

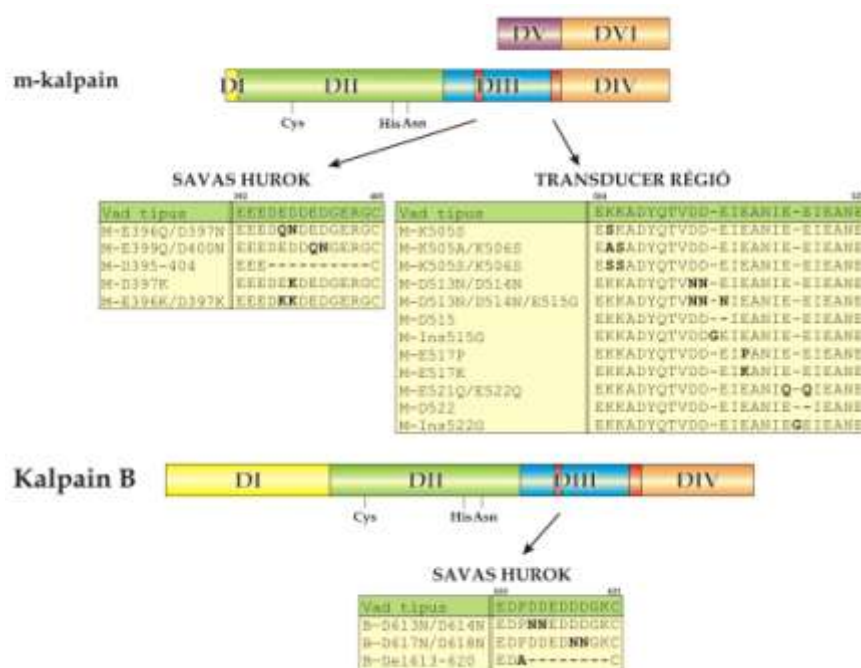
Részletes zárójelentés

A kalpain Ca^{2+} -indukált aktiválását kísérő intramolekuláris szerkezetváltozások, helyre irányított mutagenézis vizsgálatok alapján

Nem ismert olyan röntgenszerkezet, melyben egy teljes hosszúságú kalpaint kalcium ionok jelenlétében kristályosították, így nem tisztázott, hogy milyen molekuláris átrendeződések zajlanak le az enzim aktiválódása során.

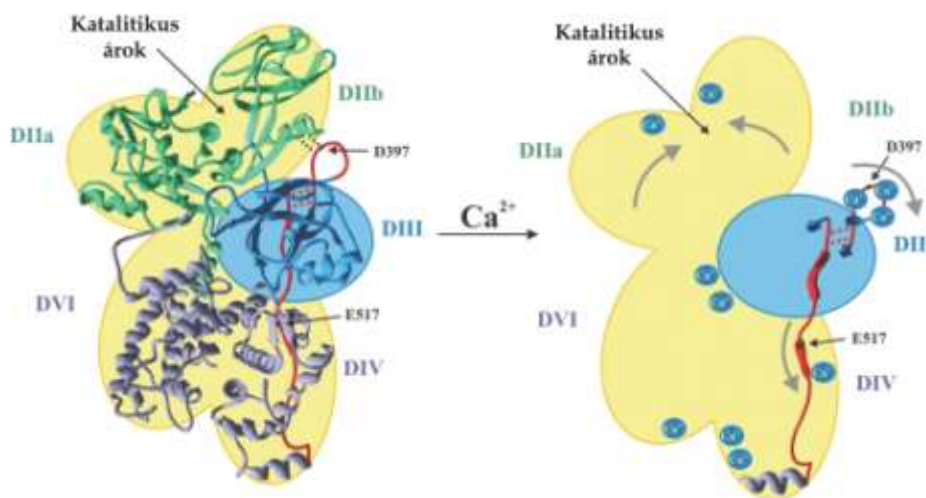
Az inaktív kalpain proenzimben a katalitikus aminosavak egymástól távol helyezkednek el, így a II-es domén egy kifizített konformációban rögzül. Ezt a nyitott állapotot többek között a III-as doménben található savas aminosavakban gazdag hurok régió sóhidakon keresztül stabilizálja. Az a tény, hogy a fő, kalcium kötésért felelős domének a molekula ellentétes oldalán helyezkednek el, a katalitikus centrumhoz képest, azt valószínűsíti, hogy a kalcium-ion által okozott kis konformációs változásnak a molekula egészén végig kell terjednie. Az egyik ilyen lehetséges útvonal a III-as és IV-es domént összekötő ún. transzducer szekvencia, ami egy 20 aminosavból álló nyújtott konformációjú peptidlánc.

