

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUMHOMEOSZTÁZIS
SZABÁLYOZÁSA VÁZIZOMSEJTEKEN**

Szappanos Henrietta



Témavezető: Dr. Csernoch László

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2004**

I. Bevezetés

I.1. Az izomsejtek általános tulajdonságai

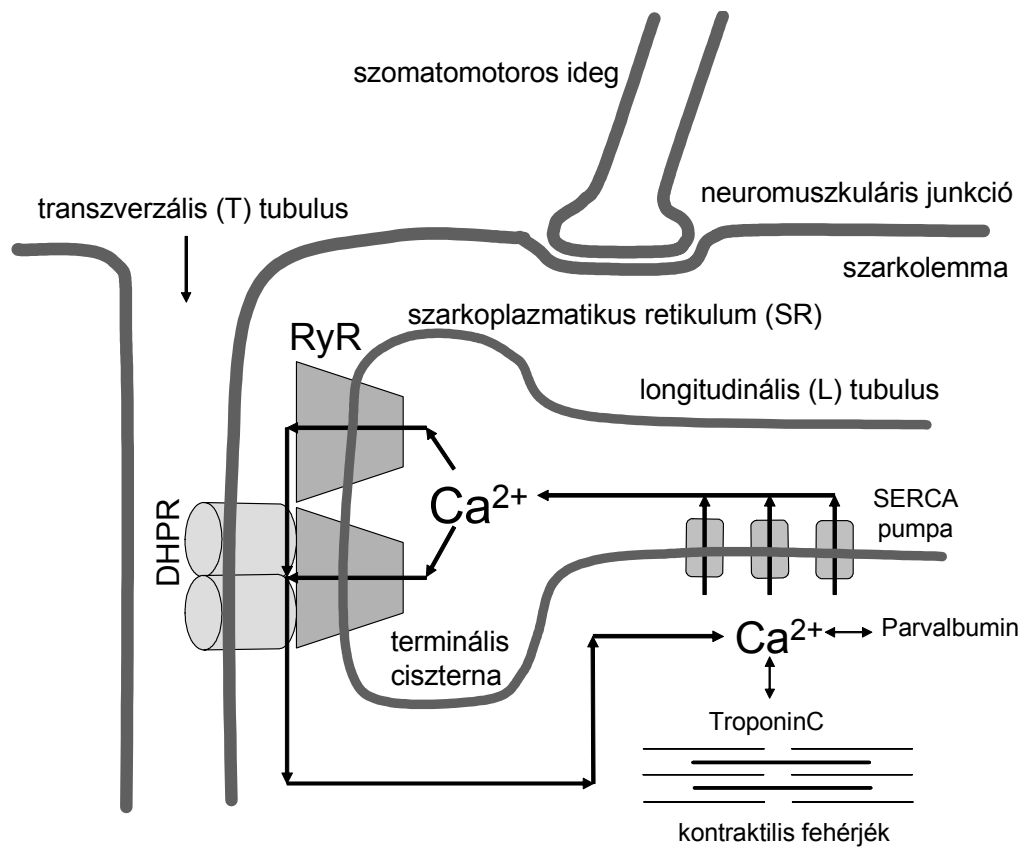
Az izom elnevezés több különböző, kontrakcióra specializálódott sejtípust foglal magába. Mindegyikben megtalálhatóak a kontraktilis fehérjék, az aktin és a miozin, de különbség figyelhető meg ezek sejten belüli eloszlásában, aminosavsorrendjében, valamint az őket szabályozó fehérjék működésében.

Gerincesekben az izomsejteknek 4 típusa van: a vázizom, a szívizom, a simaizom és a myoepitheliális sejtek. Az első három típus mezodermális eredetű, a myoepitheliális sejtek pedig az ektodermából fejlődnek. A mezodermális izomsejtek közül a simaizom mutatja a legegyszerűbb struktúrát, a váz- és a szívizom erősen organizált, "harántcsíkolt" szerkezetű. A simaizmokat és a szívizomzatot az autonóm (vegetatív) idegrendszer innerválja. Ezzel szemben a vázizmot a perifériás idegrendszer szomatomotoros rostjai idegzik be és akaratlagos szabályozás alatt áll. A myoepitheliális sejtek az ektodermális eredetű epitheliális szekretoros szövetek különböző típusaiban találhatók meg. Részt vesznek a veríték, a nyál és a tej kiválasztásában. Működésük az endokrin rendszer és a vegetatív idegrendszer kettős kontrollja alatt áll.

