

**A KALCIUM/CALMODULIN-FÜGGŐ PROTEIN KINÁZ
II FOSZFORILÁCIÓJA AZ AGYI MIKROEREK
ENDOTÉL SEJTJEIBEN: NÁTRIUMFLUORID ÉS
SZINTETIKUS PEPTIDEK HATÁSA**

Doktori értekezés

Írta:

Lengyel Imre



**M.T.A. Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézet
Molekuláris Neurobiológiai Csoport
Szeged
1990**

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
1.BEVEZETÉS	4
2.IRODALMI BEVEZETÉS	7
3.CÉLKITŰZÉSEK	18
4.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	
4.1.Mikrokapillárisok tisztítása	23
4.2.Foszforiláció vizsgálata	25
4.3.Defoszforiláció vizsgálata	26
4.4.A peptidek szintézise	27
4.5.Poliakrilamid gél elektroforézis	27
4.6.Autoradiogramok kiértékelése	28
4.7.Anyagok	28
5.EREDMÉNYEK	
5.1.A PK-C szubsztrátjai	29
5.2.cGMP-függő protein foszforiláció	28
5.3.cAMP-függő foszforiláció	29
5.4.A Cam-függő protein kináz kinetikai vizsgálata	30
5.5.NaF hatása a CAMK foszforilációjára	31
5.6.A szintetikus peptidek tervezése	32
5.7.A szintetikus peptidek hatása a tisztított CAMK foszforilációjára	33
5.8. A peptidek hatása az endogén kináz foszforilációjára	36
6.KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE	39
7.ÖSSZEFOGLALÁS	53
8.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	56
IRODALOMJEGYZÉK	58

RÖVIDÍTÉSEK

SM: másodlagos hírvivő (second messenger)

PK: protein kináz

CAMK: kalcium/calmodulin-függő protein kináz II

Cam: calmodulin

Ca²⁺/Cam: kalcium/calmodulin komplex

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

Ca²⁺/PL:kalcium/fosfolipid

PK-C: protein kináz C

MAP-2: mikrotubulus-asszociált protein

Tris: Tris(hidroximetil)aminometán

MES: 2-(N-morfolino)etenilszulfonsav

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

EGTA: etilén-bis(oxietilénitril)-tetraecetsav

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

BIS: N,N'-metilén-bisz-akrilamid

PMSF: fenil-metil-szulfonil fluorid

cAMPPK: cAMP-függő protein kináz

M_r: relatív molekulatömeg

kDa: kilodalton

DARPP-32: dopamin és cAMP-regulált foszoprotein

AA: amino sav (amino acid)

1.BEVEZETÉS

A központi idegrendszer számára a vér-agy gát a szervezet többi folyadékterétől elkülönített környezetet biztosít, amelynek kialakításában és fenntartásában az agyi kapillárisok endothel sejtjei alapvető szerepet játszanak. Morfológiai és biokémiai vizsgálatok ugyanis azt igazolták, hogy ezek a sejtek aktívan résztvesznek a transzportfolyamatban, és rendelkeznek a szelektív transzporthoz szükséges érzékelő mechanizmusokkal, amelyeknek a másodlagos hírvivőkhöz (SM) kapcsolódó protein kinázok (PK) a fő kulcsenzimek (1).

Az SM-ek által szabályozott protein-foszforilációnak meghatározó szerepe van az idegrendszer működésében (2,3). Mindazonáltal számos, főként a regulációs folyamatok mikéntjét érintő kérdés mind a mai napig válasszra vár. Mivel a patkány-agy kapillárisainak izolálása révén kiváló kísérleti anyag áll rendelkezésünkre (4), olyan modellrendszert kerestünk, melynek segítségével tanulmányozhattuk a különböző SM-ek által befolyásolt protein-foszforilációs folyamatokat.

Ezen folyamatok egyik kulcsenzime a Ca^{2+} /calmodulinfüggő protein kináz II (CAMK). A CAMK-val már igen sokan foglalkoztak, sokféle szempontból jellemezték. Kimutatták, hogy az agyfehérjék mintegy 1%-át CAMK alkotja és működését tekintve szokatlanul széles szubsztrát körrel rendelkező kináz. Mediálja a Ca^{2+} néhány hatását a neuronban, többek között a transzmitter szintézist és felszabadulást, ideálisan lokalizálódva a Ca^{2+} posztszinaptikus hatásának közvetítéséhez. Részletes vizsgálatok bizonyítják, hogy a CAMK Ca^{2+} ionok és calmodulin (Cam) jelenlétében gyors autofoszforiláción esik át. Ennek következtében az enzim aktivitása és szubsztrátspecifitása jellemző változást mutat. Számos szubsztrátja ismert, mint például a synapsin I és a myosin könnyű lánc kináz, vagy a MAP-2.

Tekintélyes mennyiségű információ gyűlt össze az enzim molekuláris szerkezetéről, autofoszforilációjának és exogén szubsztrátjainak foszforilációs kinetikájáról illetve regulációjáról. Egységes, valamennyi ismert funkcionális megnyilvánulást koherensen összefogó modell mind a mai napig nem áll

rendelkezésünkre. Nem világos az autofoszforiláció és a Ca^{2+} /Cam-független, úgynevezett autonóm, enzimaktivitás kialakulása közötti kapcsolat molekuláris háttere. Az sem tisztázott, hogy a kettő között kauzális kapcsolat van-e, vagy két független jelenséggel állunk-e szemben? Tisztázatlan az enzim működésének sokak által leírt kooperatív jellege, a holoenzimet alkotó két (α és β típusú) alegység funkciójának az enzimaktivitás szabályozásában betöltött szerepe.

A halmozódó ismeretek ellenére sincs tehát kialakult általánosan elfogadott elmélet a CAMK működési mechanizmusára. Egy ilyen elmélet lehetővé tenné többek között a CAMK szubsztrátjainak felderítését. A már ismertek a sejtanyagcsere számos kulcsfontosságú csomópontján fejtenek ki szignálfüggő szabályozó funkciót, így ez felveti egy széles hatókörű szabályozási út átfogó értelmezésének lehetőségét.

További távlatokat ígérnek azok az egyre szaporodó adatok, amelyek a CAMK működése és a memória biokémiai háttere közötti összefüggésekre utalnak (9). Pillanatnyilag úgy tűnik, hogy a CAMK egy olyan kaszkárendszer központi eleme, amely változtatni képes -a mindenkori aktivitási szintnek megfelelően- a szinaptikus átvitel lokális jellemzőit, azaz a szinaptikus plaszticitás egyik tényezője. Ha meggondoljuk, hogy ez az enzim a rendelkezésre álló adatok szerint valamennyi vizsgálat alá vett szövet sejtjeiben megtalálható (6,10-17), valóban arra következtethetünk, hogy a CAMK a dinamikus, sejtszintű adaptáció új dimenzióját nyitja meg a jövő kutatómunkája előtt.

2. IRODALMI BEVEZETÉS

Az agyi mikrokapillárisok, a központi idegrendszer aktuális funkciója szerint, szelektív transzportfolyamataik révén biztosítják az agyszövet táplálékigényét. A kapillárisokon keresztüli makromolekuláris transzport növelhető például a ciklikus nukleotidok dibutiril-származékaival (23,24). Az így felvett proteinek kapcsolatban vannak a SM-rendszerrel, abból kiindulva, hogy emelkedik az endothel sejteken belüli SM-ek koncentrációja. A megnövekedett proteintranszport oka ugyanakkor ismeretlen maradt. A hormonokra és egyéb vazoaktív ágensekre érzékeny adenilátcikláz (25-34), a Ca^{2+} -érzékeny guanilát-cikláz (18,33), és a Mg^{2+} -aktivált ciklikusnukleotid-foszfodiészteráz (35,36) jelenléte az endothel sejtjeiben már korábban ismert volt, így mi is azt vártuk, hogy más vaszkuláris szövetekhez hasonlóan (37), az agyi kapillárisokban szintén jelen vannak a SM-ek által aktivált kinázok és azok proteinszubsztrátjai.

Az agyi kapillárisokban végbemenő transzendotheliális transzport molekuláris hátterének vizsgálata lehetővé teszi a szabályozó rendszerek feltérképezését. A proteinek foszforilációjában a másodlagos hírvivők hatására létrehozott változások detektálása ebből a szempontból kedvező kísérleti megközelítésnek bizonyult (1).

Annak lehetőségét, hogy SM-ek által befolyásolt fehérje foszforiláció történik az agyi mikrokapillárisokban, már PARDRIDGE és mtsai is felvetették (38). Ugyanakkor azonban megghiúsultak azok a próbálkozások, amelyekkel megpróbálták SM-rel, vagy bizonyos vazoaktív anyagokkal a kapilláris-proteinek foszforilációját modulálni.

A membránra érkező szignálok a receptorokon, vagy az ioncsatornákon keresztül jutnak a sejt belsejébe, és gyakran eredményezik a sejten belüli cAMP, Ca^{2+} , inozitol polifoszfát és a diglicerol feldúsulását. Ezek a sejten belüli szabályozó molekulák fiziológiai hatásukat a foszforilációs mechanizmuson keresztül fejtik ki, mely az ioncsatornák megnyílásában és számos proteinek foszforilációjában nyilvánul meg (39,2). Igen sok foszforilációs folyamatot három multifunkcionális kináz befolyásol, nevezetesen a ciklikus AMP-függő proteinek

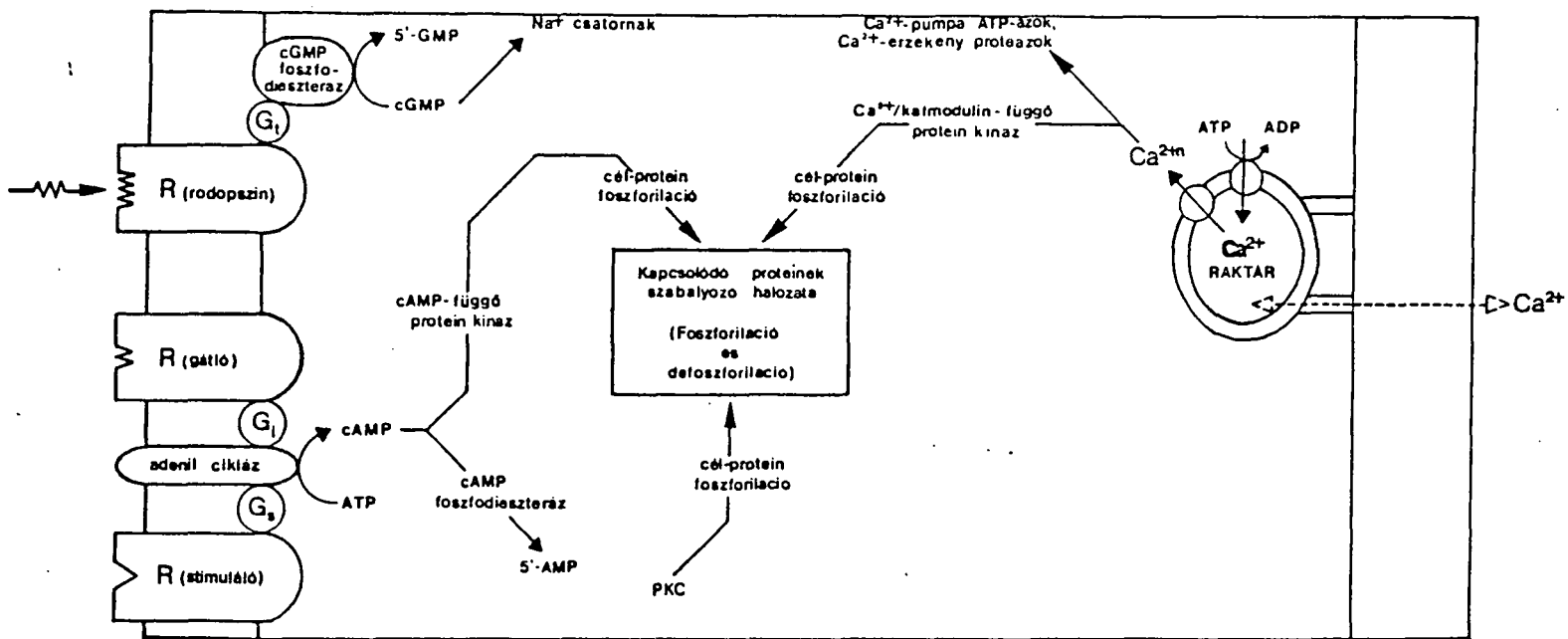
kináz (cAMPPK), a Ca^{2+} /foszfolipid-függő protein kináz C (PK-C) és a Ca^{2+} /calmodulin-függő protein kináz II (CAMK) (1.ábra).

A Ca^{2+} az ionszatórnákon keresztül jut a sejt belsejébe (ill. intracelluláris raktárakból mobilizálódik), és aktiválja a calmodulint. A Cam egy Ca^{2+} -kötő savas protein, melyet CHEUNG fedezett fel (40), mint a ciklikus nukleotidok foszfodiészterázának aktivátorát. A Cam az eukarióták sejtjeiben mindenütt megtalálható. A Ca^{2+} szerepe a sejt folyamatokban jól ismert, hatásának molekuláris mechanizmusa azonban kevésbé. Annyi mindenesetre biztos, hogy önmagában nem lenne képes ilyen sokoldalú hatást kifejteni. Sok esetben hatását a Cam-nal együttműködve fejt ki. Az így létrejött Ca^{2+} /Cam komplex -a Cam másodlagos szerkezetének megváltozása után- különböző enzimekhez kötődhet, és ezáltal aktivizálja azokat (41).

A CAMK a Ca^{2+} /Cam által szabályozott kinázok családjába tartozik, hasonlóan a Ca^{2+} /Cam-függő protein kináz I és III-hoz, valamint a miozin könnyűlánc kinázhoz és a foszforiláz-kinázhoz (42,43). Ezekről eltérően azonban a CAMK számos más kinázt képes foszforilálni in vitro körülmények között. Az '80-as években több különböző laboratóriumban, egymástól függetlenül fedezték fel fiziológiai szerepét a neurotranszmitter-vezikulák exocitózisában (5), a katekolaminok bioszintézisében (44), a citoszkeleton kölcsönhatásokban (45) és a glikogén anyagcserében (46). Ennek megfelelően több névvel illették az irodalomban, így pl.: calmodulin-függő szinapszin I kináz, calmodulin-függő glikogén-szintetáz-kináz és multifunkcionális calmodulin-függő protein kináz. Az utóbbi évek terminológiájában már egységesen mint Ca^{2+} /Cam-függő protein kináz II-t emlegetik.

Legnagyobb koncentrációban az agyszövetben található: egyes agyi területek fehérjéinek mintegy 1-2 %-át alkotja (pl. a hippocampusban) (47). Éppen ezért az agyi kináz a legjobban és legsokoldalúbban jellemzett. Nagy tisztaságú preparátumokat nyertek ki emlőszágyból (45,48-51), májból (46,52,53), vázizomból (54), szívből (55), hasnyálmirigyből (56), retinából (57), tüdőből (8), mellékpajzsmirigyből (58), emlőmirigyből (59), bélbolyhokból (60). Más fajok szöveteiből is tisztítottak CAMK-t, így pl.: örvényféreg (61), angolna (62), tintahal (63) és muslica (64) idegi szöveteiből.

I. ábra. Az intracelluláris szignálok hatásvázlata (B. Mitchell, TIPS 1988/4).



Ilyen Ca^{2+} -Cam függő PK-t tisztítottak ki patkányagyból FUKANAGA és mtsai (65). A tisztított holoenzim relatív molekulatömege (M_r) 640 kilodalton (kDa) és 11-14, egyenként 49 kDa-os alegységből épül fel. Későbbi vizsgálatok kiderítették, hogy a CAMK több alegységből áll, és a különböző agyterületek szövetei eltérő arányban tartalmazzák az 50 kDa-os α , az 58 kDa-os β' és a 60 kDa-os β alegységet. Mivel a β' a β -től mindössze egy 15 aminosavból álló peptidszakaszban különbözik, melynek feltehetően nincs említésre érdemes funkcionális szerepe, ezért a továbbiakban nem teszünk különbséget a két alegység között. Szövettypustól függően a holoenzim relatív molekulatömege 250-780 kDa. Az előagyban az α/β aránya 3/1 (105,106) és $M_r=550$ kDa, a kisagyban $\alpha/\beta=1/4$ és $M_r=615$ kDa (49,67,107). A retinában csak az 50 kDa alegység fordul elő, $M_r=275$ kDa (57). Az egyedfejlődés során sem állandó az alegységek aránya. Előagyból izolált citoszolban a születést követően $\alpha/\beta=1/4$, 90 nappal a születés után a két alegység azonos arányban van jelen. A szinaptikus kapcsolatokban a megszületéskor az arány 1/6, majd a 12. napig az alegységek mennyisége növekszik, és az 1/1 arányhoz közelít. A 12. napon az arány egységnyi, míg a 90. napra eltolódik az α felé, $\alpha/\beta=7/1$ (70). A neuronokban az enzim megtalálható a dendrit-tüskékben, a sejtestben, axonokban, dentritekben és a végkészülékekben, valamint kis mennyiségben a sejtmagban is (5,44,67).