A kalpain szerkezet egyes elemeinek, így a savas huroknak és a transzducer régióknak, az aktiválódásban betöltött szerepét irányított mutagenézis technika segítségével vizsgáltuk (1. ábra), megfigyelve az enzim és a mutánsok aktiválódásának különbségeit. Általánosságban elmondható, hogy azok a mutációk, melyek az aktiválódás során megszűnő kölcsönhatásokat érintenek, csökkentik, míg azok melyek lényeges és az aktiválódás során megmaradó kölcsönhatásokat rombolnak le, növelik az aktiválódás kalcium-ion igényét.



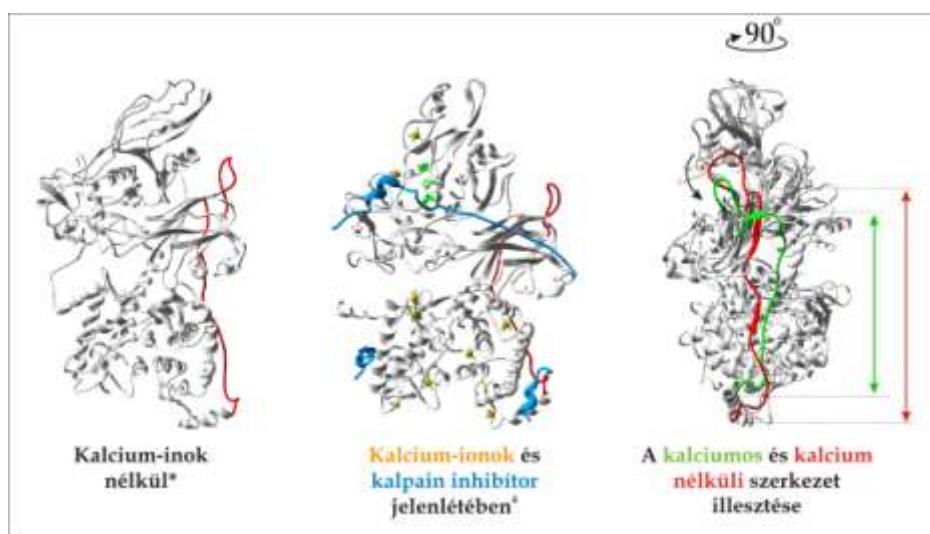
1. ábra: A patkány m-kalpainon és Drosophila kalpain B-n kialakított mutációs pontok

Az irányított mutagenezissel módosított kalpainokat rekombináns módszerrel kifejeztették, majd az egyes enzimek aktivitásának kalciumfüggését összevetették. Ezen kísérletek alapján egy modellt állítottunk fel, melynek lényege, hogy a savas hurok régió és a transducer lánc, noha nem egy szerkezeti egység, de funkcionálisan egy olyan egységet alkot, ami közvetíteni képes a kalcium kötő doménekben a kalcium ionok megkötése során bekövetkező kis konformációs változást a katalitikus centrum felé. Egyfajta aktiválódási kapcsolóként (savas hurok régió) és erősítőként (transducer lánc) is szolgál, mely nem csak közvetíti a jelet, hanem fel is erősíti azt. Ezt a modellt „extended transducer”-nek, azaz egy kiterjesztett erőátviteli egységnek neveztük el (2. ábra).



