakítottunk ki. A homozygota egyedeket az utódok DNS-én PCR módszerrel végzett genotípus-meghatározás révén szelektáltuk ki. Mivel transzgenikus állatainkban a mutáns gén mellett az endogén, vad-típusú gén is jelen van, ezért a mutáns fenotípust CaMKII knockout háttéren szeretnénk tovább vizsgálni. Erre Dr. Ype Elgersma, Erasmus University, Hollandia kutatócsoportjával folyó együttműködés teremthet lehetőséget. Az ezzel kapcsolatos munkák egyeztetése jelenleg folyik.

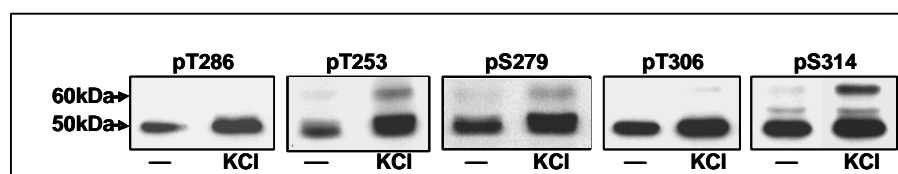
Ser279 foszforilációs-hely specifikus antitest (pS279) előállítás.

A molekuláris munkákkal párhuzamosan elindítottuk a foszfo-Ser279 specifikus ellenanyag előállítását is. Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy az antitestünk nagy szelektivitással ismeri fel az immunizáláshoz használt poszforilált peptidet, a foszforilálatlan peptidet azonban csak nagyon alacsony hígítás mellett képes azonosítani. Megvizsgáltuk, hogy az antitest felismeri-e az agyi CaMKII. Ehhez szinaptoszómákat preparáltunk, melyeket 40 mM KCl oldatban depolarizáltuk. Méréseink igen biztatóak, hiszen az 50 kDa-nál, ahol a CaMKII alfa alegysége található, az antitest felismert egy foszfoproteint. Ez a fehérje nem festődött azon szinaptoszómákban melyek nem voltak depolarizálva. Jelenleg folyik az antitest tisztítása, és a mutáns enzim használatával annak további karakterizálása.

Az izolált szinaptoszómákon végzett biztató előkísérletek után, külföldi partnerekkel (Professzor John Rostas, University of Newcastle, Australia és

Professzor Jim Gurd, University of Toronto, Canada) elindítottunk egy programot, melynek során több foszforilációs hely specifikus új ellenanyag került tesztelésre. Mint az az 1-es ábrán látható, a pályázat szempontjából kiemelt szereppel bíró pS279 képes volt azonosítani a depolarizáció hatására bekövetkező megnövekedett CaMKII foszforilációt hippokampális szeletekben, mely az első bizonyítéka annak, hogy e hely foszforilációja valóban szerepet játszhat fiziológiás folyamatokban.

Komoly nehézségekbe ütköztünk azonban a foszforilációs hely specifikus ellenanyag tesztelése során. Bár a termelt ellenanyag hatásosan felismeri a Ser279 foszforilációjában bekövetkezett változásokat, az ellenanyag sokszori tisztítás ellenére is számos nem a CaMKII fehérjéhez tartozó sávot azonosít az immunoblottokon. Ez természetesen azt jelenti, hogy az ellenanyagot jelenlegi formájában hatékonyan használni nem tudjuk. Hasonló problémába ütköztünk Professor John Rostas-sal (Newcastle, Australia) folytatott együttműködésünk során is. Az Ausztrál csoporttal közösen termelt ellenanyaggal is hasonló tapasztalatokat szereztünk. Jelenleg is dolgozunk azon, hogy ezt a problémát hogyan tudnánk megoldani, hiszen egy specifikus ellenanyag segítségével sejteken és szöveteken belüli változásokat is tudnánk detektálni, mely elengedhetetlen lesz a S279 funkciójának pontos megértéséhez.



1.ábra. A CaMKII két fő alegységének foszforilációja depolarizációt követően hipokampális szeletekben. A foszforilációs hely specifikus ellenanyagok a CaMKII alfa (50 kDa) és béta (60 kDa) alegységeinek megnövekedett foszforilációját mutatják 5 perces 40 mM KCl expozíciója után.