A különböző szövettípusokban talált eltérő arány különböző funkciókra utalhat. Az egyik ilyen funkció lehet a kívülről jövő inger tárolása, illetve hatásának prolongálása.

Régóta feltételezik, hogy a memória kialakulásában a szinaptikus kapcsolatok megerősödése szerepet játszik, de az a molekuláris mechanizmus, amely ezt megvalósítja és állandósítja, teljesen ismeretlen. Egyik lehetőség, hogy a magyarázatot a szabályozott génexpresszióban keressük. Másik, hogy az egyébként instabil fehérjék poszttranszlációs modifikációját (foszforiláció) tételezzük fel információhordozónak, és ezeket kétállapotú 'tárolóknak' tekintjük.

CRICK 1984-ben (68) egy olyan hipotetikus enzimrendszert írt le, amely a sejtszintű dinamikus adaptáció, illetve 'memória' hordozója lehet. Ezen elmélet szerint az információ tárolásáért olyan párokba rendeződő fehérje monomerek

felelősek, melyek szignál hatására -pl. foszforilációval- aktív állapotba kerülnek. Ehhez elég csak az egyikük aktiválódása, mivel egy ilyenkor bekapcsolódó autokatalitikus mechanizmussal a másik monomer is átalakul ebbe a formába. Így válik lehetővé, hogy az enzim a degradáció és a reverzibilitásért felelős partner -pl.: foszfatáz- ellenében is fenn tudja tartani a dimer aktív állapotát. Így a szignál megszűnte után is aktív marad, másrészt abban az esetben, ha inaktív volt mindkét monomer, akkor ezt a állapotot őrzi meg. Némi absztrakció árán belátható, hogy mindez egy kétállapotú molekuláris kapcsoló 'be' illetve 'ki' helyzetének felel meg (a számítógépből ismert 'flip-flop' analogonjaként).

Az időközben felgyülemlett kísérleti adatok alapján LISMAN (9,69) rámutatott, hogy a CAMK autofoszforilációja és kinetikai tulajdonságai, ubikviter jellege (szinte valamennyi szövettípusból kimutatták) és intracelluláris lokalizációja révén megfeleltethető a Crick-féle modell kulcsenzimének.

A CAMK α - és β -alegységének szekvenciáját cDNS klónozás segítségével határozták meg (89,90). Lipman és Wilbur módszerével összehasonlítva a két szekvenciát, magas homológia tapasztalható közöttük: a megegyező aminosavak száma 399. Az α 478, a β 542, a β' 527 aminosav hosszúságú. Az N-terminális (β_{1-315}) 91%, a C-terminális ($\beta_{316-542}$) 76% homológiát mutat a másik alegységgel. A középső régió ($\beta_{316-392}$) másolásakor a megfelelő nukleinsav-szekvencia proceszszingje során bekövetkező törlődések, ill. beszúrások miatt kisebb fokú hasonlóságot mutat. A β' és a β között a különbség mindössze egy 15 aminosavból álló peptid, mely a C-terminálison található ($\beta_{378-392}$), és feltehetően nem rendelkezik önálló funkcióval, ezért a későbbiekben nem különböztetjük meg e két alegységet.

A patkányagyi kináz alegységeinek közös tulajdonsága, hogy tartalmaznak ATP-kötő helyet, katalitikus régiót és Cam-kötő helyet. Ezek mind az N-terminálison vannak, de a C-terminális funkciója még ismeretlen.

A PK-ok katalitikus alegysége általában 200-300 aminosav hosszúságú. Rendszerint nincs fix helyzetük a primer szerkezetben. Az N-terminálisnak szabályozó szerepe van. A PK-k többsége alegységekből épül fel, és az alegységekközül néhány, vagy mindegyik tartalmazza a katalitikus helyet. Szubsztrátspecifitásuk alapján két osztályt képezhetünk : a szerin/treonin- és a tirozin-specifikus csoportot (2.táblázat).

2.Táblázat.A protein kinázok két osztálya (T.Hunter Cell, 1987/11).

Protein-szerin/treonin kinázok

Ciklikus nukleotida-regulált
 cAMP-függő protein kinázok
 cGMP-függő protein kinázok
 Calmoduli-regulált
 foszforiláz kináz
 miozin könnyűlánc kináz
 CAMK-II
 CAMK-I és III
 Diacilglicerol-regulált
 PK C
 Egyéb
 kazein kináz I és III
 nukleáris protein kinázok
 proteáz-aktivált kináz I és III
 glikogén szintáz kináz 3, 4
 heme-regulált protein kináz
 RNS-regulált protein kináz
 DNS-regulált protein kináz
 S6 kináz
 β -adrenerg receptor kináz
 rodopszin kináz
 hiszton H-1 kináz
 hidroximetilglutaril-CaA red.kin.
 piruvát dehidrogenáz kináz
 polipeptid-függő protein kináz
 poliamin-stimulált protein kináz
 c-mos,c-raf, A-raf, pks, pim-1
 CDC-R, CDC-2H, PSK H1, PSK-C3

Protein-tirozin kinázok

src gén család
 pp60c-src
 pp62c-yes, pp56lck
 fgr,hck,fyn,lyn proteinek
 abl gén család
 p150c-abl
 arg protein
 fps gén család
 p98c-fps
 NCP94
 TRK11, TRK16
 Növekedési faktor receptor
 EGF receptor család
 c-erb protein
 erb3 protein
 Inzulin receptor család
 inzulin receptor
 IGF-1 receptor
 c-ros, met, trk
 PDGF-receptor család
 PDGF receptor
 CSF-1 receptor
 c-sea, ret proteinek
 Egyéb
 p75
 p120

HANKS és mtsai (91) a már ismert kinázok szekvenciáinak összehasonlítása során azt tapasztalták, hogy az ugyanolyan specifitású kinázok katalitikus helyének szekvenciája nagyon hasonló, így pl. a Cam-függő kinázoké is. Ez annak következménye, hogy funkciójuk, mely még nem minden részletében világos, feltehetőleg megegyezik. A CAMK-ban ez a régió, alegység tipustól függően, az 50-280 aminosav között található.

Az N-terminálison, a katalitikus régió előtt található az ATP-kötő régió (α_{20-42} , β_{21-43}). Bennett és Kennedy (90) szekvencia-azonosságokat kutatva azonosította a nukleotid kötéshez feltétlenül szükséges szekvenciát:

Gly-X-Gly-X-X-Ser (G-X-G-X-X-S),

mely nagyon hasonló a más kinázokban talált nukleotid-kötő szekvenciához (G-X-G-X--X-G). Ahhoz, hogy a kináz ATP-t tudjon kötni, szükség van még más kötődési pontokra. Ilyen kötődési pont lehet az α_{42} - illetve a β_{43} -nál található lizin (Lys,K), és valószínűleg a katalitikus hely szekvenciáján található aszparagin(Asp)-csoport az α_{156} ill. β_{157} pozícióban.

A szekvenciák közepén ($\alpha_{289-310}$, $\beta_{290-311}$) található szakaszon több funkcionálisan fontos helyet azonosítottak. A homológia vizsgálatok szerint a Cam-kötő helynek a 295 és 315 aminosavak között kell elhelyezkednie (89,91,92). Szintetikus peptidanalógokkal bizonyították, hogy a Cam-kötés fő determinánsa a 296-309 szakasz (93,94). Ez megfelelő környezetet biztosít a Cam-kötéshez, amelyhez amfipatikus α -hélixre, bázikus oldalláncokra és a szomszédos területeken hidrofób aminosavakra van szükség (94,95, 96). Azonosítottak egy Cam-kötő helyet is (93,97), melynek szekvenciája:

Ala-Arg-Arg-Lys (A-R-R-K).

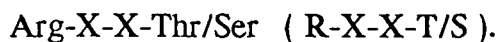
Más Cam-függő kinázok tanulmányozása során kiderült (98,99), hogy a Cam-kötő hely közvetlen szomszédságában van egy gátló régió, mely a miozin könnyűlánc kináz esetében pszeudoszubsztrátként funkcionál. Ez azt jelenti, hogy kompetícióban van a foszfát-akceptor szubsztráttal. Hasonló pszeudoszubsztrát típusú gátlóhely található a cGMP-, cAMP-függő kinázban, és a PK-C-ben is.

Szintetikus peptidekkel vizsgálva ezt a területet, COLBRAN és mtsai (100) arra a következtetésre jutottak, hogy a CAMK₂₈₁₋₃₀₉ közötti tartománya képes gátolni az autofoszforilációt, csakúgy, mint a szinapszin I foszforilációját, mely egyébként a CAMK igen jó szubsztrátja. A gátló régiót tehát ebben a tartományban kell keresnünk.

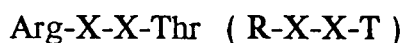
Arra is fény derült, hogy a CAMK gátló szekvenciája nem pszeudoszubsztrát mechanizmust használ (un. tisztán kompetitív mechanizmusú vetélkedő gátlás az endogén pszeudoszubsztrát és az exogén protein szubsztrát között), hanem blokkolja a kináz aktív centrumát (100).

A foszforilációs helyek azonosítását foszfoaminosav- analízis, kétdimenziós termolitikus foszfopeptid rétegekromatográfia és magas nyomású folyadékkromatográfia segítségével végezték LAI és mtsai (101).

A CAMK szubsztrátspecifitását vizsgálva szintetikus peptidek segítségével határozták meg azt a minimális szekvenciát, amelyet az enzim felismerni, és foszforilálni képes (102):



(Az Arg helyén állhat Lys is.) THIEL és mtsai. (103) bebizonyították, hogy az



szekvencia fontos szerepet tölt be a kináz működésében.

A foszfor-beépülés időfüggő vizsgálatai azt bizonyították, hogy első lépésben Ca^{2+} /Cam-függő autofoszforiláció jön létre a Thr₂₈₆ foszforilálódásával. Ezt szintetikus peptid-analógot ($\alpha_{281-289}$) használva bizonyították. A Cam hozzáadása után a peptid és a natív enzim hasonló viselkedést mutatott (100). Ezt követően a kináz foszforilációja csak részben függ a Ca^{2+} /Cam jelenlététől.

A Ca^{2+} /Cam-független autofoszforiláció (melynek létezésére már MILLER és KENNEDY (85) kísérletei is utaltak) tehát egy másik ponton történik. SHOWER és mtsai (104), szintetikus peptidekkel végzett kísérleteiben, jó autofoszforilációs helynek találta még a $\alpha_{311-314}$ -et, mely lehet a Ca^{2+} /Cam függetlenségért felelős hely.

A funkcionális területek feltérképezésének az az egyik módja, mint azt már az előzőekből is láthattuk, hogy szintetikus peptidek segítségével azonosítsuk a területet. A szintetikus peptidek kiválasztásának egy lehetséges módja, hogy úgynevezett anti-sense peptideket készítsünk. Az anti-sense peptideket tulajdonképpen az a komplementer nukleinsav szekvencia (néma lánc) kódolja, melynek párjáról az eredeti azonosítandó szekvencia származik. Ezzel az eljárással például a peptid-ligandokat és azok receptor-kötő helyeit lehet megkeresni (108). A vizsgálatok során megfigyelték, hogy a hidrofíl aminosavak anti-sense párjai hidrofóbok, vagyis egymás antihidropátiás párjai. Általánosságban ez azt jelenti, hogy a hidrofób aminosavak kodonjainak

komplementere hidrofil aminosavakat kódol, ha azt az 5'-3' irány helyett a 3'-5' irányba írjuk át (109). Így azok a peptidek, amelyek a komplementer DNS szálakról származnak, egymás hidropátias komplementerei. Ez az eredeti peptid és annak anti-sense párja között olyan amfipatikus kölcsönhatást indukál, amely elősegíti a két peptid egymáshoz kötődését. Számos vizsgálat bizonyítja az elmélet helyességét (108, 110, 111, 112, 113, 115) és azt jelzi, hogy ennek a kötődésnek fontos biológiai és evolúciós jelentősége lehet.

FASSINA és mtsai (114) amikor a c-raf kináz egyik funkcionális területének -receptorának- ligandját tervezték, olyan anti-hidropátias peptidet készítettek, mely nem a DNS anti-sense párjáról lett kódolva, hanem a hidropátias indexek alapján számítógéppel tervezték. Ezzel a módszerrel is igen jó kötődést kaptak.

3.CÉLKITŰZÉSEK

Az agyszövetből izolált mikroerek vizsgálata során kapott korábbi eredmények arra utalnak, hogy a SM rendszer elemei befolyásolhatják a vér-agy gát működését. Arra vonatkozóan azonban, hogy ez miként zajlik le, és mely proteinek vesznek részt ebben a folyamatban, nem volt még adatunk. Ezért értekezésemben a SM-ek által aktivált protein kinázok jelenlétének és foszforilációjának vizsgálatát tűztem ki célul.

1. Választ kívántunk kapni arra, hogy vannak-e olyan protein kinázok az agyi preparátumunkban, melyek befolyásolhatják a kapilláris endothel működését.
2. Bár a CAMK-t számos sejttípusból és szövetből kimutatták, jelen ideig még senki sem jellemezte ezt a kináz az agyi mikropillárisokban.
3. Mint az a bevezetésből is kitűnik, a CAMK funkcionális területeinek egy részét már feltérképezték. Az azonban megválaszolatlan maradt, hogyan tudja fenntartani a kináz az inaktív állapotot, vagyis hol lehet az 'aktív centrum' a szekvenciában, és milyen mechanizmus útján fejt ki hatását.

Alapkutatás jellegű vizsgálatainkban elsősorban a SM-rendszer elemeinek, illetve egyes speciális protein kinázoknak -jelen tanulmányban a CAMK-nak- a vér-agy gát permeabilitást változtató hatásainak molekuláris mechanizmusára vonatkozóan kívántunk adatokat szolgáltatni. A mikroerekben zajló molekuláris folyamatok pontos megismerése egyes agyödémák és agyi hipoxiák új elveken alapuló gyógyszeres kezelését eredményezheti.

4.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1.Az agyi mikroérdús frakció előállítása

A mikroereket felnőtt, Wistar típusú, példányonként 200-300 gramm súlyú, azonos nemű patkányokból tisztítottuk. Egy tisztításhoz 10, összesen 90 állatra volt szükségünk.A tisztítást JOÓ és KARNUSHINA (4) módszerével végeztük. Az állatokat éterrel altattuk, majd Krebs-Ringer (pH=7.4) oldattal mostuk ki a kapillárisokból a vért (mely zavarhatta volna a foszforilációs vizsgálatokat). Az agyakat kivettük a koponyából és az agykérget megtisztítottuk a fehér állománytól ill. az agyhártyáktól. A nagyagy kéregállományát 4°C-on kézzel homogenizáltuk, nylon szűrőkön keresztülpréselve, melyeknek áporusmérete: 250- és 150 μm . A homogenizátumot tízszeres térfogatú, 50 mM Tris-HCL pufferben (pH=7.2) vettük fel, mely 250 mM szaharóz-t és 5 mM EDTA-t tartalmazott. Az elegyet 3,500 g-n 10 percig centrifugáltuk, 4°C-on. Az üledéket hasonló pufferben vettük fel EDTA nélkül, és megismételtük a centrifugálást. A mosást követően az üledéket cukorgradiensre rétegeztük (1.0,1.3, és 1.5 M: 6 ml midegyikből), és Beckmann ultracentrifugában (L2 65k) SW 25.1 rotort használva 58,000 g-n 30 percig centrifugáltuk, 4°C-on. Ezek után már csak a tisztított kapillárisok ülepedtek ki a centrifugacső aljára. A dúsulást fény- és elektronmikroszkóppal, marker enzimek segítségével ellenőriztük, melyek specifikusan csak az endothel sejteket jelölik (18) (2.ábra). A mintákat 25 mM Tris/2-(N-morfolino) etenilszulfonsav (Tris-MES) pufferben (pH=7.4) mostuk ki és fagyasztottuk le, -20°C-ra.