2. ábra: A kalpain aktiválódás sematikus modellje, a Ca^{2+} -ionok hatására bekövetkező domén mozgások

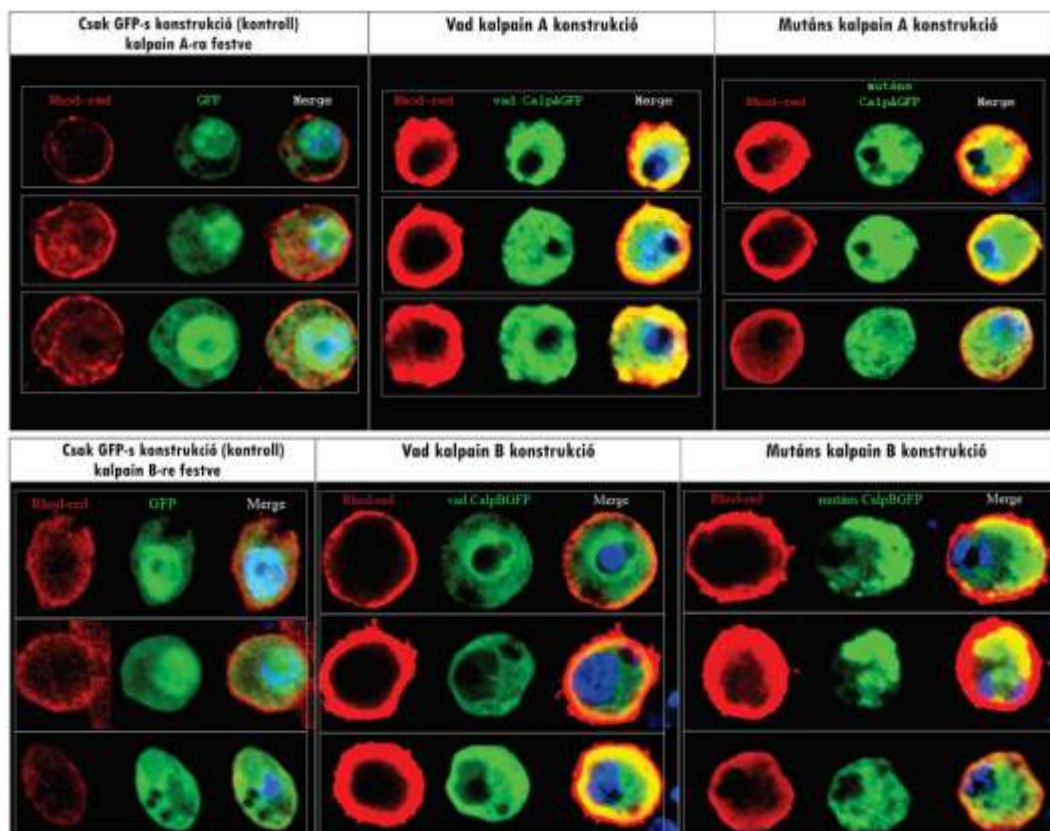
A felállított modell jó egyezést mutat a múlt novemberben publikált kalcium-ionokat és kalpasztatint, a kalpain endogén inhibitorát, tartalmazó kalpain röntgenszerkezettel (3. ábra).



3. ábra: A kalpain kalciummentes (1kfu) és kalciumos (3df0) szerkezete. A piros szakaszok a savas hurok régiót és a transducer szakaszt jelzik.

A kalpain A és kalpain B sejten belüli irányításának kérdése (targeting)

