

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A GLUTATION, A NITROZOGLUTATION ÉS A CISZTEIN
NEUROMODULÁTOR ÉS NEUROTRANSMITTER
SZEREPE A KÖZPONTI IDEGRENDSZERBEN**

HERMANN ANDRÁS

TÉMAVEZETŐ: Prof. Dr. VARGA VINCE

**DEBRECENI EGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATANATÓMIAI ÉS ÉLETTANI TANSZÉK**

**UNIVERSITY OF TAMPERE
MEDICAL SCHOOL
BRAIN RESEARCH CENTER**

DEBRECEN, 2002

BEVEZETÉS

Az idegrendszer elemi egysége a neuron, amely elektromos jeleket használ a sejtek közötti kommunikációban. Az interneuronális kommunikáció speciális sejt-sejt közötti kapcsolatokon, a szinapszisokon keresztül valósul meg. Az emlősök idegrendszerében az információátadás kémiai szinapszisok révén játszódik le. Inger hatására a preszinaptikus neuron ingerületátvivő anyagokat szabadít fel, amelyek a posztzinaptikus membrán integráns fehérjéi, a receptorok közvetítésével váltják ki a sejtválaszt a posztzinaptikus neuronban.

A kémiai transzmisszió során a klasszikus neurotranszmitterek mellett (acetilkolin, katekolaminok) aminosavak, peptidek, a gáz halmazállapotú nitrogén-monoxid (NO) és a szén-monoxid (CO) is részt vehetnek a sejtek közti információátvitelben. Az emlősök központi idegrendszerében az aminosav típusú transzmitterek játszá a legfontosabb szerepet. A célsejtekre gyakorolt hatásuk alapján serkentők és gátlók lehetnek. Serkentő transzmitterként a glutaminsav és az aszparaginsav, a legfőbb gátlóként a γ -aminovajsav (GABA) működik. A glicin az agytörzsben és a gerincvelőben a GABA-hoz hasonlóan gátló mediátor, azonban a központi idegrendszer más, filogenetikailag fiatal agyrégióiban a glutaminsav hatását potencírozva serkentő funkciót tölt be.

Aminosaverg receptorok a központi idegrendszerben

Az idegvégződésekből felszabaduló glutamát és aszpartát pre- és posztzinaptikus hatásait a plazmamembránok integráns részét képező ionotrop és metabotrop receptorok közvetítik, amelyek száma és affinitása agyterületenként és sejtípusonként más és más. Farmakológiai, elektrofiziológiai és molekulárbiológiai eredmények alapján mindkét típusú receptorcsalád további altípusokra osztható fel. Az ionotrop receptorcsaládba tartoznak a specifikus ligandjaikról elnevezett N-metil-D-aszpartát- (NMDA), a kainát- (KA) és az α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionát- (AMPA) receptorok, melyek aktiválása a receptor-ionofór-csatornán keresztül többnyire depolarizációt és helyi membránpotenciál-változásokat okoz. A receptorfehérjék intracelluláris doménjén keresztül, a citoplazmatikus fehérjékkel kölcsönhatva számos jelátviteli mechanizmust indíthatnak el. A metabotrop receptorok az intracelluláris G-proteinekhez kapcsoltan az inozitolfoszfat, a cAMP és más intracelluláris hírvivő molekulákon keresztül lassúbb, de hosszabban tartó változásokat generálnak a posztzinaptikus sejtekben.

A glutamáterg neurotranszmisszió szerepe az idegrendszerben

Számos központi idegrendszeri idegpálya ingerületátvivő anyaga a glutaminsav vagy az aszparaginsav, így pl. a cortico-striatalis, a felszálló spinocerebellaris, az entorhinal-hippocampalis, valamint a corticalis, hippocampalis pályák a különböző hypothalamicus, thalamicus, agytörzsi dúcokhoz. Mai ismereteink alapján a serkentő glutamáterg transzmisszió az emlősök idegrendszerében szerepet játszik az ideg- és a gliasejtek differenciálódásában és növekedésében, az interneuronális kapcsolatok kialakításában, az érző információk feldolgozásában, az agy éber állapotának fenntartásában, a mozgáskoordinációban, a megismerési, a tanulási és a memória-folyamatokban, valamint az érzelmi reakciókban, mint pl. a szorongás vagy a stressz. A fentiek alapján nyilvánvaló tehát, hogy a glutamáterg transzmisszióban bekövetkező kóros elváltozás az életfunkciók és a magasabbrendű idegtevékenység zavarát idézi elő. Az idegsejtek aktivitását a transzmitterek által létrehozott ingerlő és gátló hatások eredője határozza meg. Az ingerlés-gátlás egyensúlyának tartós felborulása kóros állapotokhoz és végül sejtpusztuláshoz is vezethet. Az extracelluláris glutamát koncentrációjának fiziológias szintet meghaladó emelkedése a glutamáterg végkészülékek és neuronok túlzott aktiválásával excitotoxikussá válhat (pl. akut agyi iszkémiás és hipoglikémiás állapotokban). Szintén szerepet tulajdonítanak a glutamátnak a krónikus neurodegeneratív kórképek, így az epilepszia, a skizofrénia, a Parkinson-kór, az Alzheimer-kór, a Huntington-betegség, az olivo-pontocerebelláris atrofia és az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) patogenezisében is.