4.2.Foszforiláció vizsgálata

A mintákat használat előtt felolvasztottuk, majd 25 mM Tris-MES pufferben (pH=7.4) 2 mM fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF) jelenlétében homogenizáltuk. A homogenizált mintákat (100 μg fehérje mintánként, melyet LOWRI és mtsai. (19) módszerével határoztunk meg), 10 percig 25°C-on inkubáltuk. Az elemzéshez használt



2.ábra. Patkány agykérgéből izolált mikroér frakció fénymikroszkópos képe.

inkubációs elegy 10 mM $MgCl_2$, 100 μM $CaCl_2$ és 10 μM [γ - ^{32}P]ATP-t (10 μCi -t mintánként) tartalmazott, mint ahogy azt már OLÁH és KISS (20) leírták. A kontroll mintában a Ca^{2+} megkötését 2 mM EGTA hozzáadásával érték el, mellyel 5 percig előinkubáltunk. A Cam-függő kinázokat 100 μM Ca^{2+} és 5 μM calmodulin jelenlétében vizsgáltuk. A PK-C szubsztrátjainak azonosításához a proteolitikusan aktivált PK-C-t használtunk, melyet PETER J. PARKER-től (Ludwig Institute for Cancer Research in the Imperial Cancer Research Found, Lincoln's Inn Fields, London, England) kaptunk. A cAMP- és cGMP-függő kinázok vizsgálatát 2 mM EGTA jelenlétében végeztük.

A reakciót radioaktívan jelzett ATP inkubációs elegybe injektálásával indítottuk, és nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapufferrel állítottuk le (21). A proteineket 4% gyűjtő és 10%-os elválasztó SDS PAGE-vel választottuk szét (21). Az elektroforézis után a géleket cellofán lapok között kiszárítottuk, majd ezekkel exponáltuk a röntgen filmeket 3 napig, intenzitás-növelő betétek jelenlétében $-70^\circ C$ -on. Az autoradiogramokat denzitométerrel értékeltük ki. Az ehhez szükséges software-t POLLÁK TAMÁS (22) készítette (az autoradiogramok az 2.ábrán láthatók).

A tisztított CAMK (melyet prof.H.-D. Söling bocsájtott rendelkezésünkre) foszforilációjának mérésénél az inkubációs elegy 4 μg fehérjét (aktivitás: 56 U/mg) és 20 μg szintetikus peptidet tartalmazott mintánként. A reakciót 100%-os triklórecetsav (TCA) állítottuk le, majd a kicsapott fehérjét tartalmazó oldatot Whatman ET-31 papírra pipettáztuk. A be nem épült radioaktivitást 10%-os TCA-val és alkoholos mosással távolítottuk el a filterekről. A korongokat dioxános koktélba tettük, majd folyadék scintillációs mérőben megmértük a beütésszámot.

4.3. Defoszforiláció vizsgálata

Az előbb ismertetett SDS PAGE módszerrel közvetve vizsgálhatjuk a foszfatázok defoszforilációt módosító hatását is. Ebben az esetben a Cam hozzáadását követően 4 perc után 20 mM NaF-ot injektáltunk a homogenizált mikropapillaris preparátumba. (A NaF a foszfoprotein-foszfatázok gátlószere.)

4.4.A peptidek szintézise

A szintetikus peptideket automata peptid szintetizátorral készítették a SZOTE Orvosi Vegytani Intézetében. A szintézishez használt aminosavak BOC védelemmel voltak ellátva. Az aminosavakat metilbenzidrilamin gyantához kötötték karboxilcsoportjuk révén, majd a szintézis végén a védőcsoportok eltávolítása után, a peptideket folyékony hidrogén-fluoriddal hasították le a gyantáról. A peptidek tisztítását HPLC-vel végezték. A peptidek tisztasága >95%-volt. Használat előtt a tisztított, majd liofilizált peptideket Tris-HCL pufferben oldottuk fel a kívánt koncentrációban.

A vizsgálatainkhoz használt peptidek:

19-AA	LYEDIGKGAFSVVRRRCVKL
14-AA	GKGAFSVVRRRCVKL
12-AA	GAFSVVRRRCVKL
8-AA	VVRRRCVKL
6-AA	GKGAFS
Kontroll	GSRRRRRRY

4.5.Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A poliakrilamid az akrilamid és az N,N'-metilén-biszakrilamid (BIS) térhálós szerkezetű polimerizációs terméke. A háromdimenziós gél szerkezet az egymás mellett növekedő poliakrilamid láncok hálósodása közben képződik. Az akrilamid és a BIS-koncentráció, ill. a polimerizáció foka meghatározza a gél rácsszerkezetét, amely az átlagos pórusnagysággal fejezhető ki.

A PAGE valamennyi fehérje (fehérje oldat) elválasztására és analízisére alkalmas. Az akrilamid és a BIS arányának változtatásával különböző pórusnagyságok érhetők el, ami lehetővé teszi a különböző fehérjék szétválasztását.

A fehérjéket SDS-al kezelve, a molekulákat azonos töltésű random láncokká alakíthatjuk. Ez teszi lehetővé, hogy ezt a módszert molekulásúly meghatározásra használjuk, ugyanis az SDS-fehérje komplex elektroforetikus vándorlása arányos a molekulásúllyal. A fehérje-SDS komplexek tulajdonságai és ezzel kapcsolatosan az

elektroforetikus vándorlást meghatározó tényezők tanulmányozása azt mutatja, hogy a vándorlás csak abban az esetben arányos a molekulasúllyal, ha a makromolekulák hidrodinamikus formája és töltés/tömeg aránya megegyezik. Ezek a feltételek csak akkor teljesülnek, ha az SDS és a fehérjék pontosan azonos mértékben kapcsolódnak. Általában a fehérjék megfelelnek ennek a követelménynek.

A mozgékonytságot a

fehérjevándorlási távolság

mozgékonytság=-----

front távolság a festés után

összefüggésből számíthatjuk. A mozgékonytságot ismert molekulasúlyú fehérjékkel hasonlítjuk össze, melyek segítségével kalibrációs görbét készíthetünk.

A fehérjék és nukleinsavak általában ^{131}I , ^{32}P és ^{64}Cu izotópokkal jelölhetők. A ^{131}I , ^{32}P radioizotópokkal jelzett fehérjemolekulák helye a géllapokon autoradiográfiával határozható meg.

4.6. Autoradiogramok kiértékelése

A 3 napos expozíció után a röntgenfilmeket előhívtuk.

Az autoradiogramokat ZX Spectrum mikrokomputerrel össze kapcsolt denzitométerrel értékeltük ki. A program automatikus háttér-korrekcióval dolgozott. A ^{32}P beépülését az egyes fehérjékbe a gélen található csikoknak megfelelő feketedések mutatták (3.ábra). Ennek értékét az egymást követő völgypontok közötti területek integrálása adta.

4.7. Anyagok

A ciklikus nukleotidok, calmodulin, EGTA, EDTA, PMSF, akrilamid és bis-akrilamid valamint a peptidszintézishez használt aminosavak a SIGMA-tól (St.Louis, MO, U.S.A.) származnak. ^{32}P -foszforsav (specifikus aktivitás 1000 Ci/mmol) a NEN-ben (Boston, MA, U.S.A.), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ pedig a Szegedi Biológiai Kutató Központ Izotóp Intézetében készült. Minden más vegyszer a Reanal Vegyészeti Gyár terméke.

5.EREDMÉNYEK

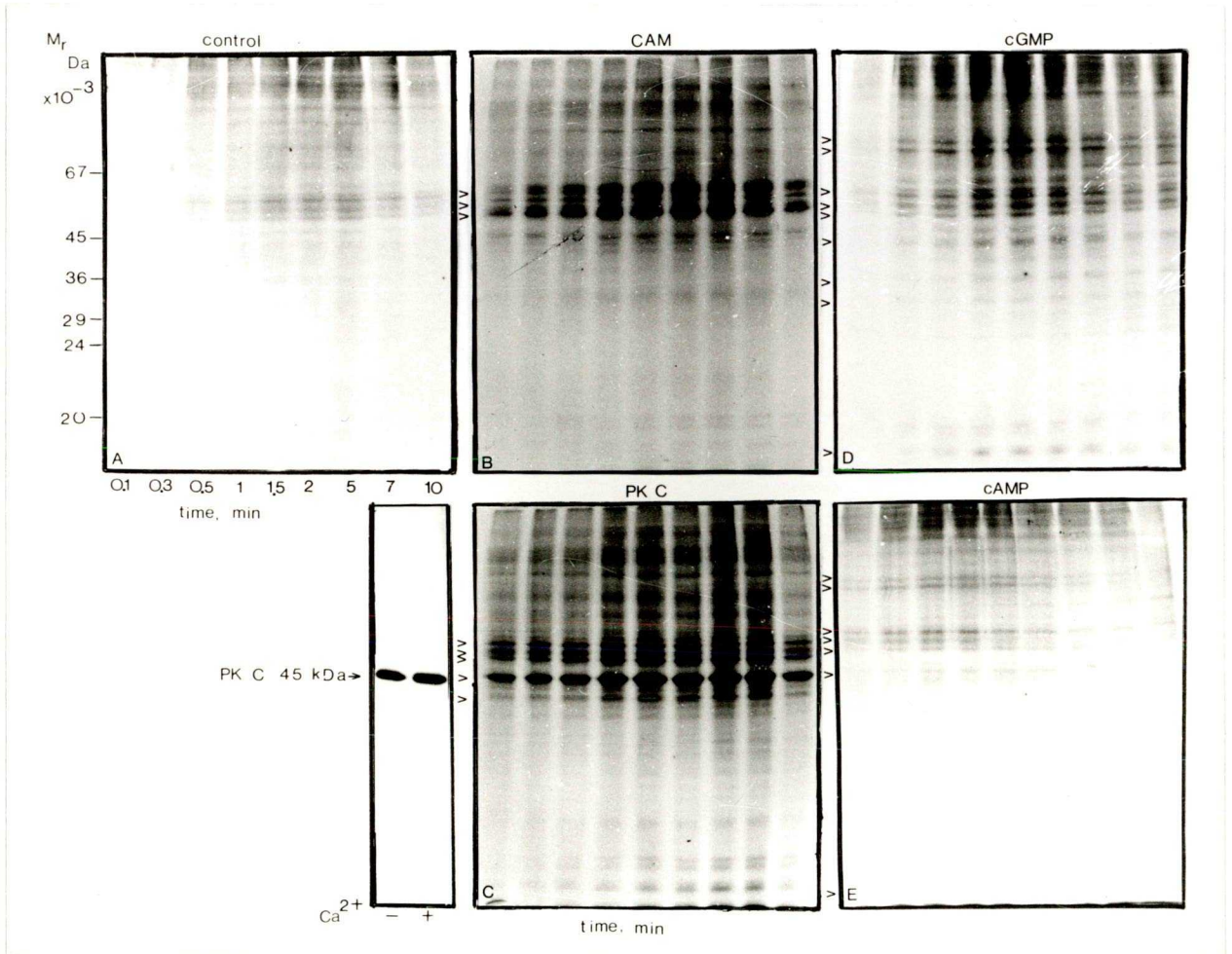
A felnőtt patkányok nagyagykérgéből preparált mikrokapilláris frakciók fehérjei minden esetben mutattak némi foszforilációs alapaktivitást, melynek időfüggése a 3.A ábrán látható. Három vagy négy gyengén foszforilálódott fehérje-csík található az 50-60 kDa közötti tartományban. Ezek relatív molekulatömege 58(57)-, 55- és 50 kDa. A foszforiláció a perfúzió és a 2mM EGTA (mely a Ca^{2+} specifikus kelátora) előinkubálás ellenére a sejtmembránhoz kötődött SM-ek hatásáról árulkodik. A fehérjefoszforiláció az állandóan jelenlévő proteolitikusan aktivált PK-C következménye is lehet (3.A,C ábra). Tisztított SM-eket adva a preparátumhoz (Cam, cAMP, cGMP, Ca^{2+} (PK-C)) jelentősen tudtuk növelni a proteinek foszforilációját (3.B-E ábra). A négy enzim közös szubsztrátjai azok a foszfoproteinek, melyek foszforilációját már a kontroll mintákban is megfigyelhettük.

5.1 A PK-C szubsztrátjai

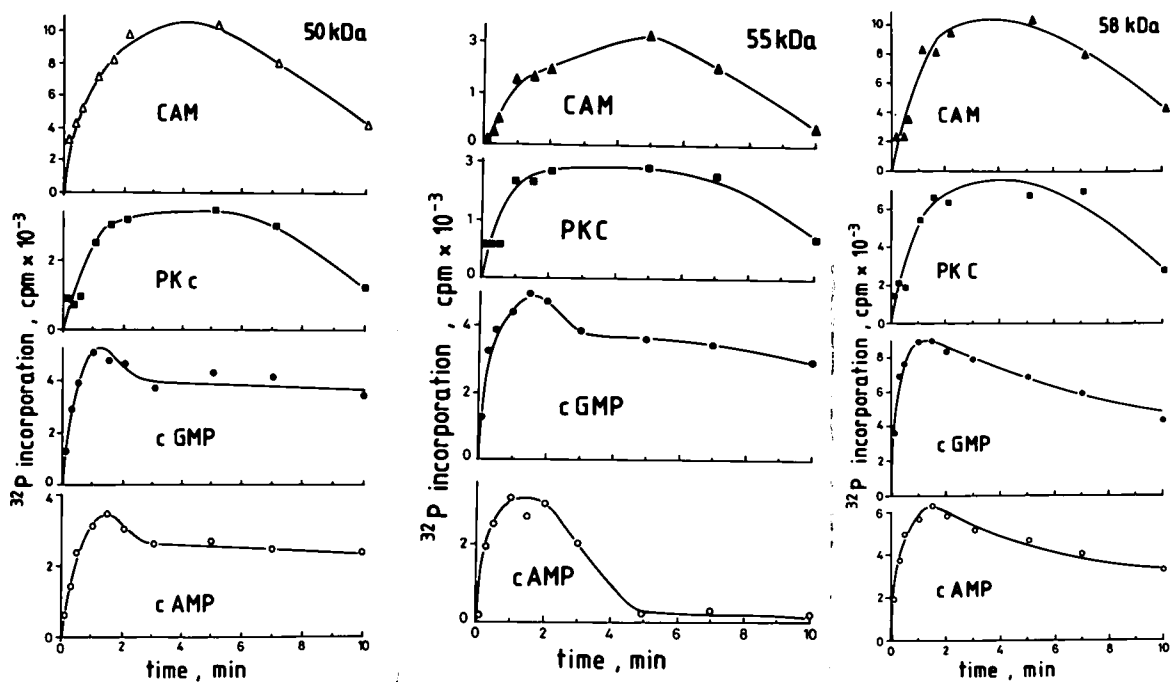
Ahhoz, hogy meghatározzuk a PK-C szubsztrátjainak megfelelő fehérjecsíkokat, exogén enzimet (a PK-C proteolitikus fragmentjét) adtunk az inkubációs mintához (3.C ábra). Látható, hogy a polipeptid molekulatömege kisebb, mint a CAMK α (50 kDa) alegységéé (3.B és C ábra).

Azt hogy a PK-C proteolitikus fregmentje jelen lehet a preparátumunkban azt az autotadiogramokon látható 45 kDa-os csík jelzi.