A citoplazmatikus szabályozó enzimek funkciójuk kifejtéséhez elengedhetetlenül fontos egy pontos lokalizációs (kompartmentalizációs) mechanizmus. A kalpainok esetében is felmerül a kérdés, vannak-e a kalpainok szerkezetében a feladatra alkalmas elemek? Vizsgálataink során a kalpain A és kalpain B két lehetséges régiójának szerepét vizsgáltuk. A kalpain A III-as és IV-es doménje között, más kalpainokban nem található, 76 aminosav hosszúságú szakasz fordul elő, melynek elvégeztük rendezetlenségi jóslását. A szakasz közepén egy hidrofób jellegű rendezett, két szélén inkább rendezetlenségre hajlamos régiók vannak, mely igen hasonlít egy fehérjehorgonyzó régió szerkezetére. A kalpain B jellegzetessége, az igen hosszú N-terminális domén, mely nagyrészt rendezetlen szerkezetű (IUP). Lokalizációs vizsgálataink során a kalpain A hidrofób szakaszának és a kalpain B N-terminálisának szerepét vizsgáltuk, ezért mind a vad típusokból, mind a kérdéses szekvenciák deléciós mutánsaiból elkészítettünk egy GFP-hez fűzionált DNS konstrukciót, majd *Drosophila* Schneider S2 sejtekben kifejeztetve vizsgáltuk a fehérjelokalizációban bekövetkező különbségeket. Azt találtuk, hogy a két régió molekulából való eltüntetése nem okoz lényeges változást az enzim lokalizációjában a vad típushoz képest. E két peptidszakasz szerepét tehát másfelé kell keresnünk.



Kalpainok gátlásának ill. aktiválásának hatása idegrendszeri folyamatokra

A kalpainok specifikus endogén gátló fehérjéje a kalpasztatin. Gátló doménjei A, B és C szubdoménre bonthatók, amelyek közül az A és a C felelős a kötődésért, a B pedig a gátlásért. A kalpasztatin A és C szubdoménjeinek 19 aminosav hosszúságú szakaszai (aktivátor pár) aktiválják a kalpainokat *in vitro*.

Az aktivátor pár sejtpermeábilissá tételéhez oligo-arginin taget kapcsoltunk hozzájuk. A peptidek bejutottak COS7 sejtekbe és agyi szövetszeletekbe is, amit konfokális mikroszkópiával ellenőriztünk.

Ezzel lehetőségünk nyílt a kalpainok *in vivo* aktiválására, az intracelluláris kalcium szint megemelése nélkül. Úgy tudunk beavatkozni a kalpain rendszer működésébe, hogy közben nem aktiváljuk a kalcium-függő egyéb jelátviteli pályákat, csak a kalpain hatását vizsgálhatjuk. Ennek alapján felállítottunk egy *ex vivo* kísérleti rendszert. Patkány hippocampusát és a kortikális régiót szeleteljük, majd az aktivátort tartalmazó oldatban inkubáljuk, ezt követően nézzük az alapingerlékenység és az LTP változását.

15 percen át inkubáltuk az agyszeleteket eltérő aktivátor koncentrációjú oldatban. 2,5; 5 és 10 μM koncentrációban jelentős alapingerlékenység növekedést tapasztaltunk a hippocampális szeletekben. A koncentráció további növelése csökkentette az ingerlékenységet, 100 μM koncentrációnál pedig teljesen megszűnt a szeletek válaszreakciója. A kérgi szeletek esetében az aktivátor pár okozta változás nem volt jelentős.

Nagy frekvenciás ingerléssel hosszú távú szinaptikus változás alakulhat ki, LTP, vagy LTD. A hippocampális szeletek esetében az aktivátor pár szignifikáns LTP növekedést generált, az LTP-t a tetanizálás előtti és utáni amplitúdó különbségeként definiáljuk. A szomatoszenzoros kortexnél ebben az esetben is elhanyagolható változást tapasztaltunk, vagyis a kalpain-hatás megjelenése az egyes agyterületeken különböző.

Eredményeinket számos kontroll elvégzésével támasztottuk alá. Rekombináns, tisztított m-kalpainon teszteltük, hogy az oligo-arginin tag nem befolyásolja a peptidek aktiváló hatását. A hippocampális szeletek 2,5 μM aktivátor pár koncentráció mellett 15 perc alatt jelentős alapingerlékenység és LTP növekedést produkáltak. Ha az egyik aktivátor peptid inverz szekvenciáját adtuk a másik aktivátor peptiddel közösen, elmaradt. Ugyancsak elmarad a hatás, ha az aktivátor pár mellett egy specifikus kalpain inhibitor, a PD150606-ot alkalmaztuk.