A glutamáterg transzmissziót szabályozó vegyületek

A nitrogén-monoxid

Az NO olyan atipikus neuromodulátor/neurotranszmitter molekula, amely hatását nem a szokásos transzmissziós folyamat révén fejti ki. Nem szinaptikus vezikulákban tárolódik és szállítódik, hanem diffúzióval jut el a képződés helyéről a hatás helyéhez és élettideje nagyon rövid. Az idegsejtekben a nitrogén-monoxid-szintáz (neuronális NOS, nNOS) segítségével képződik L-argininből. Az NMDA-receptorok aktiválása fokozott NO-termeléssel jár a központi idegrendszerben. Az nNOS-t tartalmazó idegsejtek magasabb koncentrációban tartalmazzak NMDA-receptor-alegységeket, mint az azonos agyterületen a NOS-t nem tartalmazó idegsejtek. Az nNOS a posztzinaptikus sejtek szinaptikus régiójában halmozottan

az NMDA-receptorok közelében helyezkedik el. Mindezek az NMDA-receptor és az nNOS szoros funkcionális kapcsolatát támasztják alá.

Az NO hatásmechanizmusa nagyon összetett, nincs specifikus receptora, hatását többnyire a guanilát ciklázon keresztül fejt ki, de a molekula oxidációs állapotától [nitrozóniumion (NO^+), illetve nitroxilion (NO^-)] függően transznitrozilációs, illetve toxikus reakciókban vehet részt. Az NO különböző szabadgyökökkel reagálva reaktív intermediereket hozhat létre, és toxikussá válhat. Módosíthatja a neurotranszmisszió szinte valamennyi lépését; a transzmitterek felszabadulását, visszavételét. Befolyásolhatja a szinapszisok kialakulását, funkcionális megerősítését, a szinaptikus plaszticitást, az agy fejlődését. Részt vehet a tanulási folyamatok alapjául szolgáló hosszútávú megerősítő (LTP) és gátló folyamatokban (LTD), a szöveti károsodást kísérő hosszantartó fájdalom fenntartásában. A nitrozilációs folyamatok révén módosíthatja a fehérjék funkcióját, pl. a redox modulációs helyeken keresztül az NMDA-receptorok aktivitását, de a nitrozoglutation képződésében is szerepet játszik.

A glutation

A glutamáterg ingerületátvitel szabályozásában az NO és az aminosavak mellett más, pl. kis molekulatömegű peptidek is részt vesznek. Számos neuroaktív aminosavat tartalmazó endogén di- és tripeptidet izoláltak az agyszövetből. Ezek a peptid-mediátorok ugyanazon neuronban gyakran a klasszikus transzmitterekkel együtt, de más-más típusú vezikulákban találhatók meg. Depolarizáció során felszabadult peptid kotranszmitterek a klasszikus transzmitterek hatását erősíthetik a célsejten.

Az endogén tripeptid γ -glutamil-ciszteinil-glicin (GSH) filogenetikailag az egyik legősibb peptid, amely szinte minden sejtben megtalálható. Szöveti koncentrációja 1-4 mM, aminek 95%-a redukált formában van jelen a központi idegrendszerben. A GSH az öt felépítő aminosavakból a γ -glutamil ciklusban szintetizálódik. A tripeptid szintézisét a γ -glutamilcisztein-szintetáz és a glutation-szintetáz katalizálja. A glutation lebontását aminosavakká szintén e ciklus enzime, a γ -glutamil-transzferáz (γ -GT) végzi. A GSH mint antioxidáns szabadgyökökkel reagálhat, és védi a sejtet a radioaktív- és az UV-sugárzástól, valamint az oxidatív stressz okozta károsodásoktól. A GSH számos enzim kofaktora vagy szubsztrátja. A glutation-S-transzferáz (GST) által katalizált konjugációs reakciókban xenobiotikumokhoz kötődve elősegíti azok eltávolítását a szervezetből. Szabályozza a

sejtciklust, valamint a sejtm metabolizmust. Mindezek mellett a GSH-t felépítő három aminosav mindegyike neuroaktív. A peptid neuronból és asztorcitából is felszabadulhat, így neuromodulátor és neurotransmitter szerepet is betölthet a központi idegrendszerben.