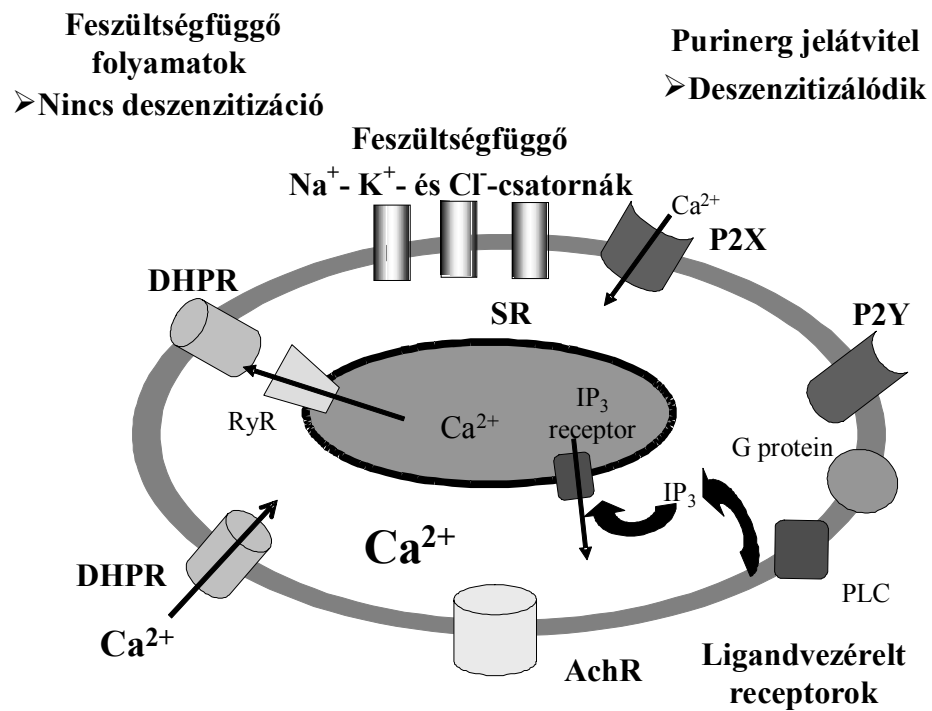
I.1.1. *A vázizom sajátosságai*

Kifejlett harántcsíkolt izomban az egyes izomrostokat sejtmembrán veszi körül, amit sarcolemmának neveznek (a citoplazmát pedig sarcoplasmának). A sarcolemma felépítése hasonló más ingerlékeny membrán felépítéséhez. A működés szempontjából jelentős feszültségfüggő gyors Na^+ - és késői típusú K^+ -csatornák, Cl^- és Ca^{2+} -csatornák, valamint különféle receptormolekulák találhatók meg benne.

A



B



1. ábra (A) A vázizom általános felépítése. (B) A fejlődő izom felépítése.

A vázizomrostok intracelluláris terében helyezkednek el a myofilamentumok, melyek kontraktilis fehérjéket tartalmaznak. A vastag filamentumok vázát a miozin, a vékony filamentumokét pedig az aktinmolekulák alkotják. Itt található a kontrakció szabályozásához szükséges fehérjék (troponin, tropomiozin) és a szerkezet fenntartásáért felelős struktúrák. A sarcoplasmában található az energetikai szükségletek biztosításához nélkülözhetetlen elemek (glikolitikus enzimek, mitochondriumok), és a sarcolemma alatt elhelyezkedő sejtmagok. A myofilamentumok myofibrillumokba tömörülnek, melyeket egy fejlett intracelluláris membránrendszer, a sarcoplasmaticus reticulum (SR) vesz körül, amit longitudinális (L-) tubulusok alkotnak. Az L-tubulusok kiszélesedett végei a terminális ciszternák. Ezek a transzverzális (T-) tubulusok -a sarcolemma betüremkedései- közvetlen közelében helyezkednek el, és azokkal együtt alkotják a triádokat. Az SR belső membránrendszere kalciumraktárként működik, ez teszi lehetővé a Ca^{2+} -koncentráció egyidejű, gyors megemelkedését az intracelluláris térben.

Az elektromechanikai csatolás a felszíni membrán depolarizációja és a kontrakció kialakulása között végbemenő események sorozata, melynek első lépése az akciós potenciál betérése a T-tubulusokba. Itt található az úgynevezett dihidropiridin-receptorok (DHPR), melyek nem funkcionáló L-típusú Ca^{2+} -csatornák, depolarizáció hatására konformációváltozást szenvednek, ezáltal feszültségérzékelő szerepet töltenek be az ingerületi folyamatban (Rios és Brum, 1987). A Ca^{2+} -raktárként működő terminális ciszternákon rianodinreceptorok (RYR) találhatóak (1A ábra).