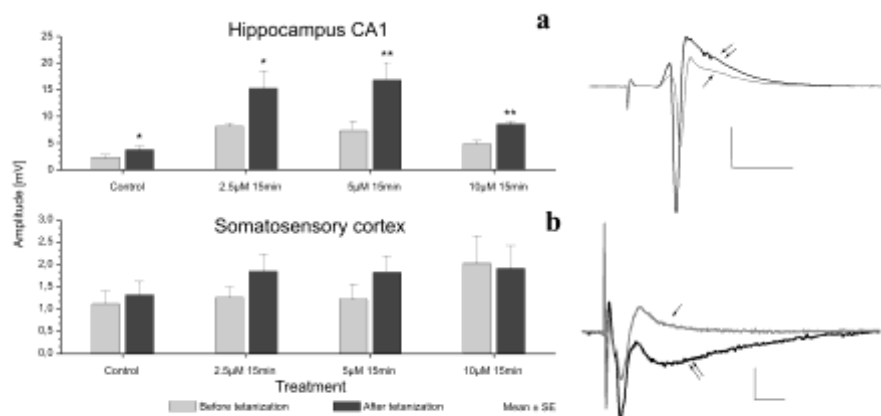
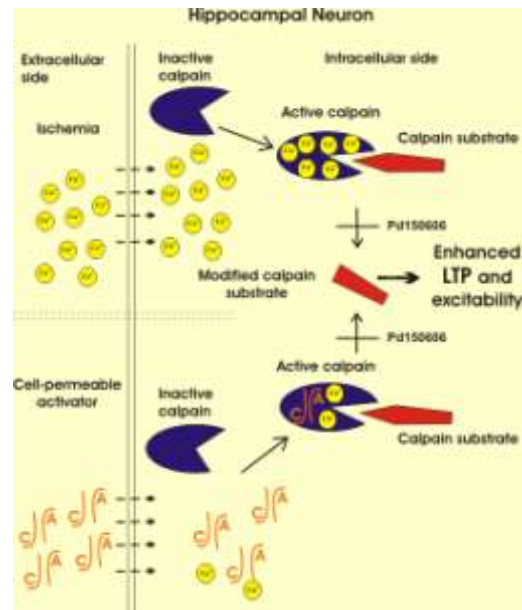
Bizonyítottuk azt is, hogy a sejtekbe jutó kalpain valóban aktiválódik. Korábban szintetizáltunk egy ún. kalpain szuper-szubsztrátot, ez a szubsztrát a kalpain által kedvelt aminosavakat tartalmazza. A szubsztrát két végére fluorófort tettünk, így detektálni tudjuk a kalpain aktiválódását a szubsztrát elhasadása révén. Ezt a molekulát ugyancsak oligo arginin

tag segítségével juttattuk be a sejtekbe, a képen is látható hippokampusz szeletbe. Ha a sejteket a szubsztrát mellett A és C peptiddel is inkubáltuk, a hasítás megtörtént.

Elektronmikroszkópiával megvizsgáltuk okoz-e valamilyen látható változást az aktivátorok bejuttatása. A mérési koncentrációknál semmilyen jelentős változást nem tapasztaltunk, azonban 100 μM koncentrációnál a sejtek integritása szétesett, ultrastruktúrájuk jelentősen sérült. Ez a kalpainok erőteljes aktiválódásának lehet a következménye, ezért ennél a koncentrációnál az idegsejtek nem reagáltak egyik ingerre sem.

Az így kidolgozott rendszer alkalmas a kalpainok kutatásában jelentős hatóanyagok kifejlesztéséhez, a túlélő agyszeletek mellett speciális technikákkal (pl. Alzet-pumpa) élő állat agyi részeiben is jól felhasználható ez a módszer.

4. ábra: A hippokampális LTP kiváltásának két útja. Felső rész: agyi oxigénhiányos állapotban a sérült membránon keresztül kalcium ionok áramlanak az intracelluláris részbe. Ennek hatására aktiválódik a kalpain és elhasítja specifikus szubsztrátjait. A módosított kalpain szubsztrátok LTP-t váltanak ki. Alsó rész: a sejtp permeábilis aktivátor pár átjut az idegsejt membránján, ahol normál kalcium koncentráció mellett aktiválja a kalpainokat. Ettől a ponttól a jelátviteli út megegyezik a felső résznél leírtakkal.