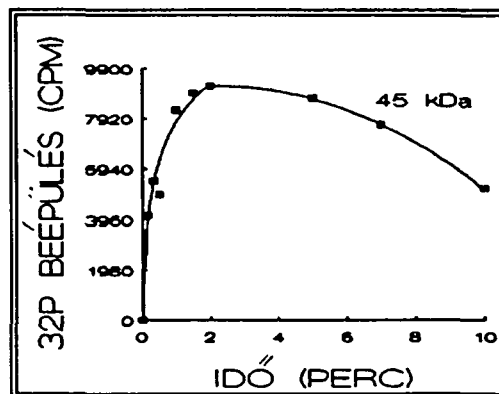
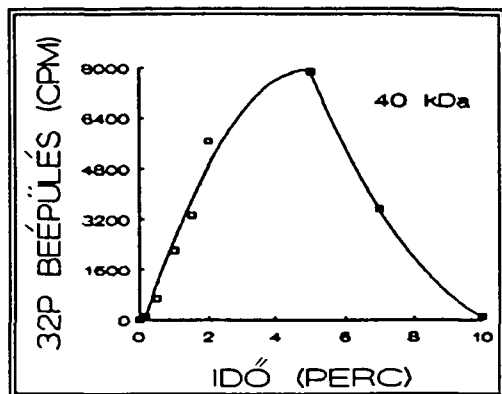
Az exogén PK-C a 40 kDa-os fehérjét azonosította mint fő szubsztrátot a preparátumban. Ez a fehérje hasonló, de kinetikailag eltérő foszforilációs mintázatot mutat, mint a 45 kDa fragmens: foszforilációja lassúbb, defoszforilációja viszont gyorsabb mint a 45 kDa-os polipeptidé. A folyamat reverzibilitását tükrözi a 40 kDa-os fehérje kinetikája (5.ábra).



3.ábra. Az autoradiogramok a különböző second messengerekkel inkubált mikrokapillaris preparátumok foszforilációs kinetikáit mutatják be. A:kontroll minta (2mM EGTA). A B:a calmodulin (100 μ M Ca^{2+} és 5 μ M Cam), C:a PK-C (0.1mg/ml), D:a cGMP (2mM EGTA és 10 μ M cGMP), és a E:a cAMP (2mM EGTA és 10 μ M cAMP) hatását vizsgálja. A második sor bal szélén a proteolitikusan aktivált PK-C autofoszforilációja látható Ca^{2+} jelenlétében (+), és nélkül (-). Nyilakkal jelöltük azokat a foszfoproteineket, melyek a reakció során szignifikánsan foszforilálódtak. A gélekben minden csík 10 μ g fehérjét tartalmazott.



4.ábra. A mikrokapilláris proteinek foszforilációja különböző PK-ok hatására, az endothel sejtekben. A PK rendszert $10\mu\text{M}$ cGMP ill. cAMP és 2mM EGTA, valamint Cam és PK-C -EGTA nélkül- tanulmányoztuk. A relatív molekulatömegek az ábra felső részén láthatók.



5.ábra. A PK-C-specifikus proteinek foszforilációja az agyi mikropilláris frakcióban. Az inkubációs médium proteolitikusan aktivált PK-C katalitikus fragmentjét tartalmazta, 0.1 mg/ml koncentrációban. A foszoproteinek megkülönböztetésére, a molekulatömegeket az ábrák jobb felső sarkában tüntettük fel.

5.2 cGMP-függő protein foszforiláció

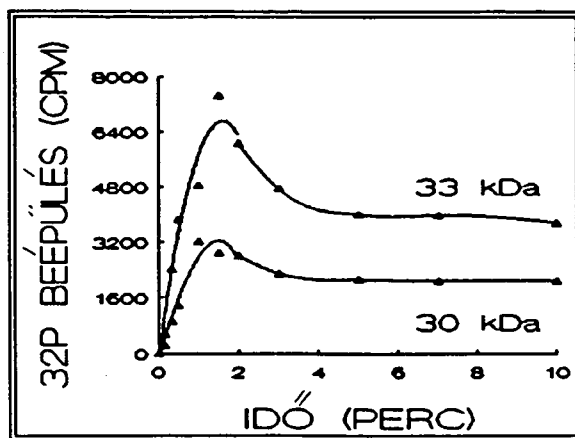
Gyors és kifejezett foszforiláció tapasztalható a cGMP aktiváció után, mely erősebb volt, mint amit cAMP hozzáadása után láttunk.

A ciklikus nukleotidokkal indukált foszforiláció maximumát ötször gyorsabban érte el, mint a Cam-függő rendszer (4. ábra).

Az 55-kDa-os foszoprotein (mely valószínűleg a tubulin alegysége), hasonlóan a CAMK-ként azonosított 50- és 60-kDa-os fehérjékhez, ciklikus nukleotid-függő PK hatására is aktiválódott. Az EGTA jelenléte miatt a CAMK alegységeinek foszforilációja kevésbé volt kifejezett, mint Cam injektálás után.

A Cam- és ciklikus nukleotid-függő kinázok kölcsönhatása a foszforiláció folyamatában nyilvánvalónak tűnt mind a CAMK-, mind a tubulin alegységeinél.

A cAMP- és cGMP-függő kinázoknak vannak közös szubsztrátjaik (7. ábra), de van néhány cGMP-re specifikus foszoprotein, melyek relatív molekulatömege 30- és 33 kDa (6.C ábra).



6.ábra. cGMP-specifikus protein-foszforiláció a mikrokapilláris preparátumban. A cGMP-t ($10\mu\text{M}$) 2mM EGTA jelenlétében adtuk az inkubációs elegyhez. A relatív molekulatömeg az ábrák jobb sarkában található.

5.3.cAMP-függő foszforiláció

Úgy tűnik, hogy a cGMP- és cAMP-függő kinázok azonos szubsztrátokra is hatnak (68-,66-,40- és 17 kDa, 7.ábra), de egyes esetekben, mint pl. 55-, 40- vagy 17 kDa-os polipeptideknél (4.,6.,7.ábra), különböző hatásfokkal. A cAMP hatásfoka a mikrokapilláris foszfoproteinjeire alacsonyabb, mint a cGMP-é.

A cAMP-függő proteinek viszonylag gyorsabban defoszforilálódnak, mint a cGMP-függőek (kivéve a 17 kDa-os fehérjét).

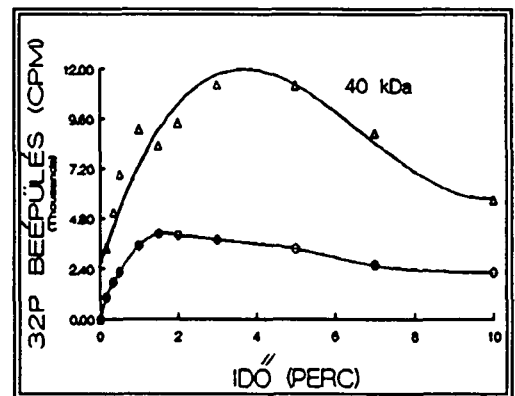
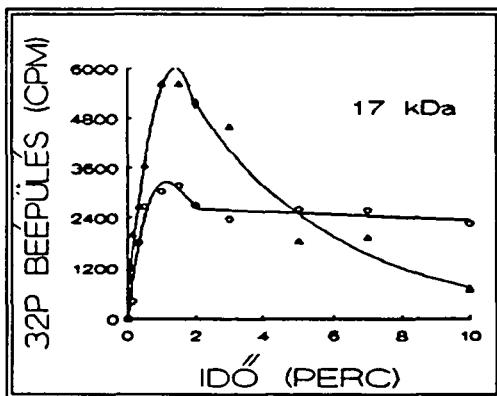
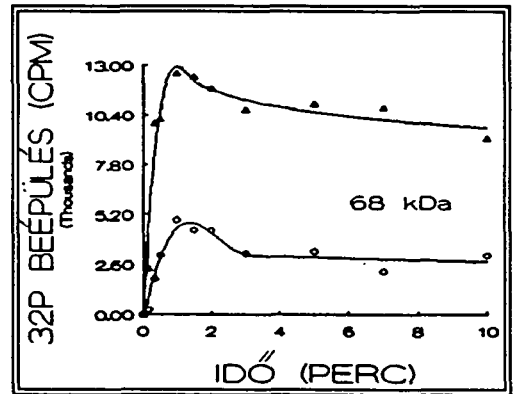
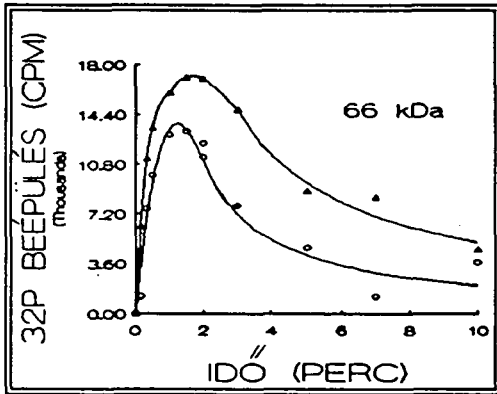
5.4. A Ca^{2+} /Cam-függő protein kináz kinetikai vizsgálata

A Ca^{2+} /Cam által serkentett foszforiláció az 58-, 55- és 50 kDa-os proteinekben magasabb, mint amit a kontroll mintában tapasztalhattunk. A foszforiláció maximumát a 4.percnél érte el. Néha, az emelkedő fázis alatt, rövid késlekedő periódus figyelhető meg (4. ábra 58- és 55 kDa). A defoszforiláció, ellentétben a ciklikus nukleotidok által aktivált protein kinázoknál tapasztaltakkal, a görbe viszonylag gyors lecsengését eredményezi (utolsó periódus). Ez foszfoprotein-foszfatazok jelenlétére utal, melyek hatása ellentétes a foszforilációval.

A Ca^{2+} /Cam-függő foszforiláció legjellemzőbb szubsztrátjai az 50- és 58 kDa-os alegységek, melyek, molekula tömegük alapján, azonosak lehetnek a Ca^{2+} /Cam-függő

protein kináz II α és β alegységével (7). Az alegységek foszforilációjáról tudott, hogy kinetikájuk aszimmetrikus lefutású (37), mint az a 4. ábrán látható.

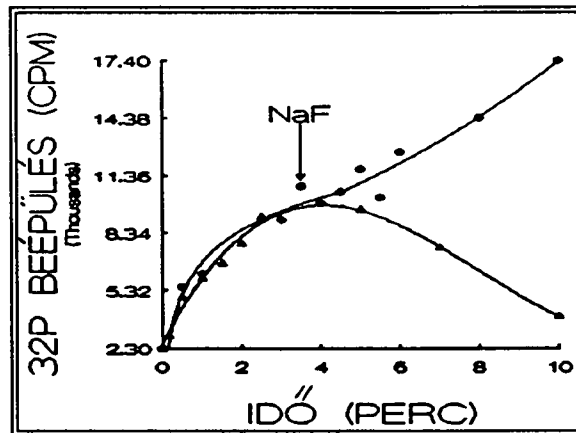
A tubulin α és β alegysége is ebben a molekulaszúly tartományban található (37), molekulatömegük 55- és 58 kDa, mely egyes csíkok heterogenitására figyelmeztet.



7.ábra. Ciklikus nukleotid által indukált protein foszforiláció agyi mikropapillárisokban. A cGMP(Δ) és cAMP(o) koncentrációja $10 \mu\text{M}$. Az inkubációt 2mM EGTA jelenlétében végeztük. A relatív molekulatömeget, a proteinek megkülönböztetésére, az ábrák jobb sarkában tüntettük fel.

5.5 NaF hatása a CAMK foszforilációjára

Annak eldöntésére, jelen vannak-e a foszfatázok a preparátumban, NaF-al, egy általánosan ismert foszfatázgátlóval, végeztünk kísérleteket. Ha a Ca^{2+} /Cam-aktivált preparátumhoz a CAMK maximális foszforilációs szintjénél (4. perc) NaF-ot adtunk, azt tapasztaltuk, hogy a defoszforiláció helyett fokozódott a ^{32}P -fölvétel a CAMK α és β alegységében (8.ábra). Az első 4 perc alatt lezajló reakció kinetikája megegyezik az előzőekben tapasztaltakkal (4.ábra).

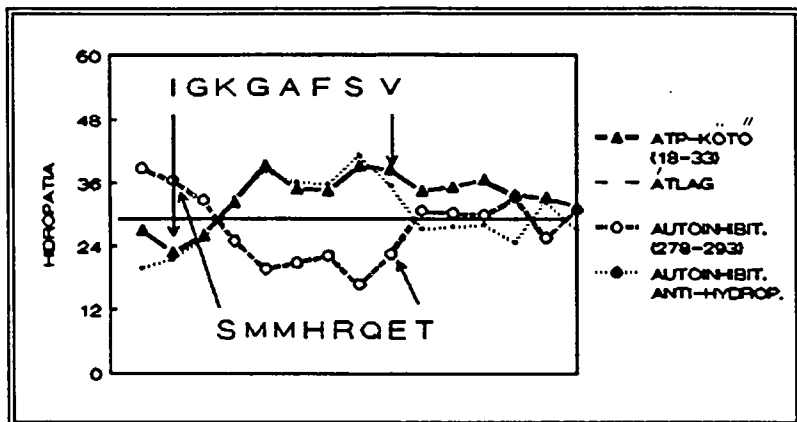


8.ábra. Ha a Cam ($5\mu\text{M}$) stimulált foszforiláció maximumánál NaF-ot (20mM) adtunk a mintához, szignifikáns növekedést tapasztalhattunk, mely igazolja azon feltevésünket, hogy a foszforiláció csökkenését a foszfatázok működése okozza. Az EGTA-nak, melyet a NaF-al együtt adtunk a mintához (2mM), a Ca^{2+} megkötése miatt, a foszforiláció csökkenését kellett volna okoznia. Mivel nem ez történt, egy autonom aktivitás kialakulására következtethetünk. (● NaF hatása, ▲ kontroll)

5.6. A szintetikus peptidek tervezése

A szintetikus peptidek tervezése során Fassina és mtsai (114) gondolatmenetét követtük. Eszerint olyan peptideket kellett készítenünk, melyek hidrofobicitása ellentétes az autoinhibitor tartományéval. Mivel mi elsősorban a kinázon belül kerestük az úgynevezett 'aktív centrumot', ezért megvizsgáltuk, hogy a β -alegységen belül található-e ilyen szekvenciárészlet. Az összehasonlítás során azt tapasztaltuk, hogy az ATP-kötő hely kielégíti ezt a feltételt, ezért a vizsgálatainkhoz használt peptideket az

ATP-kötő régió azon szakaszából választottuk ki, mely magában foglalja a G-K-G-A-F-S szekvenciát (9.ábra).



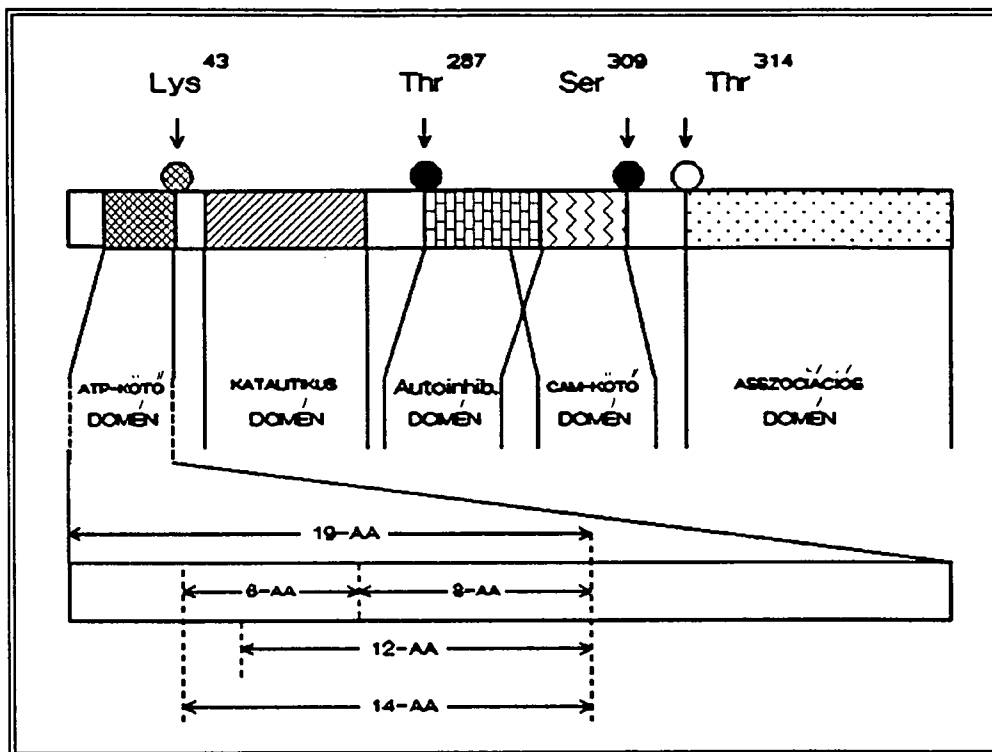
9.ábra. Az ATP-kötő hely hidrofobicitása közel ellentétes az autoinhibitor régiót lezáró foszforilációs helyével.