A glutation neuromodulátor szerepe

A GSH a glutamáterg receptorok agonista és antagonistá ligandum kötőhelyeivel is kölcsönhat. Mivel maga a GSH és S-alkil származékai egyaránt hatásosan gátolják a glutamát-receptor ligandumok kötődését, ezért feltehető, hogy γ -glutamil oldalláncának van kitüntetett szerepe a peptid-receptor interakcióban. Funkcionális tesztek alapján a GSH koncentrációjától függően agonista, illetve antagonistá szerepet is betölthet. Szövetkultúrában pl. az NMDA-val kiváltott neuronális Ca^{2+} -áramot bifázisos módon befolyásolja. Mikromólos koncentrációban csökkenti, millimólos koncentrációban pedig fokozza azt. E két ellentétes hatás azáltal jöhet létre, hogy a peptid csökkenti az NMDA-receptor agonista ligandumok kötődését, magasabb koncentrációban viszont a receptor funkcionális tiolcsoportjainak redukálása révén fokozhatja a Ca^{2+} -felvételt. A nem-NMDA-receptorok közül a GSH nagyobb affinitással kötődik az AMPA-, mint a kainát-receptorokhoz. A specifikus ligandumok receptorkötődésének kinetikai analízise arra utal, hogy a peptid az aminosav oldalláncok révén allosztérikusán is módosíthatja a receptorok működését. Befolyásolja a glutamát felszabadulását és felvételét is, így a peptid neuromodulátor szerepet tölthet be a serkentő glutamáterg neurotranszmisszió szabályozásában.

A GSH lehetséges neurotransmitter szerepe

A GSH agyszövetszeleten Na^{+} -függő depolarizációt vált ki, amit sem az NMDA-, sem pedig a nem-NMDA receptor ligandumok, antagonisták nem befolyásolnak. Mindez arra utal, hogy a peptid olyan receptor(ok)on keresztül fejti ki e hatását, amely(ek) nem azonos(ak) az eddig ismert egyetlen ionotrop glutamát-receptorral sem. Mindemellett triciált GSH-val végzett receptorkötődési eredmények is arra utalnak, hogy a GSH nemcsak a glutamát-receptorokkal képes kölcsönhatásba lépni. Ennek bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel.

A nitrozoglutation

Az NO mint neurotranszmitter vagy neuromodulátor a képződés helyéről a koncentrációgradiensnek megfelelően könnyen diffundál a sejtmembránon keresztül. Az NO közvetlenül reakcióba léphet fehérjék és peptidek cisztein-oldalláncával, a vas-hemmel, a szuperoxid anionnal és az oxigénnel. Mivel félélettideje nagyon rövid, gyorsan inaktiválódik. Ezért már korábban feltételezték, hogy az NO hatásának kifejtéséhez olyan intermedier szükséges, ami meghosszabbítja az NO élettidejét és azt a célsejtekhez szállítja. Valószínűleg a sejtekben ezt a funkciót a nitrozotiolok látják el. Az NO kötött formában legnagyobb mennyiségben nitrozotiolok, főleg S-nitrozoprotein és nitrozoglutation (GSNO) formájában van jelen. Mivel az ideg- és gliasejtek GSH-koncentrációja magas, ezért az NO ezekben a sejtekben is nagy eséllyel reagálhat GSH-val. Bizonyított, hogy a központi idegrendszerben is képződik GSNO, így az NMDA-receptor aktivációját követően extra- és intracellulárisan is képződhet GSNO. Feltételezzük, hogy a GSNO a GSH-hoz hasonlóan felszabadulhat idegsejtekből, illetve az extracellulárisan képződött GSNO közvetlenül kapcsolódhat extracelluláris fehérjékhez, így a glutamát-receptorokhoz is.