Cink koncentrációjának meghatározása körüli problémák és azok megoldása

Természetes a kérdés hogy hogyan, milyen időbeli megoszlásban változik a cink koncentrációja pre és posztszinaptikusan és ennek a változásnak milyen hatása lehet különböző fehérjék foszforilációjára illetve az endo- és exocitózis folyamataira. Számos kísérletet végeztünk ezen kérdések tisztázására. Az eredmények azonban nagyon változóak voltak. Ennek okát vizsgálva derült fény arra, hogy a deionizált laboratóriumi víz szabad cink koncentrációja nagyon változó, 1 és 100 nM között ingadozik. Figyelembe véve, hogy a szabad cink extracelluláris koncentrációja a 10 nM körüli koncentráció tartományban található, ez a változékonyság komolyan befolyásolja eredményeinket. Ezen probléma megoldására nem csak nekünk volt szükségünk, éppen ezért külföldi partnerünk Professor Christopher Frederickson és csoportja kifejlesztett egy nagy érzékenységű cink-specifikus spektroszkópai módszert mely az általuk kifejlesztett cink-specifikus fluoreszcencens szenzoron alapszik. Bár a hardware és a szoftware és a szükséges kemikáliák már birtokunkban vannak, ezek 2005 novemberére lettek csak készen, így a pályázat időtartama alatt újabb kísérletek lebonyolítására már nem volt lehetőség. Külföldi kollaborációs partnereink segítségével azonban jelenleg folynak előkészületi egyeztetések a cink pre- és poszt-szinaptikus változásainak, illetve a cink endo- és exocitózisra gyakorolt hatásainak mérésére, melyekhez mostmár pontosan be fogjuk tudni állítani a cink koncentrációját.

A finanszírozási feltételek fokozatos romlása mellett további nehézséget okozott a kétdimenziós elektroforézis rendszer beszerzésének elvesztése is. Ennek ellenére elkészítettük a kétdimenziós foszfopeptid térképeket kortikális és moha rostokból izolált idegvégződéseken londoni kollaborációs partnereink segítségével. Kiváló reprodukálhatóságot kaptunk azon kísérleteinkben amelyekben a depolarizáció hatását vizsgáltuk a két fajta szinaptoszómákban. Számos peptid foszforilációján változott kálium indukálta depolarizáció után. Komoly nehézség azonban, hogy, bár számos peptid foszforilációja jelentősen megváltozott, a peptidek koncentrációja nagyon alacsonynak bizonyult, ezért szekvencia analízisre ezek nem voltak elegendőek. Későbbiekben reméljük, hogy ezekre és a cink hatását vizsgáló kísérletekre újra sort keríthetünk. Ezen kísérletekben meg fogjuk növelni a használt szinaptoszómák mennyiségét, hogy szekvenálásra alkalmas mennyiségű peptideket nyerhessünk.

2) Cink szerepe neurodegenerative folyamatokban.