5.7. Szintetikus peptidok hatása a tisztított CAMK foszforilációjára

Amikor az 50- és 60(58)-kDa-os alegység cDNA szekvenciából kapott aminosav szekvenciát összehasonlítottuk más fehérjék aminosav szekvenciájával azt tapasztaltuk, hogy az N-terminálison található egy konzervatív szekvencia részlet. Ez az ATP-kötő hellyel azonos. Az itt található aminosavak hidrofobicitása ellentétes a Cam-kötő régió autoinhibitor-szekvenciájával. Annak meghatározására, hogy ez a terület hozzákötődhet-e az autoinhibitor szekvenciához, 5 peptidet szintetizáltunk, mely az ATP-kötő régió különböző hosszúságú szakaszait tartalmazta (10.ábra).

A kontroll minta (mely a peptidok helyett TRIS-puffert tartalmazott) foszforilációjának időbeli változása az irodalmi adatokkal megegyező (8,14).

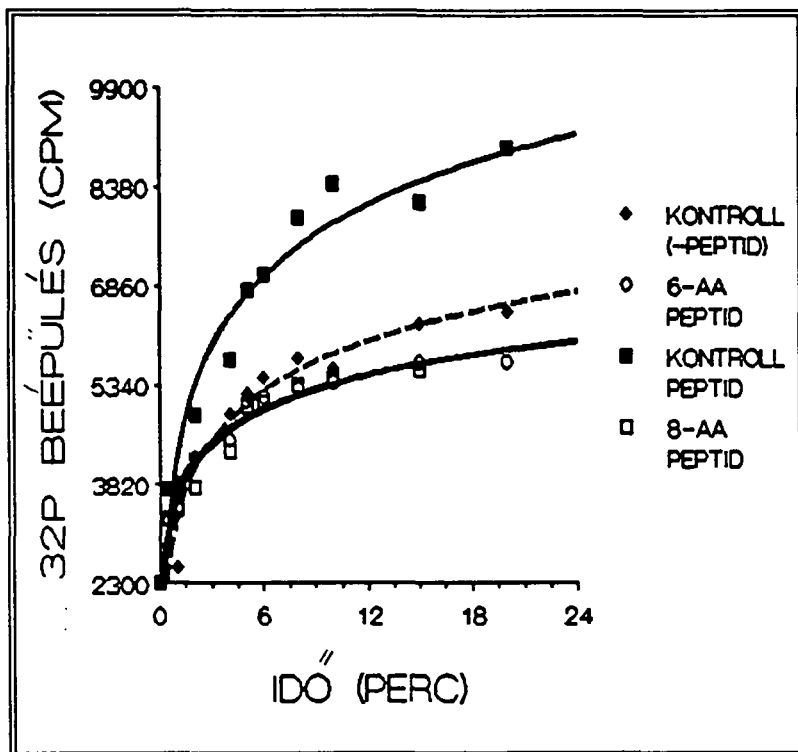
A kontrollhoz képest a 6-, 8-, 12- és 14-AA peptidok hatására csökkent a foszfor beépülést az alegységekbe. Mind a négy peptid esetén 20-25%-os gátlást tapasztaltunk (11.,12. ábra).



10.ábra. A CAMK domén szerkezetének sematikus vázlata (a szekvencia alapján). Körök jelölik a lehetséges foszforilációs helyeket, és az ATP-kötéshez szükséges Lys helyét. A kiemelt részlet a szintetikus peptidek szekvenciában elfoglalt helyét tünteti fel.

Ezzel szemben egy igen érdekes jelenségre figyeltünk fel a 19-AA peptid esetén. Bár szekvenciája magában foglalja az előző négy peptidet, ennek ellenére a foszforilációt kb. 50%-al megnövelte. Hasonlóképpen viselkedett az a peptid, melyet kontrollként kívántuk használni kísérleteinkben (12.ábra).

Megvizsgáltuk azt is, hogy a peptidek különböző koncentrációban hogyan változtatják meg a foszfor beépülését. Mivel a 6, 8 és a 12, 14-AA peptidek hatása hasonló volt ezért csak a 6 és 14-AA peptid és a 19-AA peptid koncentráció függését tüntettük fel. Kétpéres inkubáció során a peptidek alacsony koncentrációban is hatékonyan gátolták a foszfor beépülést. A zérus koncentrációnál a peptidek nélkül tapasztalt foszfát kötést tüntettük fel (13.ábra).

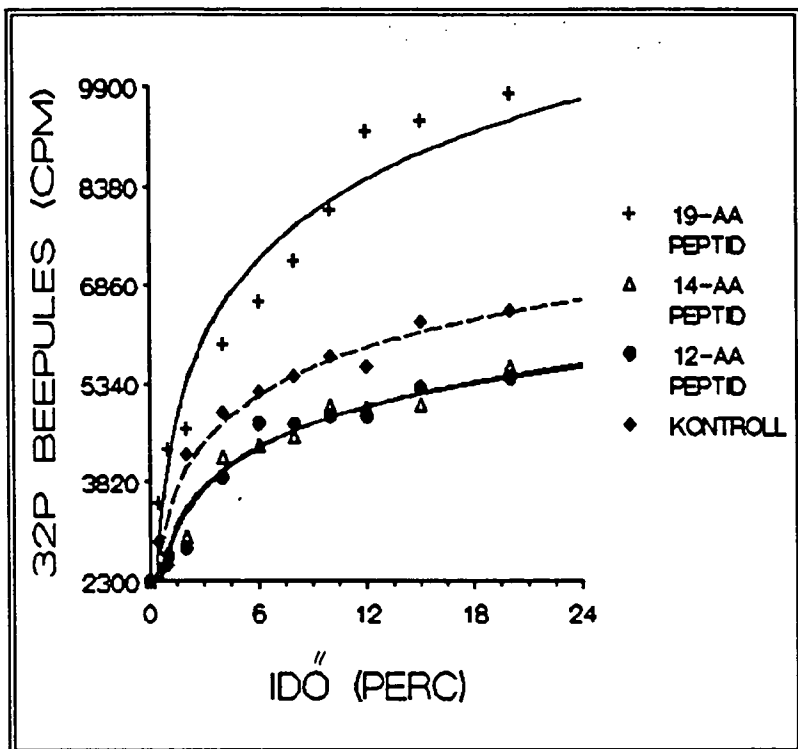


11.ábra. A tisztított CAMK foszforilációját szintetikus peptidekkel (20 μg) meg tudtuk változtatni. Míg a 6- és 8-AA peptidek 20-25%-al gátolták, addig a kontroll peptid 50%-al növelte a foszforilációt.

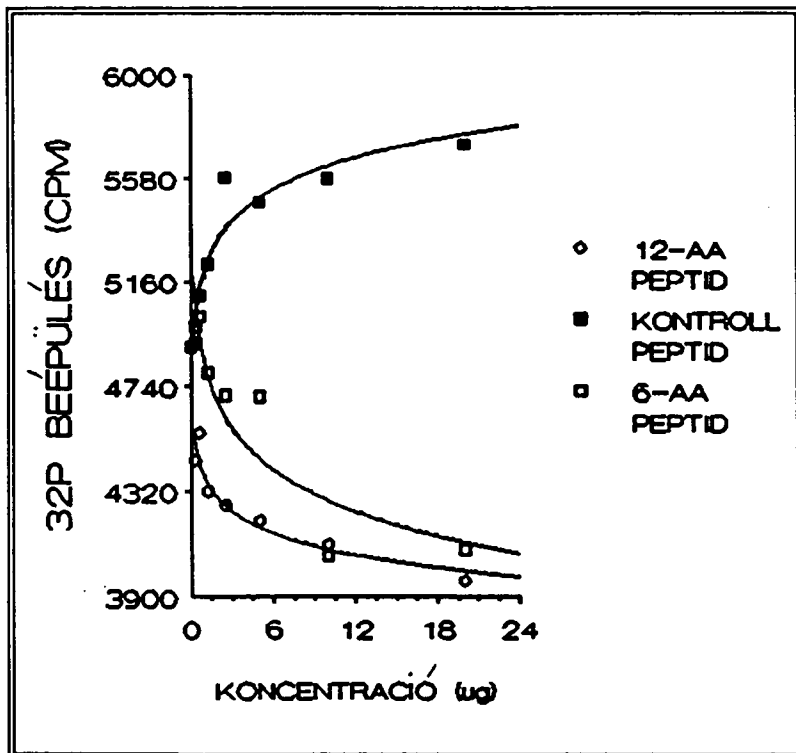
5.8. A peptidek hatása az endogén kináz foszforilációjára

A Ca^{2+} /Cam-függő foszforiláció legjellemzőbb szubsztrátjai az 50- és 58-kDa fehérjék voltak (3.ábra). A szintetikus peptidek ezek foszforilációját változtatták meg legszembetűnőbben (14.ábra). A peptideket (20 μg) a radioaktív foszforral együtt adtuk a homogenizált mintákhoz. Legerősebben a 19-AA peptid majd a 6-aa és valamivel gyengébben a 12- és 14-AA peptidek gátolták a foszfor beépülését. Egyéb fehérjék -melyek feltehetőleg a CAMK szubsztrátjai- foszforilációja is lényegesen lecsökkent, mivel a peptidek meggátolták a kináz autofoszforilációját.

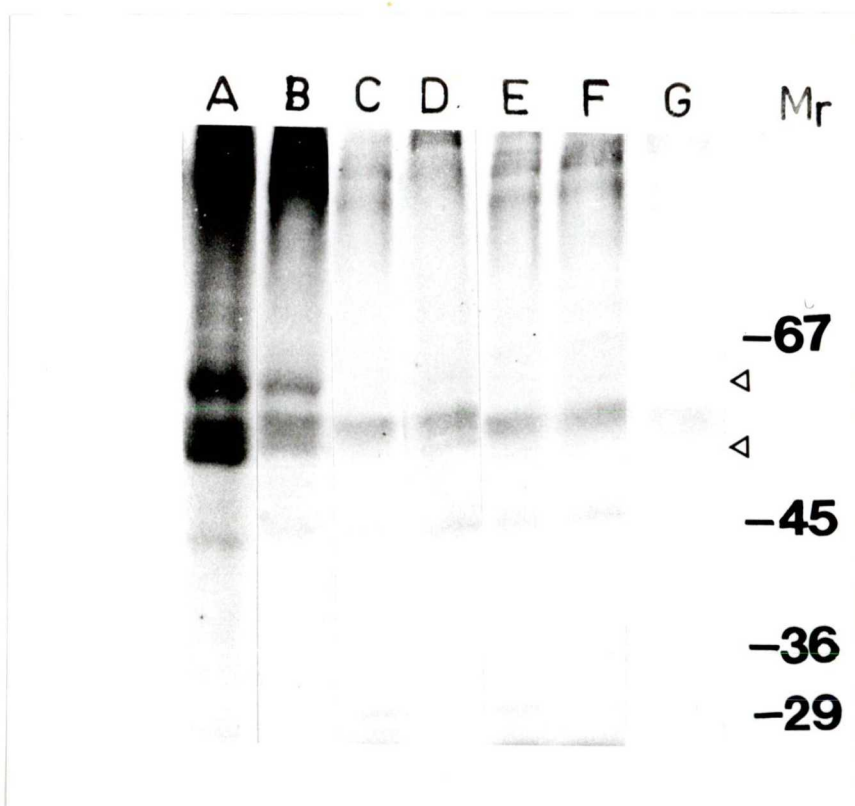
A tisztított kináz vizsgálata során alkalmazott kísérleti körülmények között, a peptidek meggátolták a CAMK autofoszforilációjának időbeli kialakulását (15.ábra).



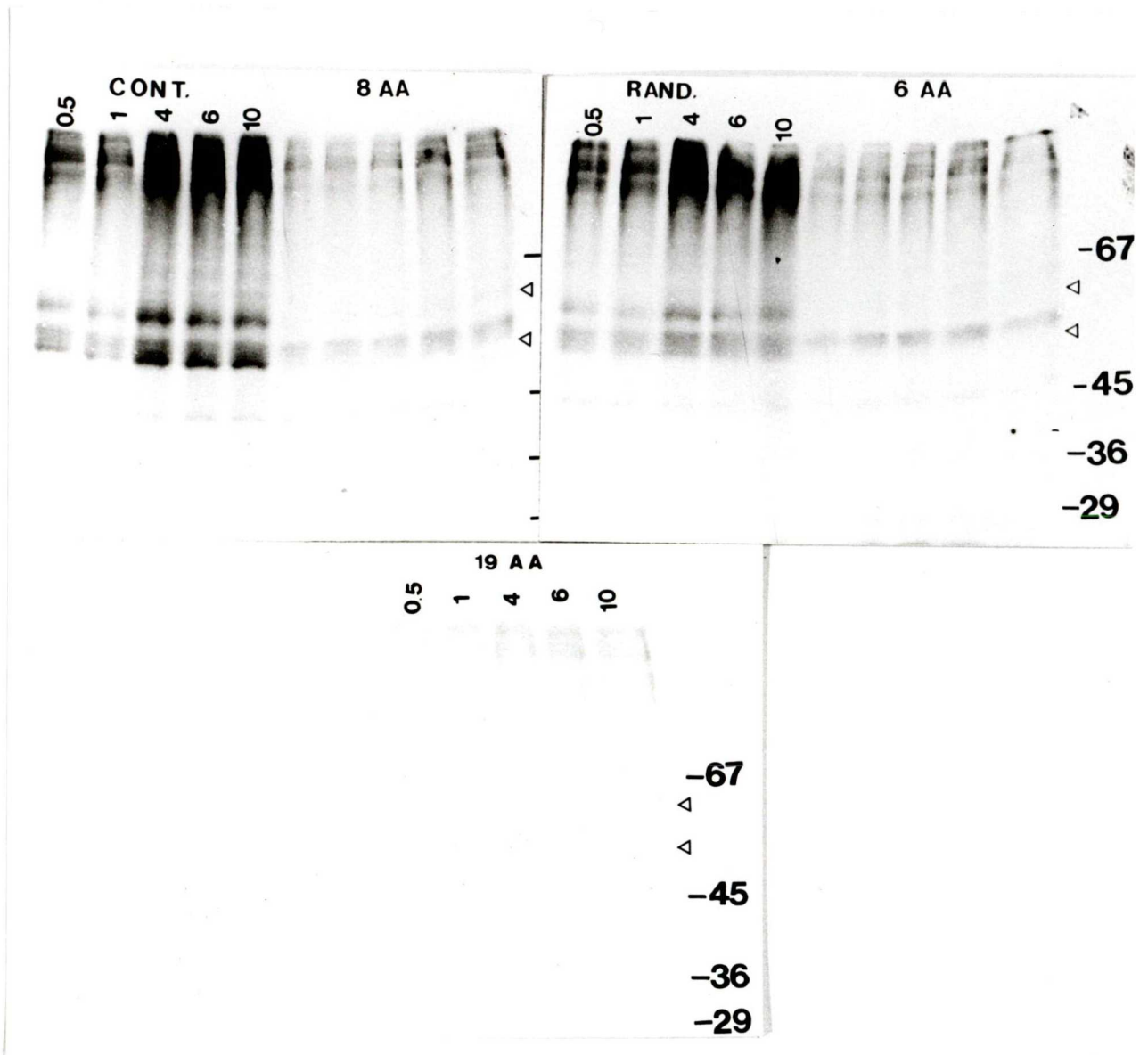
12.ábra. A 12- és 14-AA peptidek, hasonlóan a 6- ill. 8-AA-ashoz, 20-25%-al gátolták a foszfor beépülést. Meglepő a 19-AA-as peptid -kontrolléhoz hasonló- fokozó hatása.



13.ábra. A szintetikus peptidek már alacsony koncentrációban is erősen befolyásolják a tisztított CAMK foszforilációját. Az időfüggő vizsgálatokhoz hasonlóan a 19-AA peptid jelenlétében nőtt a foszforbeépülés. A 6-, 8-, ill. 12- és 14-AA peptidek hatása hasonló volt, ezért az ábrán csak a 6-és 14-AA peptidek hatása van feltüntetve.