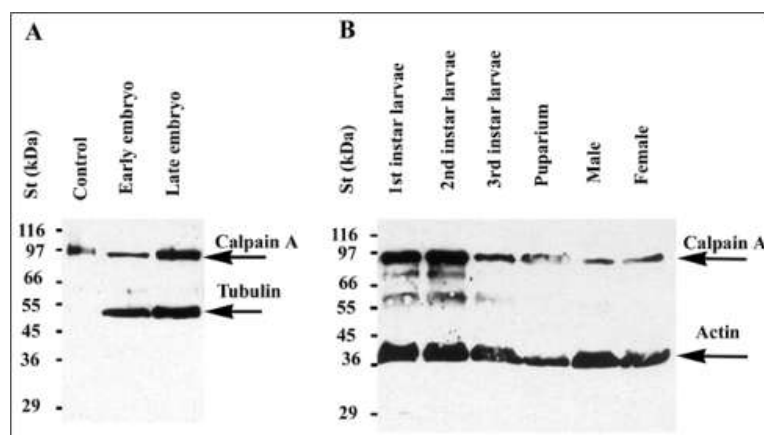


5. ábra: Hosszú távú potenciózás (LTP) kialakulása hippokampális és szomatoszenzoros kérgi területeken. A hippokampális szeletekben 2.5 μM ill. 5 μM aktivátor pár inkubálást követő tetanizálás az LTP szignifikáns növekedését idézte elő (A). Ugyanez a kezelés a szomatoszenzoros kortexben csak kis mértékű változást idézett elő (B). Az aktivátor koncentráció további emelése nem növelte a jel nagyságát, 100 μM koncentráció esetén pedig a jelentős kalpain túlaktiváció hatására a szeletek válaszadó képessége teljesen megszűnt

Kalpain A gén *in vivo* funkciójának vizsgálata

Vizsgálataink kezdetén a *Kalpain A* génre még nem voltak ismert mutánsok, ezért célul tűztük ki új *Kalpain A* funkcióvesztéses mutánsok előállítását. Erre a célra a *Kalpain A* gén közelében található P elem inszerciós törzseket próbáltuk felhasználni. Három különböző helyzetű P elemet (5SZ-3979, 5SZ-3179 és KG5080) remobilizáltunk a delta2-3 transzpozáz forrás segítségével. Ezekben a kísérletekben több mint ezer egyedi P-elem ugrasztást hajtottunk végre, és a P elem elvesztését a fehér szemszín megjelenése alapján azonosítottuk. P-elem mentes vonalakból törzseket hoztunk létre, amelyekben PCR segítségével vizsgáltuk, hogy keletkezett-e olyan mutáció, amelyik a *Kalpain A* gént érinti. Kísérletek eredményeként két ilyen mutációt sikerült azonosítani. Ezek közül a KG5080/634-ben egy 1kb hosszú deléció a *Kalpain A* gén első intronját távolította el. Ez a mutáció homozigóta életképesnek bizonyult, és Western-blott segítségével kimutattuk, hogy a *Kalpain A* géntermék mennyisége némileg csökkent. A másik mutáció, KG5080/808 szintén homozigóta életképes, de nőtény steril fenotípust mutat. Ezekben Western-blott analízissel *Kalpain A* génterméket nem lehetett kimutatni, ezért ezt a mutációt null mutánsnak lehet tekinteni. A hozzávetőlegesen 1kb hosszú deléció az első át nem íródó exont távolítja el. Ennek a mutációnak a nőtény steril fenotípusa nem a *Kalpain A* gén hiányának tulajdonítható. Ezt mutatja, hogy a KG5080/808 mutáció a *Df(ED3716)* delécióval transzheterozigóta állapotban nem csak életképes de fertilis is és egyúttal nem tartalmaz *Kalpain A* génterméket. Az *Df(ED3716)* ugyanis egy olyan deléció amely teljesen eltávolítja a *Kalpain A* gént.