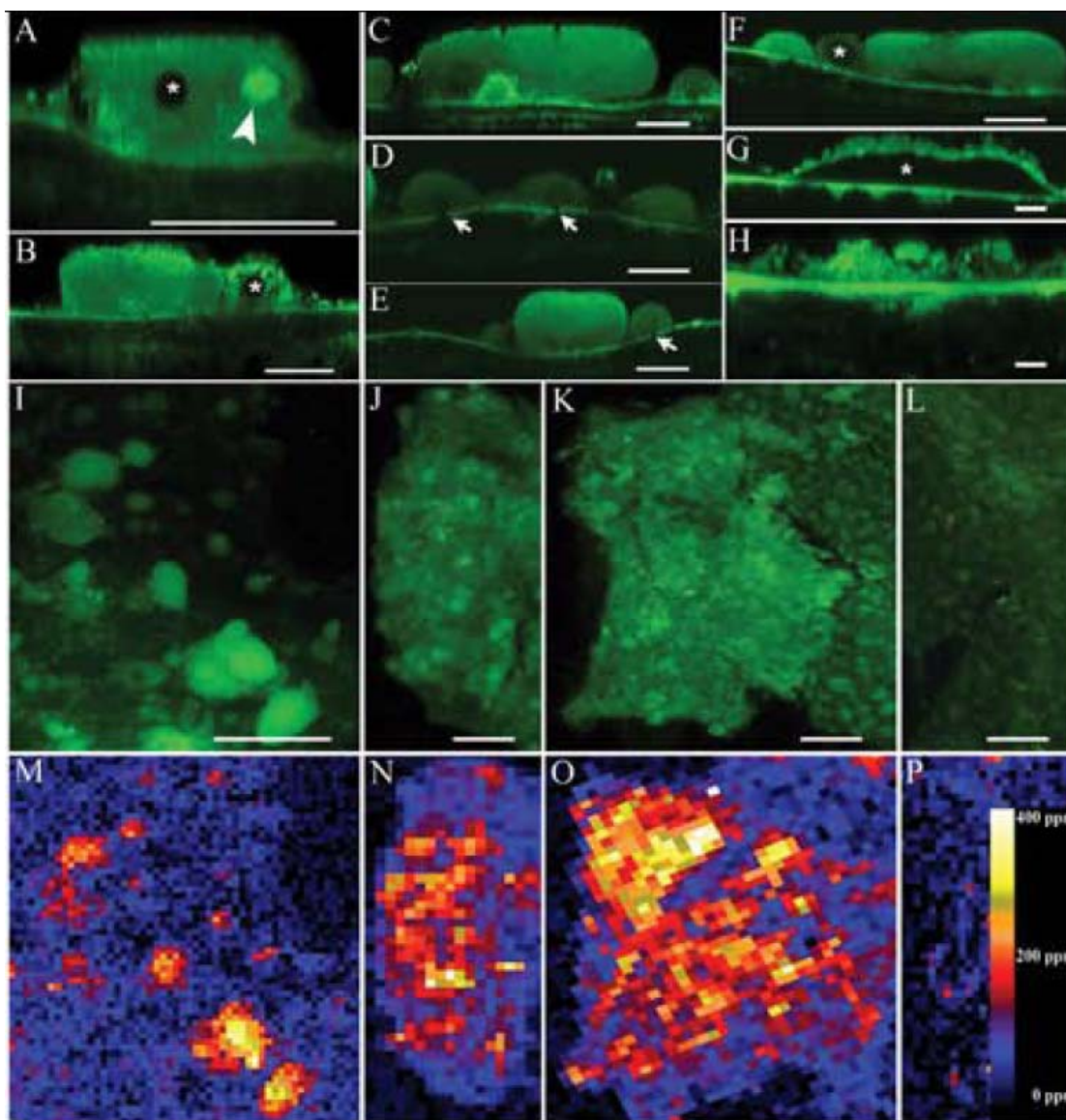
A szabad cink szerepének megértéséhez szükséges, hogy annak funkcióját több oldalról is megvizsgáljuk. Ma már tudott, hogy nem csak normál, de patológiás folyamatokban is igen fontos szerepe van a megnövekedett szabad cink koncentrációnak. Cink szerepet játszik például az Alzheimer kór kialakulásában is. Klinikai vizsgálatok bizonyítják, hogy cink elvonása ionofórokkal lassítja az Alzheimer kór előrehaladtát. Laboratórium körülmények között végzett vizsgálatok alapján ennek oka, hogy a cink elvonásával az agyban kialakult plakkok eltűnnek. Azonosították is a cink kotéséért felelős aminosavakat az Ab(1-42) peptiden. Ez az a peptid melynek precipitációja a plakkok kialakulását okozza. Ma már az is ismert, hogy a hippocampális szeletekben indukálható LTP-t is befolyásolják az Ab peptidek. Ennek pontos mechanizmusa még nem ismert. Azt pedig, hogy egy cink-amiloid komplex milyen jelátviteli folyamatokat befolyásol még kevésbé volt vizsgálva. Éppen ezért feladatul tűztük ki, hogy további információkat szerezzünk ezen komplex és a különböző Ab fragmensek hatásairól. Vizsgálataink igen izgalmas részeredményeket hoztak melyeket 3 a pályázat időtartama alatt megjelen cikkben közzeltünk és több konferencián is ismertettünk. Röviden összefoglalva azt tapasztaltuk, hogy a cink-amiloid komplex sokkal potensebb biológiai aktivitással bír mint az Ab peptid önmagában. Cirkuláris dikroizmus és transzmissziós elektronmikroszkópai módszerekkel részletesen meghatároztuk az aggregátumok szerkezetét. Továbbá, vizsgálatainkból úgy tűnik, hogy a cink hatásért egy korábban még nem azonosított cink-kötő hely felelős. Előzetes NMR eredmények alapján, a cink kotése az Ab(25-35) szekvencián belül egy glicin aminosavon keresztül valósul meg, de ennek pontos feltérképezése még nem történt meg. Szintetikus peptidek segítségével azt is vizsgáltuk, hogyan lehet az Ab indukálta hatásokat befolyásolni. Mivel ezeket a hatásokat G-fehérjék aktivációján keresztül mértük, így feltételezzük, hogy más jelátviteli rendszerekre is hatással lesznek ezek a komplexek, de ezek tesztelése a jövő feladata.

Az amyloid peptidek és a cink kölcsönhatásának egy igen érdekes helye a retina. Úgy tűnik, hogy a cink-indukálta Ab aggregációnak szerepe van az idős kori makula degenerációban, egy vaksághoz vezető, az életkor emelkedésével egyre relevánsabb neuronális degenerációnak. Éppen ezért a University College London, Institute of