14.ábra. Az endogén kináz foszforilációja megváltozott 20 μg szintetikus peptid hatására. A kétperces inkubáció után a legszembetűnőbb változást a nyilakkal jelölt 50- és 60 (58)-kDa fehérjék mutatták, melyek a CAMK α - és β -alegységeivel lehetnek azonosak. A:kontroll, B:kontroll peptid, C:6-AA, D:8-AA, E:12-AA, F:14-AA, G:19-AA,



15.ábra. A foszforiláció időbeli változása során a 6-, 8-, 12- és 14-AA peptidek hasonlóan gátolták a foszforiláció kialakulását, ezért csak a 6-, 8-, 19- és kontroll peptidek hatását mutatjuk be az ábrán. Az M_r markerek pozícióját a jobboldalon tüntettük fel. Az 50- és 60(58) kDa-os foszfoproteinek helyzetét nyilak jelzik.

6.A KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A proteinek foszforilációját alapvető fontosságúnak tartják a másodlagos hírvivők hatásmechanizmusában (70,71, 72). A jelek átvitele az intracelluláris receptorokra a SM-ek koncentrációjának megváltozásán keresztül valósul meg, és ez szigorú szabályozás alatt áll. A ciklikus nukleotidok anyagcseréje egy specifikus enzimpárt, a cikláz és foszfodiészterázt érinti, míg a sejten belüli Ca^{2+} -koncentráció az iontranszport mechanizmuson keresztül szabályozott. A ciklikus nukleotidok koncentrációjának komplex visszacsatoló szabályozása feltehetően a Cam hatására, a cikláz-diészteráz rendszeren keresztül megy végbe (40). A szabályozás még komplikáltabbá vált az endoplazmás retikulumból a hormonok által indukált Ca^{2+} kiáramlás felfedezésével (71). Ez a jelzőrendszer a Ca^{2+} foszfolipid függő kinázzal együtt hat (72), mely párhuzamosan dolgozik a Cam-függő PK-zal (73).

Megkíséreltük leegyszerűsíteni a kölcsönhatás komplexitását a jelzőrendszerek szétválasztott vizsgálatával. Jelen munkánkban, szemben PARDRIDGE és mtsai negatív eredményeivel (38), a patkányagyból tisztított mikropilláris frakcióban SM hatására specifikus fehérjék foszforilációját mutattuk ki. Az eltérő eredmények oka az lehet, hogy van néhány technikai különbség az ő munkájuk és a mi kísérleteink között. Először is, PARDRIDGE és mtsai. (38) borjú agyat használtak, mely vérelemeket tartalmazott, míg mi patkányagyat, amelyet az izolálás előtt perfundáltunk, hogy kimossuk az erekből a vért. A 80- és 86 kDa-os foszfoproteinek, melyek az idegvégződésekre jellemzőek (szinapszin I és II), PARDRIDGE és mtsai.-tól eltérően, hiányoztak a preparátumokból.

A másik fő különbség az, hogy a kontroll mintából EGTA-val eltávolítottuk a Ca^{2+} -ot. Ezáltal jelentősen megnőtt a Ca^{2+} -, valamint a ciklikus nukleotid-függő foszforiláció detektálhatósága. Egy járulékos technikai előny volt a röntgenfilmek denzitásának számítógépes kiértékelése az autoradiográfia után.

Ezekkel a technikai módosításokkal sikerült megadni a patkányagyból preparált jól karakterizált mikropilláris frakcióban, a Cam-, Ca^{2+} /PL-, cGMP-, cAMP-függő foszforiláció első bizonyítékát.

A cGMP erősebb aktivátornak bizonyult, mint a cAMP a más ereken talált



eredményekkel ellentétben (37). A cGMP-függő PK lokalizációjának vizsgálatai során patkányagyban SCHLICHTER és mtsai (74), szintén markáns immunoreaktivitást figyeltek meg az erek simaizomsejtjeiben.

A cGMP- és cAMP-függő kinázok néhány esetben ugyan azokon a szubsztrátokon hatnak (pl. 68-, 66-, 40- és 17 kDa-os fehérjék). Más tanulmányokból ismert (75), hogy az endothelium-függő vazodilatátorok, mint az acetilkolin, a kalcium ionofor A23187, a nitroprusszid, közösen eredményezik a miozin könnyűlánc cGMP-függő foszforilációját és defoszforilációját a patkányagy simaizomsejtjeiben (valószínűleg ez felel meg a 17 kDa-os polipeptidnek saját rendszerünkben). Más vazoaktív anyagok mint a hisztamin (76), szerotonin (77) és a bradikinin (78), permeabilitás növelő hatása többnyire specifikus receptorokon keresztül mediáltak az agykapillárisokban az adenilát-cikláz rendszerhez kötődve. Így, amikor az endothel sejteket vazoaktív anyagokkal stimuláljuk, megfigyelhető a ciklikus nukleotidok számának növekedése: melyek vagy a cirkuláló vérlemezkékből szabadulnak fel, vagy közvetlenül az endothelsejt citoplazmájából (részleteiben lásd 79). Ezek mind a cGMP-, cAMP-függő kinázokon keresztül hatnak és befolyásolni képesek a transzendotheliális transzportot. A 68- és 66 kDa-os ciklikus nukleotid specifikus foszoproteinek összefüggésben lehetnek az acetilkolin nikotinreceptorának γ - és δ -alegységével, melyeket már korábban azonosítottak, mint a cAMP-függő PK szubsztrátjait (80). A cGMP-függő PK-nak van néhány más specifikus protein szubsztrátja, pl. a 33- és 30 kDa-os polipeptid (6. ábra). Nagyon valószínűnek tűnik, hogy valamelyik e kettő közül azonos a DARPP-32 (dopamin és cAMP-regulált foszoprotein) kinázzal, amelyet a cAMP-függő PK foszforilál az agyban (81). A DARPP-32 egyik foszforilációs helyének szekvenciája hasonló, mint amit a foszfatáz inhibitor-1-ben (82), vagy a cGMP-függő PK G-szubsztrátjában (83) találtak ezektől eltérően azonban ez a szekvencia ellent állt a foszfatázoknak, vagyis nem defoszforilálódott.

A szubsztrát-specifitások vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a cGMP-függő enzimek foszforilációs aktivitása szélesebb körű, mint a Cam-függő enzimeké, vagy a PK-C proteolitikus fragmentjéé. Szembetűnő, hogy az 55 kDa-os közös szubsztrát protein mind a PK-C, mind a cAMPfüggő PK hatására kevésbé foszforilálódik mint cGMP hatására (4.ábra).

A PK-C legkarakterisztikusabb szubsztrátja egy 40 kDa-os protein (86), melynek

szerese még nem teljesen tisztázott, de az ismert, hogy szerotonin hatására egy ehhez hasonló molekulatömegű fehérje erőteljesen foszforilálódik (87,88). A polipeptid PK-C-vel mutatott foszforilációs kinetikája lényegesen eltér a ciklikus nukleotidokkal tapasztaltaktól. Az eltérő kinetika felveti azt a kérdést, hogy vajon a különböző SM-ek hatására ugyanaz a polipeptid foszforilálódott-e, és ha igen, vajon ugyanazon a helyen? Mindenesetre a PK-C jelenlétében tapasztalható gyors reverzibilitás arra utal -mint más enzimek esetében már látható volt (86)-, hogy a 40 kDa protein markerként alkalmazható a mikroszkópiás munkákban a transzmembrán szignálok útjának azonosítására az agyi kapillárisokban.

Néhány foszfoproteint közös szubsztrátként azonosítottunk (58(57)-, 55-, 50 kDa-os), melyek mind a négy vizsgált enzim hatására mutatott ^{32}P beépülést. Ezek foszforilációs kinetikája, a hozzáadott SM-től függően, különböző. Általában véve a tanulság az lehet, hogy azok a fehérjék, amelyeket a ciklikus nukleotid-függő kinázok foszforiláltak, nagyon gyorsan elérték a foszforilációs maximumot, de a ^{32}P leadása sokkal lassabb volt, mint amit a Ca^{2+} -függő enzimeknél tapasztalhatunk. A specifikus szubsztrátok foszforilációjának foka a protein-foszfatazok, és a PK relatív aktivitásától függ. Ezeket a foszfatazokat két csoportba sorolhatjuk:

a., azok, amelyek szelektíve defoszforilálják a foszforiláz kináz α - és β -alegységét

b., az un. 2 típusú protein foszfataz, mely a kétértékű kationok hatását gátolja.

Hasonlóan a PK-okhoz a foszfatazok működését is a SM-ek szabályozzák, ahogy azt a DARPP-32 és a protein foszfataz-1 esetében tapasztalták (41).

A protein foszfatazok hatását gátolni is lehet. Kísérleteink tanulsága szerint, ha a NaF-ot -Cam jelenlétében- már az inkubáció kezdő pillanatától a kapilláris homogenizátumhoz adtuk, az így nyert foszforilációs mintázat teljesen véletlenszerűvé vált, nem mutatott semmilyen értelmezhető időfüggést (az adatok nincsenek feltüntetve). Abban az esetben viszont, ha a NaF-ot a foszforilációs maximum elérésekor (4 percnél) adagoltuk, erőteljesen fokozódott a ^{32}P beépülése a szubsztrátokba (jelen esetben a CAMK-ként azonosított alegységekbe; 8. ábra) annak ellenére, hogy EGTA-val a Ca^{2+} -t elvontuk a rendszertől. Ez azt bizonyítja, hogy a foszfatazok hatása is függ a SM-ektől, valamint a szubsztrát-protein foszforilációs állapotától, mint ahogy azt HASHIMOTO és mtsai (84) a CAMK és a calcineurin esetében leírták, valamint azt,

hogy az endogén kináz autofoszforylálódik, és ez, mint azt az irodalomból már ismerjük, létrehoz egy Ca^{2+} /Cam független kináz aktivitást (61-67).

A kapilláris proteinek Cam-függő foszforylációjának áttekintése során ismét érdemes megjegyeznünk, hogy az 58- és 50 kDa-os alegységek, az igen erős Cam függés, az aszimmetrikus kinetikájuk és a kialakuló Ca^{2+} /Cam-független aktivitás alapján, azonosak a CAMK α - és β -alegységével (4. ábra).

Ezeknek a kapilláris enzimeknek az autofoszforylációja (vagy más kinázok hatására kialakuló foszforylációja) a szekvenciában fellelhető, összesen mintegy 30 szerin és treonin aminosav-oldalláncon történhet, amint az MILLER és KENNEDY (85) tisztított CAMK-n végzett kísérleteiből is kiderült. Ezen 30 potenciális foszforylációs hely közül csak néhány tölt be funkcionális szerepet. Mint azt az irodalmi áttekintésben is említettük (15. oldal), az alegységekben két azonosított foszforylációs hely van, melyek a részleges és a teljes Ca^{2+} /calmodulin-független aktivitásért felelősek. Éppen ezért megvizsgáltuk azt, hogy mi történik akkor, ha ezek közül a foszforylációs helyek közül valamelyiket legátoljuk. A kináz feltehetően kaszkád-mechanizmus útján foszforylálódik, mégpedig úgy, hogy a folyamat egyes lépései szigorúan szekvenciális rendet követnek.

Mindezek ismeretében a következő munkahipotézist állítottuk fel: a kináz inaktivitását, azaz az autofoszforylációs kaszkád beindulásának gátlását, egy intramolekuláris blokkoló rendszer végzi az enzimben. Feltételeztük, hogy a gátló hatás a Thr₂₈₆-on keresztül érvényesül, mivel az autofoszforyláció ezen az oldalláncon kezdődik és a foszforylált Thr₂₈₆ felelős a részleges Cam-függetlenség megjelenéséért. A gátló mechanizmus, elképzelésünk szerint, a Thr₂₈₆ (és annak közvetlen környezete) lefedése révén érvényesül: a molekula valahol tartalmaz egy olyan szekvencia részletet, amely specifikusan kötődik ehhez a láncszakaszhoz. Az anti-sense peptidekkel végzett kísérletek tanulsága szerint a komplementer hidropátias profil specifikus kötődést biztosít, olyannyira, hogy ezzel számos hormon receptor-régióját sikerült azonosítani. A CAMK esetében analógiát véltünk felfedezni: itt maga a 'hormon' (a Thr₂₈₆ és környezete) és a 'receptor' (a hozzá kapcsolódó szekvencia) egyazon molekulán belül helyezkedik el. Olyan láncszakaszokat kellett keresnünk, melyeknek ellentétes a hidrofobicitása a Thr₂₈₆-al és közvetlen környezetével (9. ábra). Amennyiben találunk ilyen régiót, melynek hidropátiaja ellentétes -legalábbis közel ellentétes- a 'kódoló' régióval,

akkor ez a szekvencia páros képes lehet az autoinhibitor funkciót betölteni.

A C-terminálisról, az erős hidrofób jellege miatt, azt mondhatjuk, hogy az a holoenzim belsejében van, és az alegységek összekapcsolásában játszik szerepet. Ezért az N-terminális vizsgáltuk alaposabban. Feltűnt, hogy a legjobb illeszkedés a feltételezett ATP-kötő régiónál található. Talán éppen ez okozza azt, hogy a Cam nélkül -vagyis a kontroll mintában- nem képes foszfort (ill. ATP-t) kötni, mint ahogy azt az 4.ábra is bizonyítja. Ezek azt vetítették előre, hogy talán maga az ATP-kötő hely lehet az, mely a kináz inaktív állapotában az autoinhibitor régióhoz, konkrétan a 283-286-nál lévő foszforilációs helyhez kötődik. Ezt az állapotot a SM-ek aktiváló hatása szünteti meg.

Mindezeket a felvetéseket úgy igyekeztünk ellenőrizni, hogy tisztított CAMK-t, melyet prof. Sölingtől kaptunk Göttingenből, Cam és különböző peptidek jelenlétében inkubáltuk. Ezek a peptidek az ATP-kötő régió különböző hosszúságú szekvenciáit tartalmazták (10.ábra).

Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a 6-, 8-, 12- és 14-AA hosszúságú peptidek mind időben, mind különböző koncentrációban kifejezetten gátolták a foszfor beépülését. Annak, hogy kísérleteinkben kb. 25%-os gátlást kaptunk, viszonylag egyszerű statisztikai okai vannak. Mint már említettük, számos szerző utal arra, hogy a két már azonosított foszforilációs helyen kívül létezik egy harmadik is. Így, ha a Thr₂₈₆-t legátoljuk, akkor elméletileg 33%-os maximális gátlást kellene kapnunk. Ezt azonban egyéb faktorok még csökkentik. A várható gátlás végül kb. 20-25 %. Bár a statisztikai számítások igazolni látszanak a kísérleti értékeket, fontos megjegyezni, hogy a Thr₂₈₆-nak tulajdonított kulcsszerep alapján -az autokatalitikus foszforiláció beindulása és a részleges Cam-független aktivitás kialakulása- erősebb gátlást vártunk volna. Nem szabad azonban megfeledkeznünk arról, hogy a proteinek tisztítása során alkalmazott viszonylag durva (de a harmadlagos szerkezetet nem módosító) módszerek -ammóniumszulfátos kicsapások sorozata- a holoenzim széteséséhez vezethet. Ezért az alegységek közötti igen jól szabályozott kooperativitás hatása az autokatalitikus foszforilációra kiesik, illetve az intraholoenzimatikus foszforiláció helyett az egyes különálló alegységek foszforilálják egymást, egy minőségileg más reakciókinetikai mechanizmus útján.

Hogy ez valóban így történhet, azt a kapillárisban található CAMK (endogén

kináz) foszforilációja mutatja (14. 15. ábra). Ha az előzőekben alkalmazott körülményeknek megfelelően a peptidek jelenlétében vizsgáltuk az endogén CAMK foszforilációját, a peptidek - bár egymástól kissé eltérő erősséggel - csaknem teljesen legátolták az α - és β -alegységek foszforilációját.

A négy peptid közül legjobb gátlónak az a 6-AA peptid bizonyult, melynek szekvenciája a feltételezett ATP-kötő hellyel egyezik meg. Az autokatalitikus foszforiláció csaknem teljesen megszűnt.