A cisztein

A cisztein a fehérjék és számos biológiailag aktív endogén peptid építőeleme, és prekursora a glutationnak is. Inorganikus szulfátot szolgáltat a detoxifikációs reakciókhoz. Számos irodalmi adat azt támasztja alá, hogy a cisztein neuroaktív aminosav. A cisztein agyszövetből depolarizációval Ca^{2+} -függő módon felszabadul, és neuronokon NMDA-szerű hatással rendelkezik. Magasabb koncentrációban azonban in vitro és in vivo neurotoxikus. Az L-cisztein agyi iszkémiában nagy mennyiségben főleg a gliából kerülhet az extracelluláris térbe, a glutation felszabadulását és hidrolízisét követően. Ilyen esetben a cisztein viszonylag nagy agyterületeken gyorsan kialakuló idegsejt-károsodást hozhat létre. Neurotoxikus hatását feltehetően az NMDA-receptorokon fejti ki. Excitotoxikus hatása miatt fontos szerepe lehet neurológiai kórképek patogenezisében (amiotrófiás laterálszklerózis (ALS), Parkinson- és Alzheimer-kór, Hallervorden-Spatz-betegség, hipoxiás, iszkémiás sérülések). Az azonban nem ismeretes, hogy milyen mértékben vesz részt ezeknek a betegségeknek a kialakulásában, továbbá idegsejt-károsító hatásának pontos mechanizmusa sem.

CÉLKITŰZÉSEK

A GSH általános szabadgyök-fogó molekula, számos redox reakcióban és detoxifikáló mechanizmusban vesz részt, amelyek révén fontos sejtvédő funkcióval rendelkezik. A központi idegrendszerben az ionotrop glutamáterg receptorokkal kölcsönhatva az intercelluláris jelátvitel módosításával számos élettani folyamatot modulálhat. A GSH reagálhat a rövid életű, gáz halmazállapotú neuromodulátor/neurotranszmitter NO-val, és glutation-nitrozotiol (GSNO) képződhet, így befolyásolhatja a glutamáterg transzmissziót is. Ehhez azonban bizonyítani kell, hogy a GSNO kölcsönhat a glutamáterg receptorokkal. Elektrofiziológiai és biokémiai adatok arra is rámutatnak, hogy a GSH nemcsak a glutamáterg receptorokkal képes kölcsönhatni, hanem más, talán saját receptorán keresztül is befolyásolhatja az idegsejtek működését. Nincs azonban megnyugtatóan bizonyítva a GSH-receptor létezése. Nem ismert a feltételezett glutationreceptorok szerkezete és működése sem. Nincs kellően karakterizálva a receptorfehérje és a GSH-ligandum kölcsönhatása. Az sem tisztázott, hogy a GSH-t alkotó cisztein hogyan és miért fejt ki toxikus hatást a központi idegrendszerben.

Ezért az alábbi kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

- 1. Szerepet játszhat-e a GSH és az NO reakciója során keletkező endogén nitrozoglutation az ionotrop glutamáterg receptorok szabályozásában?*
- 2. Jelen vannak-e a feltételezett GSH kötőhelyek az agykérgi szinaptikus plazmamembránban és azok hogyan jellemezhetők?*
- 3. Kölcsönhatnak-e az ionotrop és metabotrop glutamáterg receptorok ligandumai a feltételezett glutationreceptorral?*
- 4. Kölcsönhat-e a GSNO a feltételezett glutationreceptorokkal?*
- 5. A GSH-molekulában található aminosavak közül melyik/ek játszik/ának szerepet a peptid és a receptor kölcsönhatásában?*
- 6. A receptorfehérje mely aminosav-oldalláncai vesznek részt a receptor és a peptid kölcsönhatásában?*
- 7. Hogyan befolyásolja a glutation e saját feltételezett receptoraihoz való kötődését a membránproteinek ciszteinil-oldalláncainak redox állapota?*
- 8. Miként fejt ki az L-cisztein idegsejt-károsító hatását?*

- a.) Befolyásolja-e az ionotrop glutamát receptorok aktiválásával kiváltott neuronális választ?*
- b.) A cisztein tiolcsoportjának redukáló és fémionokat komplexáló sajátossága szerepet játszik-e az ionotrop glutamát receptorok által közvetített neurotoxicitásban?*

A FELHASZNÁLT MÓDSZEREK

Preparatív eljárások

A kötődésvizsgálatokban felhasznált szinaptikus plazmamembrán preparálásához vágóhídi sertések agykérgét használtuk fel. A Ca^{2+} -felvétel vizsgálathoz és az intracelluláris Ca^{2+} -szint méréséhez kisgyi szemcsesejteket 7 napos Wistar patkányok agyából tenyésztettünk.