A *Kalpain A* fehérjével szemben ellenanyagot állítottunk elő, amellyel megvizsgáltuk a *Kalpain A* fehérje kifejeződését az egyedfejlődés során, illetve néztük az intracelluláris eloszlását a különböző szövetekben. A *Kalpain A* fehérje az egyedfejlődés minden stádiumában jelen van, kifejeződési szintje állandó (6. ábra).



6. ábra: A *Kalpain A* fehérje egyedfejlődési mintázata

Az anti-Kalpain A ellenanyaggal különböző lárvális szövetekben, tesztiszben és ováriumban néztük a fehérje sejten belüli eloszlását. Minden vizsgált szövetben a Kalpain A elsősorban a sejtmembránok mentén volt kimutatható, amiből arra lehet következtetni, hogy a Kalpain A fehérje szorosan kapcsolódik a subkortikális aktin sejtvázhoz.

Kalpain B gén *in vivo* funkciójának vizsgálata

Kalpain B génre a *Kalpain A*-hoz hasonló stratégiát alkalmaztunk. A *Kalpain B* gén transzkripció start helyének közelében található *EY8042* homozigóta életképes P elem inszerciót remobilizáltuk transzpozáz forrás segítségével. Több mint 300 egyedi P elemet ugrasztottunk és a szemszín elvesztése alapján szelektáltunk az egyedi törzsekre. A törzseket a megfelelően megválasztott primerek segítségével PCR reakcióval vizsgáltuk. A törzsek között 5 homozigóta életképes és fertilis, csak a *Kalpain B* gént érintő törzset tudtunk azonosítani. Ezekben a törzsekben RT-PCR-el és Western-blottal nem tudtunk génterméket kimutatni. Az enzimaktivitás mérések is arra utalnak, hogy ezek valóban *Kalpain B* mutánsok (7. ábra). A kísérletek eredményei egyértelműen mutatják, hogy a *Kalpain B* gén nem esszenciális az életképesség és a termékenység szempontjából. Előzetes eredményeink azonban arra utalnak, hogy a *Kalpain B* gén a petekamrák határsejtjeinek vándorlásában játszik szerepet.

A *Kalpain B* null mutánsok és a *Kalpain A* hiányos transzheterozigóta kombinációjával a *Kalpain A* és *Kalpain B* kettős mutánst is előállítottuk. Mindkét géntermék hiányában életképes és fertilis utódokat kaptunk, ami azt jelzi, hogy egyik gén sem szükséges együtt, sem az életképességhez.

	<u>Aktivitás</u>	%
w1118	6.4	100%
EY08042hom	6.1	95%
CalpB502hom	3.2	50%
CalpB505hom	3.2	50%

7. ábra: A *Kalpain B* mutánsok enzimaktivitás mérési eredménye

Irodalomjegyzék

1. Világi I, Kiss DS, Farkas A, Borbély S, Tárnok K, Halasy K, Bánóczi Z, Hudecz F and Friedrich P (2008)
Synthetic calpain activator boosts neuronal excitability without extra Ca²⁺.
Mol Cell Neurosci 38, 629-36
2. Bozoky Z, Alexa A, Dancsok J, Gogl G, Klement E, Medzihradzky KF and Friedrich P (2008)
Identifying calpain substrates in intact S2 cells of Drosophila.
Arch Biochem Biophys notSet,
3. Friedrich P and Bozóky Z (2005)
Digestive versus regulatory proteases: on calpain action in vivo.
Biol Chem 386, 609-12
4. Bozóky Z, Alexa A, Tompa P and Friedrich P (2005)
Multiple interactions of the 'transducer' govern its function in calpain activation by Ca²⁺
Biochem J 388, 741-4
5. Alexa A, Bozóky Z, Farkas A, Tompa P and Friedrich P (2004)
Contribution of distinct structural elements to activation of calpain by Ca²⁺ ions.
J Biol Chem 279, 20118-26