Az sem kizárt, hogy a változások oka a peptidek specifikitása, hiszen a peptideket a β alegység alapján szintetizáltuk. A két alegység magas homológiája ellenére ez a terület nem teljesen azonos a két alegységben. Ezek szerint a 25%-os gátlás annak köszönhető, hogy csak a β alegységet blokkoltuk le, míg az endogén kináz esetén kapott közel 100%-os gátlás, arra a már mások által is leírt folyamatra utal, mely szerint a β -alegység kitüntetett szereppel bír a kináz autokatalitikus működésében. Ez a holoenzim belüli szabályozó funkciót jelenti, míg az α -alegység 'kiszolgáló' szerepet tölt be. Erre utalnak azok a megfigyelések, melyekben az egyedfejlődés során vizsgálták az alegységek arányának változását, és azt tapasztalták, hogy az autogenezis korai szakaszában csak β -alegység van jelen, majd később fokozatosan az α -ra tevődik át a túlsúly. Márpedig a fejlődés korai szakaszaiban számos olyan folyamat zajlik, mely a későbbiekben döntően befolyásolja az egyedek életét, viselkedését.

Nem szóltunk eddig a 19-AA peptidről, mely magában foglalja mind a négy eddig vizsgált peptidet. Mind kinetikai, mind koncentrációfüggő foszforilációnál ezen peptid hatására a foszforbeépülés szignifikánsan, 50%-kal, megnövekedett. Történt ez akkor, amikor önállóan -kináz nélkül- egyik peptid sem kötött foszfort. (Ez utóbbi azt jelenti, hogy a Cam és a peptidek egymásra hatása nem okoznak olyan változást, amelyek eredményeinket megkérdőjelezhetnék.)

Ezek után teljesen értetlenül álltunk szemben a 19-AA peptidnek az endogén kinázon okozott hatásával, miszerint csaknem 100%-kal gátolta az alegységek foszforilációját. Ennek az ellentétes hatásnak a magyarázatát még nem tudjuk, de a legvalószínűbb az, hogy ez a peptid valamilyen módon szubsztrátja is lehet a kináznak. Tisztított kináz esetén végzett vizsgálatokban nőtt a foszfát beépülés, hiszen mind a foszforilálódott kináz, mind a foszforilálódott peptid felkötődik a méréshez használt korongokra. Endogén CAMK esetén viszont a 19-AA peptid, a kis molekulású fehér-

jékkal és az endogén peptidekkel együtt, a festékfronttal fut a gélekben, így nem tapasztalható növekedés a foszfor beépülésben sem az α -, sem a β -alegység esetén.

Az is elképzelhető, hogy a 19-AA peptid már elég hosszú ahhoz, hogy stabil konformációja legyen, és ez eltérő módon hason az alegységekből álló tisztított kinázra és az endogén holoenzimre.

A peptidek vizsgálatához kezdetben egy 'kontroll'-nak nevezett peptidet használtunk (szekvenciája: Ser-Lys-(Arg)₆). Ezzel azt szeretnénk bizonyítani, hogy nem a peptidszintézis során visszamaradó termékek, szennyeződések okoznak változást. Meglepetésünkre ez a peptid teljesen azonos módon hatott a foszforilációra, mint a 19-AA peptid. Ezekre az eredményekre még nincs egzakt magyarázatunk, de reméljük, hogy jelenleg folyó kísérleteink majd erre a jelenségre is megadják a választ.

Kísérleti adataink alapján egy modellt alkottunk a CAMK működésére. Mielőtt ezt ismertetnénk, röviden összefoglaljuk a már ismert funkcionális szekvenciák elhelyezkedését az aminosav láncban:

	α	β
ATP-kötő régió, mely a lehetséges nukleotid-kötő G-X-G-X-X-S szekvenciát tartalmazza	20-41	21-42
ATP-kötéshez szükséges lizin	42	43
Cam-kötő régió mely tartalmazza az A-R-R-K	289-309	290-310
Cam-kötő helyet és a pszeudoszubsztrát-helyet		
foszforilációs helyek		
részleges Cam-függetlenség	283-286	284-287
teljes Cam-függetlenség	311-314	312-315



A kináz inaktív állapotában a kísérleteinkben feltérképezett ATP-kötő régió hozzákötődik a CAMK autoinhibitor tartományához. Ezzel lefedi a Thr₂₈₆-os foszforilációs helyet, megakadályozva ezzel a foszfor beépülését, másrészt az ATP-kötést is blokkolja (16.1. ábra).

Cam hatására olyan konformáció-változás történik, melynek során az ATP-kötő régió felszabadul (16.2. ábra), és ATP-t köt meg (16.3. ábra). Előbb az N-terminális felé eső foszforilációs hely (Thr₂₈₆), majd a Ser₃₀₉ foszfort vesz fel (16.4. ábra), ennek következtében olyan töltéseltolódás jön létre, mely megakadályozza a ATP-kötő régió visszakötődését és ezáltal a kináz inaktiválódását (16.5. ábra).

A folyamat során az enzim, a Lys₄₃ közreműködésével, ATP-t köt meg. Ha a részleges Ca²⁺/Cam-függetlenségért felelős szekvencia (Thr₂₈₆) eddig még nem foszforilálódott volna meg, akkor ez most biztos megtörténne ezen ATP molekula leadott foszfátjának hatására (intraholoenzimikus foszforiláció), megakadályozva ezzel az ATP-kötő régió ismételt visszakötődését, azaz a kináz inaktiválódását. Így jöhet létre az úgynevezett részleges Ca²⁺/calmodulin-független aktivitás.

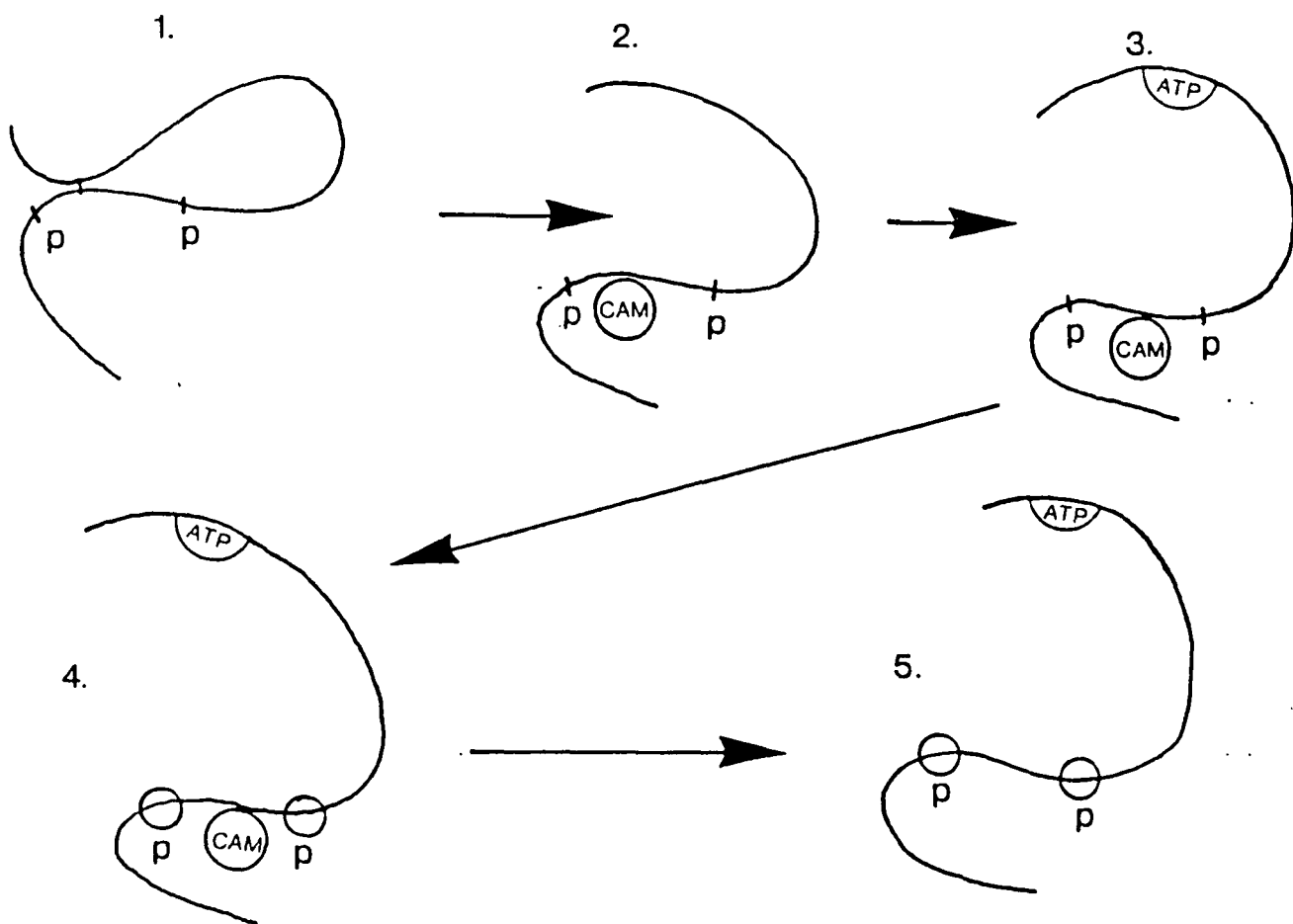
A teljes Cam-függetlenség a Ser₃₁₂ foszforilálódásával alakul ki (feltehetően intraholoenzimikus foszforiláció révén) (16.5. ábra).

Az egész folyamat lényege tulajdonképpen az, hogy az igen rövid Ca²⁺ impulzust a foszforiláció prolongálja, és egy hosszútávú hatást képes létrehozni. Eközben, az autofoszforiláció kialakítása után, a CAMK, szubsztrátjainak foszforilációjával továbbítja azt az 'információt', melyet a sejten kívüli térből kapott.

A szubsztrátok foszforilációja valószínűleg hasonló mechanizmussal megy végbe, mint az intraholoenzimikus foszforiláció. Ahhoz, hogy ez végbemehessen, szükség van szubsztrátfelismerő régióra. Ez a szekvencia hozzákötődik a pszeudoszubsztrát régióhoz (pl.: a miozin könnyű lánc kináz esetén (MLCK)) és blokkolja azt. (A CAMK autoinhibitor tartományát a MLCK-val való összehasonlítás során azonosították.) A foszforiláció az ATP-kötőhely által megkötött nukleotid foszfát csoportjainak egyikéről történhet. Nem elképzelhetetlen, és eredményeink is ezt látszanak megerősíteni, hogy a szubsztrátok felismerését a CAMK esetében -az előbbitől eltérő mechanizmussal- maga a ATP-kötőhely végzi.

A bevezetőben szó volt a memória, a foszforiláció és a CAMK lehetséges kapcsolatáról. Természetesen nem szabad arra gondolni, hogy a kapilláris endothel sejtek

gondolkodnának. Az azonban elképzelhető, hogy bizonyos sejtszintű információkat tárolni tudnak. Hogy ezek a tárolt információk hogyan befolyásolják a sejt életét, működését, még nem tudjuk. Ezekre a választ a most kezdődött in vivo kísérletekből szeretnénk megkapni.



16.ábra. A CAMK működési modellje. 1: inaktív állapotban az ATP-kötő régió összekapcsolódik az autoinhibitor szekvenciával. 2: a Ca^{2+} /Cam komplex ezt a kötést felszabadítja, hozzáférhetővé téve ezzel az ATP- és foszfát-kötőhelyeket. 3: az ATP megkötődik, 4: megtörténik a foszforiláció. 5: az így kialakuló töltésselődés miatt az ATP-kötő régió már nem tud visszakapcsolódni az autoinhibitor szekvenciához.

7.ÖSSZEFOGLALÁS

Az agyszövetekből izolált mikroerek vizsgálata során igazoltuk, hogy a SM rendszer elemei által aktivált legfontosabb -úgynevezett multifunkcionális- proteink kinázok, mint a PK-C, cAMPPK, cGMPPK és a CAMK, jelen vannak preparátumunkban. Ez is bizonyítja, hogy az endothel sejtekben zajló transzportfolyamatok hasonló elveken szabályozódnak, mint bármely más sejt ill. szövettípus működése.

Feltűnően erős foszforilációja miatt felfigyeltünk az 50- ill. 60-(58) kDa fehérjékre, melyek erős calmodulin-függése, aszimmetrikus foszforilációs kinetikája, molekulásúlya és az eredeti szekvenciából szintetizált peptidek hatására bekövetkezett foszforilációs változások alapján a CAMK α - és β -alegységeiként azonosítottunk.

Enzim \ Peptid	6-AA	8-AA	12-AA	14-AA	19-AA	Random
Tisztított	↓ ↓	↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑
Endogén	↓ ↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓	↓

Az irodalomban a kináz több funkcionális területét azonosították, az azonban ismeretlen volt, hogy a kináz inaktív állapotát hogyan lehet értelmezni. Vizsgálatainkban kísérletet tettünk arra, hogy szintetikus peptidek segítségével erre a kérdésre választ adjunk. Eredményeinket röviden a táblázat foglalja össze.

Eredményeink alapján azt állíthatjuk, hogy a CAMK foszforilációját az ATP-kötő régió és az autoinhibitor tartomány közötti kapcsolat szabályozza. Fontos

kiemelnünk, hogy a nukleotid-kötő fehérjék, köztük a protein kinázok, térszerkezetét részletesen tanulmányozták (116,117,118), és kiderült, hogy a ribóz gyűrűt megkötő G-X-G-X-X-G szekvencia egy β lemez- α hélix- β lemez másodlagos szerkezetű régió első β tujére esik. Ez viszont azt jelenti, hogy -amint azt a térszerkezetkutatás egyik alaptétele állítja- ez a szekvenciárészlet a molekula felszínén, az oldószerrel érintkezve helyezkedik el. Ez a tény is bizonyítja, hogy hozzáférhető az autoinhibitor peptidészlet számára.

A szintetikus peptidek hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 19-AA peptid eltérő módon viselkedik a tisztított és a natív enzimmel szemben. Hasonló eredményeket kaptunk a kontrollként használt peptidre is. Ezekre az ellentétes hatásokra még nem ismerjük a pontos választ, de reméljük, hogy jelenleg folyó kísérleteink elvezetnek a helyes megoldáshoz.

Arra, hogy a kináznak szerepe lehet a vér-agy gát transzport-folyamatainak szabályozásában, azok az *in vivo* kísérletek szolgáltatnak adatokat, melyeket dr.Kovács Józseffel (SZOTE Gyermek Klinika) a közelmúltban kezdtünk el. Előkísérleteink szerint a 19-AA peptid rövid idő alatt átjárhatóvá teszi a vér-agy gátat a Na-fluoreszcein számára. Ennek mechanizmusa jelenleg még ismeretlen, de a biztató kezdeti eredmények azt jelzik, hogy esélyünk van a folyamat hátterének felderítésére, és a molekuláris folyamatok megismerésére.

8.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezen a helyen is szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzásegítettek az értekezés elkészüléséhez. Elsőként dr.Oláh Zoltánnak, aki már egyetemi hallgató koromban felkeltette a tudományos kutatómunka iránti érdeklődésemet. Külön hálás köszönettel tartozom Dr.Joó Ferencnek, aki hasznos tanácsaival és útmutatásaival egyetemi hallgató korom óta állandóan mellettem állt, dr.Dux Ernőnek, aki a kapilláris izolálásra megtanított, dr.Párduc Árpádnak, dr.Halász Norbertnek és dr.Szűcs Máriának hasznos szakmai tanácsaikért, Dr.Penke Botondnak, dr.Zsigó Józsefnek és dr.Tóth Gábornak a szintetikus peptidek elkészítéséért. Köszönet illeti Fejes Gábort, Dr.Wollemann Máriát, dr.Bakó Lászlót és Dr.Penke Botondot, akik tanácsaikkal nagy segítségemre voltak az értekezés elkészítésében.

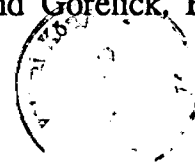
A színvonalas technikai segítséget ezúton köszönöm meg Szerletics Máriának, Czesznak Andrásnak, Mitrov Etelkának és Borka Andrásnak.

IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Olah, Z.; Novak, R.; Lengyel, I.; Dux, E. and Joo, F. (1988), **J.NEUROCHEM.**, 51:49-56
- 2 Browning, M.D.; Hemmings, H.C.Jr. and Greengard, P. (1985), **J.NEUROCHEM.**, 45:11-23
- 3 Hemmings, H.C.; Nairn, A.C.; McGuinness, T.L.; Haganir, R.L. and Greengard, P. (1989), **FASEB.J.**, 3:1583-1592
- 4 Joo, F. and Karnushina, I. (1973), **CYTOBIOS**, 8:41-48
- 5 Kennedy, M.B. and Greengard, P. (1981), **PROC.NATLACAD.SCI.USA**, 78:1293-1297
- 6 Yamauchi, T. and Fujisava, H. (1981), **BIOCH.BIOPHYS.RES.COMM.**, 100:807-813
- 7 Bennett, M.K.; Erondy, N.E. and Kennedy, M.B. (1983), **J.BIOL.CHEM.**, 258:12735-12744
- 8 Schulman, H.; Kuret, J.; Jefferson, A.B.; Nose, P.S. and Spitzer, K.H. (1985), **BIOCHEM.**, 24:5320-5327
- 9 Lisman, J. and Goldring, M. (1988), **PROC.NATLACAD.SCI.USA**, 85:5320-5324
- 10 Vulliet, P.R.; Woodgett, J.R. and Cohen, P. (1984), **J.BIOL.CHEM.**, 259:13680-13683
- 11 Yamauchi, T.; Nakata, H. and Fujisawa, H. (1981), **J.BIOL.CHEM.**, 256:5404-5409
- 12 Garrison, J.C.; Borland, M.K.; Florio, V.A. and Twible, D.A. (1979), **J.BIOL.CHEM.**, 254:7147-7156
- 13 Garrison, J.C.; Johnsen, D.E. and Campanille, C.P. (1984), **J.BIOL.CHEM.**, 259:3283-3292
- 14 Schworer, C.M.; El-Maghrabi, M.R.; Pilgis, S.J. and Soderling, T.R. (1985), **J.BIOL.CHEM.**, 260:13018-13022
- 15 Lindemann, J.P. and Watanabe, A.M. (1985), **J.BIOL.CHEM.**, 260:4516-4525
- 16 Kirchberger, M.A. and Antonez, T. (1982), **J.BIOL.CHEM.**, 257:5685-5691

- 17 Sharma, R.K. and Wang, J.H. (1986), **J.BIOL.CHEM.**, 261:1322-1328
- 18 Karnushina, I.; Toth, I.; Dux, E. and Joo, F. (1980), **BRAIN RES.**, 189:588-592
- 19 Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951), **J.BIOL.CHEM.**, 193:265-275
- 20 Olah, Z. and Kiss, Z. (1986), **FEBS LETT.**, 195:33-37
- 21 Laemmli, U.K. (1970), **NATURE**, 227:680-685
- 22 Pollak, T. (1986), **PH.D. THESIS**,
- 23 Joo, F. (1972), **EXPERIENTIA**, 28:1470-1471
- 24 Joo, F.; Rakonczay, Z. and Wollemann, M. (1975), **EXPERIENTIA**, 32:582-583
- 25 Joo, F.; Temesvari, P. and Dux, E. (1983), **BRAIN RES.**, 278:165-174
- 26 Baca, G.M. and Palmer, G.C. (1978), **BLOOD VESS.**, 15:286-297
- 27 Herbst, T.J.; Raichle, M.E. and Ferrendi, J.A. (1979), **SCIENCE**, 204:330-332
- 28 Nathanson, J.A. (1980), **LIFE SCI.**, 26:1793-1799
- 29 Nathanson, J.A. (1983), **TINS**, 10:422-424
- 30 Nathanson, J.A. and Glaser, G.H. (1979), **NATURE**, 278:567-569
- 31 Karnushina, I.; Palacios, J.M.; Barbin, G.; Dux, E.; Joo, F. and Schwartz, J.C. (1980), **J.NEUROCHEM.**, 34:1201-1208
- 32 Kobayashi, H.; Maorett, T.; Ferrante, M.; Spano, P.F. and Trabucchi, M. (1981), **BRAIN RES.**, 220:194-198
- 33 Palmer, G.C. (1981), **NEUROSCI.L.**, 21:207-210
- 34 Huang, M. and Rorstad, O.P. (1983), **J.NEUROCHEM.**, 40:719-726
- 35 Palmer, G.C. (1981), **NEUROSCIENC.**, 6:2547-2553
- 36 Stefanovich, V. (1979), **NEUROCHEM R**, 4:681-687
- 37 Mackie, K.; Lai, Y.; Nairn, A.C.; Greengard, P.; Pitt, B.R. and Lazo, J.S. (1986), **J CELL PHYS**, 128:367-374
- 38 Pardridge, W.M.; Yang, J. and Eisenberg, J. (1985), **J.NEUROCHEM.**, 45:1141-1147

- 39 Krebs, E.G. (1985), **BIOCHEM.SOC.TRANS.**, 13:813-820
- 40 Cheung, W.Y. (1982), **FEDERATION PROC.**, 41:2253-2257
- 41 Cheung, W.Y. (1980), **CALCIUM AND CELL FUNCTION**, 1:
- 42 Nairn, A.C.; Hemmings, H.C. and Greengard, P. (1985), **ANN.REV.BIOCHEM.**, 54:931-976
- 43 Nairn, A.C.; Bhagat, B. and Greengard, P. (1985), **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, 82:7939-7943
- 44 Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1984), **ARC.BIOCHEM.BIOPHYS.**, 234:89-96
- 45 Goldenring, J.R.; Gonzalez, B.; McGuire, J.S. and DeLorenzo, R.J. (1983), **J.BIOL.CHEM.**, 258:12632-12640
- 46 Payne, M.E. and Soderling, T.R. (1980), **J.BIOL.CHEM.**, 255:8054-8056
- 47 Erondy, N.E. and Kennedy, M.B. (1985), **J.NEUROSCI.**, 5:3270-3277
- 48 Fukunaga, K.; Yamamoto, H.; Matsui, K.; Higashi, K. and Miyamoto, E. (1982), **J.NEUROCHEM.**, 39:1607-1617
- 49 McGuinness, T.L.; Lai, Y. and Greengard, P. (1985), **J.BIOL.CHEM.**, 260:1697-1704
- 50 Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1983), **BIOCH.BIOPHYS.RES.COMM.**, 110:287-291
- 51 Kuret, J. and Schulman, H. (1984), **BIOCHEM.**, 23:5495-5504
- 52 Ahmad, Z.; De Paoli-Roach, A.A. and Roach, P.J. (1982), **J.BIOL.CHEM.**, 257:8348-8355
- 53 Payne, M.E.; Schworer, C.M. and Soderling, T.R. (1983), **J.BIOL.CHEM.**, 258:2376-2382
- 54 Woodgett, J.R.; Davison, M.T. and Cohen, P. (1983), **EUR.J.BIOCHEM.**, 136:481-487
- 55 Iwasa, T.; Inoue, N.; Fukunaga, K.; Isobe, T.; Okuyama, T. and Miyamoto, E. (1986), **ARC.BIOCHEM.BIOPHYS.**, 248:21-29
- 56 Cohn, J.A.; Kinder, B.; Jamieson, J.D.; Delahut, N.G. and Gorelick, F. (1987), **BIOCHEM.BIOPH.A.**, 928:320-331



- 57 Bronstein, J.M.; Wasterlain, C.G. and Farber, D.B. (1988), **J.NEUROCHEM.**, 50:1438-1446
- 58 Kinder, B.; Delahut, N.G.; Jamieson, J.D. and Gorelick, F.S. (1987), **ENDOCRINOL.**, 120:170-177
- 59 Brooks, C.L. and Landt, M. (1985), **ARC.BIOCHEM.BIOPHYS.**, 24:663-673
- 60 Rieker, J.P.; Swaljung-Collins, H. and Collins, J.H. (1987), **J.BIOL.CHEM.**, 262:15262-15268
- 61 DeRiemer, S.A.; Kaczmarek, L.K.; Lai, Y.; McGuinness, T.L. and Greengard, P. (1984), **J.NEUROSCI.**, 4:1618-1625
- 62 Pajfrey, H.C.; Rothlein, J.E. and Greengard, P. (1983), **J.BIOL.CHEM.**, 258:9496-9503
- 63 Bass, M.; Pant, H.C.; Gainer, H. and Soderling, T.R. (1987), **J.NEUROCHEM.**, 49:1116-1123
- 64 Leonard, D.S.; Wall, J.B.; Pugh, P.C. and Kennedy, M.B. (1987), **SOC.NEUROSCIABSTS.**, 13:559
- 65 Hanley, R.M.; Means, A.R.; Ono, T.; Kemp, B.E.; Burgin, K.E.; Waxham, N. and Kelly, P.T. (1987), **SCIENCE**, 237:293-297
- 66 Kelly, P.T.; Shields, S.; Conway, K.; Yip, R. and Burgin, K. (1987), **J.NEUROCHEM.**, 49:1927-1940
- 67 Kennedy, M.B.; Bennett, M.K. and Erondy, N.E. (1983), **PROC.NATLACAD.SCI.USA**, 80:7357-7361
- 68 Crick, F. (1973), **NATURE**, 312:101
- 69 Lisman, J. (1985), **PROC.NATLACAD.SCI.USA**, 82:3055-3057
- 70 Greengard, P. (1978), **SCIENCE**, 199:146-152
- 71 Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984), **NATURE**, 312:315-321
- 72 Nishizuka, Y. (1986), **SCIENCE**, 233:305-312
- 73 Berridge, M.J. (1984), **BIOTECH.**, 6:541-546
- 74 Schlichter, D.J.; Detre, J.A.; Asward, D.W.; Chehrazi, B. and Greengard, P. (1980), **PROC.NATLACAD.SCI.USA**, 77:5537-5541

- 75 Rapoport, R.M.; Drazin, M.B. and Murad, F. (1983), **NATURE**, 306:174-176
- 76 Dux, E. and Joo, F. (1982), **EXP.BRAIN RES.**, 47:252-258
- 77 Olesen, S.P. (1985), **J.PHYSIOL.**, 361:103-113
- 78 Unterberg, A.; Wahl, M. and Beathmenn, A. (1984), **JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM**, 4:574-585
- 79 Joo, F. (1986), **NATURE**, 321:197-198
- 80 Huganir, R.L. and Greengard, P. (1983), **PROC.NATLACAD.SCI.USA**, 80:1130-1134
- 81 Ouimet, C.C.; Miller, P.E.; Hemmings, H.C.; Walaas, S.I. and Greengard, P. (1984), **J.NEUROSCI.**, 4:111-124
- 82 Nimmo, G.A. and Cohen, P. (1978), **EUR.J.BIOCHEM.**, 87:341-351
- 83 Hemmings, H.C.Jr.; Williams, K.R.; Konigsberg, W.H. and Greengard, P. (1984), **J.BIOL.CHEM.**, 259:14486-14490
- 84 Hashimoto, Y. and Soderling, T.R. (1989), **J.BIOL.CHEM.**, 264:16524-16529
- 85 Miller, S.G. and Kennedy, M.B. (1986), **CELL**, 44:861-870
- 86 Nishizuka, Y.; Takai, Y.; Kishimoto, A.; Kikkawa, U. and Kaibuchi, K. (1984), **REC.PROG.HORM.RES.**, 40:301-341
- 87 Lyons, R.M.; Stanford, N. and Majerus, P.W. (1975), **J.CLIN.INVEST.**, 56:924-936
- 88 Haslam, R.J. and Lynham, J.A. (1977), **BIOCH.BOIPHYS.RES.COMM.**, 77:714-722
- 89 Lin, C.R.; Kapiloff, M.S.; Durgerian, S.; Tatemoto, K.; Russo, A.F.; Hanson, P.; Schulman, H. and Rosenfeld, M.G. (1987), **PROC.NATLACAD.SCI.USA**, 84:5962-5966
- 90 Bennett, M.K. and Kennedy, M.B. (1987), **PROC.NATLACAD.SCI.USA**, 84:1794-1798
- 91 Hanks, S.K.; Quinn, A.M. and Hunter, T. (1986), **SCIENCE**, 241:42-45
- 92 Bulleit, R.F.; Bennett, M.K.; Molloy, S.S.; Hurley, J.B. and Kennedy, M.B. (1988), **NEURON**, 1:63-72

- 93 Payne, M.E.; Fong, Y.L.; Ono, T.; Colbran, R.J.; Kemp, B.E.; Soderling, T.R. and Means, A.R. (1988), **J.BIOL.CHEM.**, 263:7190-7195
- 94 Hanley, R.M.; Means, A.R.; Kemp, B.E. and Shenolikar, S. (1988), **BIOCH.BOIPHYS.RES.COMM.**, 152:122-128
- 95 Blumenthal, D.K.; Charbonneau, H.; Edelman, A.M.; Hinds, T.R.; Rosenberg, G.B.; Storm, D.R.; Vincenzi, F.F.; Beavo, J.A. and Krebs, E.G. (1988), **BIOCH.BOIPHYS.RES.COMM.**, 156:860-865
- 96 Lukas, T.J.; Burgess, W.H.; Prendergast, F.G.; Lau, W. and Watterson, M. (1986), **BIOCHEM.**, 25:1458-1464
- 97 Kelly, P.T.; Weinberger, R.P. and Waxham, M.N. (1988), **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, 85:4991-4995
- 98 Kemp, B.E.; Pearson, R.B.; Guerriero, V.jr.; Bagchi, I.C. and Means, A.R. (1987), **J.BIOL.CHEM.**, 262:2542-2548
- 99 Kennelly, P.J.; Edelman, A.M.; Blumenthal, D.K. and Krebs, E.G. (1987), **J.BIOL.CHEM.**, 262:11958-11963
- 100 Colbran, R.J.; Fong, Y.L.; Schworer, C.M. and Soderling, T.R. (1988), **J.BIOL.CHEM.**, 263:18145-18151
- 101 Lai, Y.; Nairn, A.C.; Gorelick, F. and Greengard, P. (1987), **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, 84:5710-5714
- 102 Pearson, R.B.; Wettenhall, R.N.H.; Means, A.R.; Hartshorne, D.J. and Kemp, B.E. (1988), **SCIENCE**, 241:970-973
- 103 Thiel, G.; Czernik, A.J.; Gorelick, F.; Nairn, A.C. and Greengard, P. (1988), **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, 85:6337-6341
- 104 Schworer, C.M.; Colbran, R.J. and Soderling, T.R. (1986), **J.BIOL.CHEM.**, 261:8581-8584
- 105 Walaas, S.I.; Lai, Y.; Gorelick, F.S.; DeCamilli, P.; Moretti, M. and Greengard, P. (1988), **MOL.BRAIN RES.**, 4:233-242
- 106 Bronstein, J.M.; Farber, D.B. and Wasterlain, C.G. (1986), **FEBS LETT.**, 196:135-138
- 107 Lou, L.L.; Lloyd, S.J. and Schulman, H. (1986), **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, 83:9497-9501
- 108 Bost, K.L.; Smith, E.M. and Blalock, J.E. (1985), **BIOCH.BOIPHYS.RES.COMM.**, 128:1373-1380

- 109 Blalock, J.E. and Smith, E.M. (1984), **BIOCH.BIOPHYS.RES.COMM.**, 121:203-207
- 110 Shai, Y.; Flashner, M. and Chaiken, M.I. (1987), **BIOCHEM.**, 26:669-675
- 111 Mulchahey, J.J.; Neill, D.J.; Dion, L.D.; Bost, K.L. and Blalock, J.E. (1986), **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, 83:9714-9718
- 112 Elton, J.S.; Dion, L.D.; Bost, K.L. and Blalock, J.E. (1988), **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, 85:2518-2522
- 113 Bost, K.L.; Smith, E.M. and Blalock, J.E. (1985), **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, 82:1372-1375
- 114 Fassina, G.; Roller, P.P.; Thorgeirsson, S.S. and Omichinski, J.G. (1989), **J.BIOL.CHEM.**, 264:11252-11257
- 115 Blalock, J.E. and Bost, K.L. (1986), **BIOCHEM.J.**, 234:679-683
- 116 Markus, G.; Tritsch, G.L. and Perthasarathy, R. (1989), **ARC.BIOCHEM.BIOPHYS.**, 272:433-439
- 117 Bork, P. and Grunwald, C. (1990), **EUR.J.BIOCHEM.**, 191:347-358
- 118 Rossmann, M.G.; Moras, D. and Olsen, K.W. (1974), **NATURE**, 250:194-199