Az agyhomogenizátumból durva szinaptikus plazmamembránt (P2) preparáltunk. A posztszinaptikus plazmamembrán előállításához szacharóz-grádiens centrifugálást használtunk.

A szinaptikus plazmamembrán oldalláncain kémiai módosítást végeztünk. A cisteinil-oldalláncokat 5'5-dithio-nitrobenzoesavval (DTNB), 4,4-dithiodipiridinnel (DDP), N-etilmaleimiddel (NEM) és fenil-izotiocianáttal (PITC) módosítottuk. A diszulfidhidak redukálásához dithiotreitol (DTT) használtunk.

A szinaptikus plazmamembránok arginil-oldalláncainak kémiai módosítása fenilglioxállal (PGO) történt.

A glutamil- és aszpartil-oldalláncok módosítását etil-dimetil-aminopropil-karbodimiddel (EDC) végeztük.

Vizsgáló módszerek

Kötődésvizsgálatok

A kötődésvizsgálatokban a receptor-ionofór és a specifikus ligandumok kölcsönhatását vizsgáljuk. A vizsgálatokban egy adott tríciummal jelölt specifikus ligandum kötődését befolyásoljuk különböző anyagokkal. A kötődési eredményekből elsősorban azt tudjuk megállapítani, hogy az illető vegyület liganduma-e a receptornak. Bizonyos kísérletekben ezenkívül azt is meg tudjuk határozni, hogy a kérdéses vegyület milyen hatásossággal aktiválja vagy gátolja a receptorok működését, illetve hogy allosztérikus gátlást vagy serkentést hoz-e létre. Megfelelően tervezett vizsgálatokkal az esetleges gátlás kompetitív vagy nemkompetitív jellegére is következtethetünk.

A kötődésvizsgálatokat sertés cortex szinaptikus plazmamembrán-frakción végeztük. Annak megállapítására, hogy a GSNO kölcsönhat-e a glutamát-receptorokkal, a GSNO ezen receptorok specifikus ligandumainak ($[^3\text{H}]$ glutamát, $[^3\text{H}]$ kainát, $[^3\text{H}]$ fluorowillardiin, $[^3\text{H}]$ CPP, $[^3\text{H}]$ dizocilpin) kötődésére gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A GSH feltételezett receptorának kimutatására és jellemzésére a glutamát, glutamátszármazékok, glutamátreceptor-ligandumok, a cisztein, ciszteinszármazékok, szulfhidril vegyületek, dipeptidek, GSH-analógok és gátló transzmitterek hatását teszteltük a $[^3\text{H}]$ glutation kötődésén.

A Ca^{2+} -felvétel vizsgálata és az intracelluláris Ca^{2+} -szint mérése

Az L-cisztein hatását a glutamáttal és az NMDA-val kiváltott neuronális Ca^{2+} -beáramlásra kisagyi szemcsesejtek tenyészetén radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ segítségével mutattuk ki.

A glutamáttal és az NMDA-val kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -szint L-cisztein által létrehozott változásának mérését fura-2-acetoxi-metil-észtert felhasználásával végeztük.

EREDMÉNYEK

A nitrozoglutation kölcsönhatása az ionotrop glutamát-receptorokkal

- 1., A GSNO leszorította kötőhelyeiről az ionotrop receptor specifikus, radioaktívan jelölt ligandumait, a [^3H]glutamátot, a [^3H]kainátot és a [^3H]CPP-t.
- 2., A GSNO gátló hatása kompetitív jellegű volt a [^3H]kainát és a [^3H]CPP kötődésén.
- 3., A GSNO koncentrációfüggő módon fokozta az NMDA-receptor nem-kompetitív liganduma, a [^3H]dizocilpin kötődését
- 4., A GSNO γ -glutamil oldalláncán keresztül kötődik a glutamát-receptorokhoz.

A szinaptikus plazmamembrán specifikus glutation kötőhelyeinek jellemzése

A., A [^3H]GSH-kötődés jellemzői

Kimutattuk és jellemeztük a GSH nagy affinitású Na^+ -független specifikus kötődését. Megállapítottuk, hogy a GSH egy nagy affinitású, kis kapacitású és egy kis affinitású, de nagy kapacitású receptorpopulációhoz kötődik.