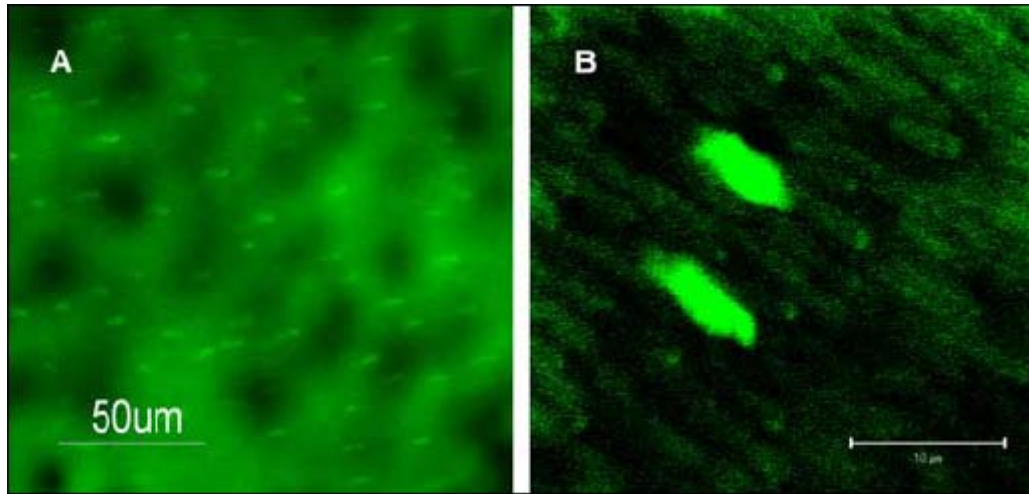
Ophthalmology-val kollaborációban elindítottunk egy programot, melyben a cink szerepét ebben a betegségben vizsgáljuk. A retinában lerakódó plakkokról már közöltünk is egy nagy lélegzetvételű cikket az Investigative Ophthalmology and Visual Sciences-ben. Jelenleg van elfogadás alatt ugyan ebben az újságban egy kéziratunk melyben a szabad és teljes cink koncentrációját, valamint a szabad cink plakkokon belüli lokalizációját írjuk le. A 2. ábra ennek a munkának eredményét foglalja össze.

Vizsgáljuk azt is, hogy a retina mely részein található mobilizálható cink, mely szerepet játszhat mind normál, mind degeneratív folyamatokban. Jelenleg dolgozunk egy kézira-ton, melyben a cink és fotoreceptorok kapcsolatát írjuk le. Röviden összefoglalva arra a következtetésre jutottunk, hogy a fotoreceptor külső szegmenseknek csak egy része tartalmaz cinket. Ezek száma és retinán belüli elhelyezkedése alapján feltehető hogy csak rövid hullámhosszakra érzékeny csap fotoreceptor külső szegmensek tartalmaznak cinket (3. ábra).

Mivel a retina a hipocampus-hoz hasonlóan jól struktúrált, annak vizsgálata igen sok segítséget nyújthat a neurodegenerációs folyamatok megértéséhez az agyban is. Az pedig, hogy a retinában zajló folyamatok könnyen láthatóvá tehetőek tovább emeli a retinális munkák értékét. Munkánk szempontjából az is lényeges, hogy a retina, ahol magas koncentrációban van jelen szabad cink és CaMKII is, ezek kölcsönhatásának vizsgálata talán még alkalmasabb is lehet, mint a hipocampus. Éppen ezért a S279A mutáns egerek vizsgálata során különös figyelmet kívánunk szentelni a retinának, illetve a retinában zajló folyamatoknak.



2 ábra. Cink megoszlása druzenben és a Bruch membránban. Heterogén ZP1 jelölődés emberi retinában optikai szeletelését követően. (A-G) jól definiált plakkok belső ZP1 eloszlása a periférián és (G,H) makulában. (A, B) Csillaggal olyan belső druzen struktúrákat jelöltünk melyeket ZP1 nem jelölt, míg nyíllal az erőteljesen jelölődő sferulákat jelöltünk. (C) Erőteljes ZP1 jelölődés a druzen alapjánál. (D, E) A druzen magjában alacsony ZP1 jelölődése rendszerint a Bruch membrán jelölődésének szakadácsával asszociálódik (nyilak). (F) Csillaggal olyan belső druzen struktúrákat jelöltünk melyeket ZP1 nem jelölt. (G-H) A Bruch membrán a makula területén erőteljes ZP1 jelölődést mutatott. Ey a jelölődés kiterjedt a kapillarisok közötti területre is. A ZP1 jelölődés a periférián (I) és a makulában (J és K) ayonosnak mutatkozik a teljes cink felhalmozódással (M, N és O). A teljes cink koncentrációt a microprobe synchrotron X-ray fluorescence (μ SXRF) módszerrel határoztunk meg. Mind a ZP1 jelölés (L) és μ SXRF analízis (P) alacsonz cink szintet mutatott a kontrol makula mintában. (Scale bars: A-H, 20 μ m; I-L, 100 μ m).



3. ábra. (A) Cink specifikus fluorescens fotoreceptor külső szegmens jelölődés. ZP1 a külső szegmensek mindössze 0,5 %-át jelölte. (B) Konfokális mikroszkóppal készített nagyított kép egyértelműen csap jelölődésre utal.