B., A glutamátszármazékok és a glutamát-receptor-ligandumok hatása [^3H]GSH kötődésére

- 1., A glutamátszármazékok közül gyengén, de szignifikánsan gátolta a kötődést az L-glutamát, a kinurenát és a piroglutamát.
- 2., Az NMDA-receptor ligandumai közül csak a kvinolinát gátolta a kötődést.
- 3., Az NMDA-receptor glicinkötőhelyén ható vegyületek közül csak a D-szerin gátolta gyengén a kötődést.
- 4., A nem-NMDA-receptorok ligandumai hatástalanok a kötődésre.
- 5., A metabotrop glutamát-receptor-ligandumok közül csak az L(+)-2-amino-3-foszfopropionát volt hatásos.

C., A cisztein, a ciszteinszármazékok és a szulfhidrilvegyületek hatása a [^3H]GSH kötődésére

- 1., Az L-cisztein, az L-ciszteamin, az L-cisztamin és a dithiotreitol gátolta a kötődést.
- 2., Az L-homociszteinát és az amino-metán-szulfonát gyengén gátolt.
- 3., A tiokinurenát koncentrációfüggő módon aktiválta a kötődést.

D., A dipeptidek és a glutationszármazékok hatása a [^3H]GSH kötődésére

- 1., A γ -glutamilcisztein és az L-ciszteinilglicin erős, amíg a γ -D-glutamilglicin és a γ -glutamil-fenilalanin gyenge gátlószerek bizonyult.
- 2., A γ -L-glutamil-GABA és a γ -L-glutamil-leucin koncentrációfüggő kötődésfokozódást okozott.
- 3., Az összes GSH-származék hatékonyan gátolta a kötődést, közülük a GSH és a GSNO volt a leghatékonyabb.

E., A glicin- és a GABA-receptorok ligandumainak hatása a [^3H]GSH kötődésére

- 1., Ezen vegyületek GSH-kötődésre gyakorolt hatása nem volt kimutatható.

A membránfehérje aminosav-oldalláncainak szerepe a glutation kötődésében

A., A tiolcsoportokat módosító és a diszulfidhidakat redukáló vegyületek hatása

- 1., Az oxidáló DTNB és DDP koncentrációfüggő módon, erősen fokozta a kötődést.
- 2., 1 mM DTNB-vel való módosítás a kötődés kapacitását hatszorosára emelte, miközben a kötődés affinitása nem változott.
- 3., Az irreverzibilisen alkiláló N-etilmaleimid csökkentette a kötődést.
- 4., A diszulfidhidakat redukáló DTT koncentrációfüggő módon csökkentette a kötődést.

B., Az arginil- és lizil-oldalláncok módosításának hatása a [^3H]GSH kötődésére

- 1., Az arginil-oldalláncok fenilglixállal való módosítása csökkentette a kötődést.
- 2., A fenil-izotiocianát csökkentette a kötődést és N-etilmaleimiddel együtt alkalmazva hatásuk összeadódott.

C., A glutamil és aszpartil-oldalláncok kémia módosításának hatása a [³H]GSH kötődésére

- 1., Ezen oldalláncok kémiai módosítása EDC-vel nem befolyásolta a kötődést.

Az L-cisztein hatása a glutamáterg neurotranszmisszióra

- 1., Az L-cisztein önmagában koncentrációfüggő módon fokozta a ⁴⁵Ca²⁺-beáramlást tenyésztett kisagyi szemsesejtekbe. Szintén koncentrációfüggő módon potencírozta a glutamáttal és az NMDA-val kiváltott Ca²⁺-beáramlást.
- 2., A Ca²⁺-beáramlás teljesen megszűnt, ha a sejteket ZnCl₂-dal előkezeltük, vagy ha a ZnCl₂-ot ciszteinnel együtt alkalmaztuk.
- 3., Az L-cisztein önmaga gyengén fokozta a Ca²⁺-intracelluláris szintjét és erősítette a glutamát Ca²⁺-szint-emelő hatását.

ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy az endogén GSNO kölcsönhat az ionotrop glutamát receptorokkal. Igazoltuk, hogy a GSNO az NMDA- és a kainát receptor-ligandumok hatásos leszorítószere, valamint az általuk létrehozott kötődésgátlás kompetitív jellegű. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a GSNO a glutamát receptorokkal kölcsönhatva közvetlenül befolyásolhatja azok működését. A belőle felszabaduló nitrozóniumion (NO^+) és glutationil gyök által a receptorfehérjék nitrozilációját és glutatiolációját okozhatja, ami hosszú távú szabályozást eredményez. A nitrozoglutation és az ionotrop glutamát receptorok kölcsönhatásának tanulmányozásával hozzájárultunk a GSNO neuromodulátor szerepének tisztázásához.

Igazoltuk, hogy sertés szinaptikus plazmamembrán-preparátumban a GSH önálló kötőhellyel rendelkezik, amelynek egy alacsony és egy magas affinitású változatát különítettük el. Megállapítottuk, hogy a GSH ciszteinit-aldallánca elengedhetetlenül fontos a molekula saját kötőhelyéhez való kötődésében. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy ezen kötőhelyek különböznek minden eddig ismert serkentő vagy gátló aminosav receptorától. A glutation ezeken a felismerőhelyeken keresztül mint neurotranszmitter és neuromodulátor az idegi és a neurogliális intercelluláris kommunikációban is fontos szerepet játszhat.

A szinaptikus plazmamembránok oldalláncainak kémiai módosításából kapott eredmények alapján feltételezzük, hogy a glutation a membrán diszulfidhídjaihoz és szabad SH-csoportjaihoz kötődik. A ligandum kötésében az arginil- és feltehetően a lizil-aldallancok is részt vesznek. Ezen oldallancok sókötések kialakítása révén stabilizálhatják a glutation és a membránfehérje kölcsönhatását. A glutamil- és az aszpartil-aldallancoknak nincs szerepük a GSH kötődésében. A GSH specifikus receptorainak kimutatásával, valamint a receptor és a ligandum kölcsönhatásának tanulmányozásával nagymértékben hozzájárultunk a GSH neurotranszmitter szerepének tisztázásához.

Kimutattuk, hogy a cisztein fokozza a glutamát és az NMDA-ligandumok által kiváltott Ca^{2+} -felvételt neuronokba. Megszünteti az NMDA-receptorok feszültségfüggő Zn^{2+} -blokkját. Az L-cisztein önmaga gyengén fokozza a Ca^{2+} intracelluláris szintjét, de hatványozottan erősíti a glutamát Ca^{2+} -szint emelő hatását. A cisztein neurotoxikus hatását feltehetően az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis felborítása révén fejt ki a központi idegrendszerben. A cisztein NMDA-receptort módosító hatásának vizsgálatával hozzájárultunk a ciszteintoxicitás molekuláris hatásmechanizmusának tisztázásához.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Téziseim az alábbi eredeti közleményeken alapulnak:

- I. Hermann, A., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P., Oja, S.S. and Varga, V. (1999) Potentiation by L-cysteine of N-methyl-D-aspartate receptor: effects on intracellular free Ca^{2+} in cultured cerebellar granule cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 42:25-26.
- II. Janáky, R., Shaw, C.A., Varga, V., Hermann, A. Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (2000) Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical synaptic membranes. *Neuroscience* 95:617-624. (IF:3,563)
- III. Hermann, A., Varga, V., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (2000) Interference of S-nitrosoglutathione with the binding of ligands to ionotropic glutamate receptors in pig cerebral cortical synaptic membranes. *Neurochem. Res.* 25:1119-1124. (IF:1,858)
- IV. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P. and Oja, S.S. (2000) Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 25:1397-1405. (IF:1,858)
- V. Hermann, A., Varga, V., Saransaari, P., Oja, S.S. and Janáky, R. (2001) Involvement of amino-acid side chains of membrane proteins in the binding of glutathione to pig cerebral cortical membranes. *Neurochem Res.*, *In press.* (IF:1,858)

A TÉZISEKHEZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Cikkek:

1. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Serfőző, Z., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1997) Effect of glutathione on [^3H]dopamine release from the mouse striatum evoked by glutamate receptor agonists, eds A. Teelken and J. Korf, Plenum Press, New York, pp. 733-736.

2. Janáky, R., Dohovics, R., Hermann, A., Oja, S.S. and Saransaari, P. (2001) Effects of metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists on D-aspartate release from mouse cerebral cortical and striatal slices. *Neurochem. Res.* *In press.*

Posztterek:

1. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P. és Oja, S.S. (1996) Glutamát agonistákkal kiváltott [³H]dopamin felszabadulás egér striátumból: a glutation és tiol-redox vegyületek hatása. Összefoglalók, XXIV. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 60.
2. Hermann, A., Janáky, R., Saransaari, P., Oja, S.S. és Varga, V. (1996) Káliummal kiváltott [³H]dopamin felszabadulás egér striátumból: a glutation és tiol-redox vegyületek hatása. Összefoglalók, XXIV. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 74.
3. Varga, V., Janáky, R., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1996) [³H]Dopamine release from mouse striatum evoked by glutamate receptor agonis: effect glutathione and thiol redox agents. *J. Neurochem.* 66, Suppl. 2, S31.
4. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Characterization of glutathione binding to specific receptors in pig cerebral cortical synaptic membranes. Abstracts of the 2nd International Symposium on Synaptic Transmission, Barcelona, p. 61.
5. Hermann, A., Janáky, R., Varga, V., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) S-Nitrozoglutation hatása glutamát receptor ligandumok kötődésére agyi szinaptikus plazmamembrán preparátumon. Összefoglalók, XXVIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 9.
6. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) A [³H]glutation kötődés jellemzése kérgi szinaptikus plazmamembrán preparátumon Összefoglalók, XXVIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 10.
7. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) A neurotransmitter glutation specifikus receptorokhoz kötődik kérgi szinaptikus plazmamembrán preparátumban Összefoglalók, XXVIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 11.
8. Hermann, A., Janáky, R., Varga, V., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Displacement of glutamate receptor ligands by S-nitrosoglutathione in pig cerebral cortical synaptic membranes. Abstracts of the 3rd International Congress of Pathophysiology, Lahti, p. 208.

9. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Specific binding sites for neurotransmitter candidate glutathione in pig cerebral cortical synaptic plasma membrane. Abstracts of 3rd International Congress of Pathophysiology, Lahti, p. 208.
10. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Displacement of [³H]glutathione by cysteine and glutathione derivatives in pig cerebral synaptic membranes. Abstracts of the 3rd International Congress of Pathophysiology, Lahti, p. 209.
11. Hermann, A., Varga, V., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Glutamate receptors and S-nitrosoglutathione. Abstracts of the 4th Congress of the Nordic Society for Research in Brain Aging, Tampere, p. 7.
12. Janáky, R., Varga, V., Shaw, C.A., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998). Glutathione binding to specific receptors in cerebral cortical synaptic membranes. Abstracts of the Society for Neuroscience 28th Annual Meeting, Los Angeles, CA, part 2, p. 1835.
13. Hermann, A., Varga, V., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Interference of S-nitrosoglutathione with the binding of ligands to ionotropic glutamate receptors in pig cerebral cortical synaptic membranes. Excitatory Amino Acid Meeting 98, Manaus, p. 95.
14. Dohovics, R., Varga, V., Janáky, R., Hermann, A., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1999). cAMP dependent processes in glutamatergic corticostriatal neurotransmission. Abstracts of the Joint Meeting of the ISN and ESN, Berlin, p. 42.
15. Hermann, A., Varga, V., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1999) S-nitrosoglutathione is a potential endogenous ligand at ionotropic glutamate receptors. Abstracts of the Joint Meeting of the ISN and ESN, Berlin, p. 149.
16. Dohovics, R., Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1999). Presynaptic adenosine and metabotropic glutamate receptors in the regulation of glutamatergic cortico striatal neurotransmission. Abstracts of the 3rd International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, Taormina, p. 43.
17. Oja, S.S., Hermann, A., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Varga, V. (1999) S-Nitrosoglutathione interferes with the binding of ligands to ionotropic glutamate receptors in pig cerebral cortical membranes. Abstracts of the Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, Miami Beach, FL, part 2, p. 1488.
18. Hermann, A., Janáky, R., Saransaari, P., Oja, S. S. and Varga, V. (2000) Roles of amino-acid side chains in the binding of glutathione to pig cerebral cortical membranes. Abstracts of the Forum of European Neuroscience, Brighton, p. 265.
19. Hermann, A., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P., Oja, S.S., és Varga, V. (2001). A szinaptikus plazmamembrán glutathion receptorok: az aminosav oldalláncok szerepe a specifikus kötődésben. Összefoglalók, XXXI. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 32.

20. Hermann, A., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P., Oja, S.S. and Varga, V. (2001) Effects of chemical modification of putative glutathione receptors on the ligand binding to porcine cerebral cortical membranes. *J. Neurochem.* 78, Suppl. 1, 186.
21. Dohovics, R., Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P. and Oja, S.S. (2001) Interactions of presynaptic G-protein-linked receptors in the regulation of glutamatergic neurotransmission in the striatum. *J. Neurochem.* 78, Suppl. 1, 197.