Elektromikroszkópos vizsgálatokkal kimutatták, hogy a RYR-ok kettős sorokban helyezkednek el a membránban és csak minden második alkot közvetlen kapcsolatot egy DHPR-ral (Protasi, 2002). A kölcsönhatás molekuláris természetére vonatkozóan több elképzelés létezik, a legvalószínűbb az, hogy a két receptor között mechanikai

kapcsolat van. Feszültség hatására megváltozik a DHP-receptor térszerkezete és ez a hozzá térben nagyon közel elhelyezkedő rianodin-receptor konformációváltozását és megnyílását okozza. A másik lehetőség a kémiai transzmisszió, ahol a depolarizáció hatására megnyíló DHPR-okon beáramló kis mennyiségű Ca^{2+} okozza a RYR-ok megnyílását. Ilyen kapcsolatot mutattak ki szívműködésen és a fejlődő vázizmokban (1B ábra).

A kifejlett vázizmon az extracelluláris Ca^{2+} belépése a kontrakció létrehozásában nem játszik szerepet, a Ca^{2+} intracelluláris raktárakból szabadul fel, majd a kontrakció után ide is kerül vissza (Ashley és mtsai, 1991)).

Jelenlegi ismereteink szerint a harántesíktal izmok felépítése és működése különbözik kételtűk, valamint emlősök esetében. Ez a különbség egyrészt a sarcoplasmaticus retikulum morfológiai eltéréseivel (Franzini-Armstrong és Peachey, 1981), másrészt a kalciumfelszabadulásban részt vevő rianodin receptorok szerkezetének különbözőségeivel magyarázható. Kimutatták, hogy béka vázizmokban kétféle rianodin receptor izoforma fordul elő, melyek jellegzetesen kettős sorokban helyezkednek el. Az egyik közvetlen kapcsolatban áll egy, a felszíni membránban elhelyezkedő feszültségérzékeny dihidropiridin receptorral, míg a receptor másik izoformája attól távolabb helyezkedik el, és az intracelluláris tér kalciumkoncentrációjának kismértékű megváltozására nyílik meg. Emlős vázizmokban ez utóbbi izoforma nem fordul elő (Flucher és mtsai, 1999). A DHPR-ok aktiválódása a velük szoros kapcsolatban álló RYR-okon keresztül kalciumkiáramlást okoz, a megnövekedett intracelluláris kalciumkoncentráció (továbbiakban $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$) pedig aktiválja a távolabb elhelyezkedő, DHPR-okkal közvetlen kapcsolatban nem álló RYR-okat (kalcium indukált kalciumfelszabadulás), ami további kalciumfelszabadulást hoz létre.

Az egész sejtre kiterjedő, tranziens intracelluláris kalciumkoncentráció (továbbiakban $[Ca^{2+}]_{ic}$) -megemelkedés alapját képező, egy, vagy néhány RYR megnyílása által okozott kalciumfelszabadulást elemi eseménynek nevezzük (Cheng és mtsai, 1993). Mint azt Kirsch és mtsai 2001-ben leírták, az elemi kalciumfelszabadulási eseményeknek két formája figyelhető meg. Egy nagyobb amplitúdóval jellemezhető, rövid ideig tartó esemény, a „spark” (Cheng és mtsai, 1993, Tsugorka és mtsai, 1995, Klein és mtsai, 1996), valamint egy hosszabb ideig tartó, kisebb amplitúdójú esemény, az „ember” (González és mtsai, 2000). A megnövekedett $[Ca^{2+}]_{ic}$ felelős a kontrakcióért és számos sejtfolyamatért.

I.1.2. *A vázizom fejlődése: miogenezis*

Az izomsejtek fejlődése során 3 stádium különíthető el (Grounds, 1991). Az első az embrionális fázis, vagy korai differenciálódás, melynek során a differenciálatlan mezodermális sejtek miogén irányban elkötelezett sejtekké alakulnak. A monopotens myoblast ezután terminális differenciálódáson megy keresztül, melynek során működésbe lépnek az izomspecifikus fehérjéket kódoló gének és a sejt fúzió iránti készsége nő. A második szakaszban, az érési fázis ideje alatt, a fúzió után, az izomspecifikus fehérjék: aktin, miozin, troponin, tropomiozin, miokináz, kreatinfoszfokináz, egyes receptorok (pl. acetilkolin receptor, a továbbiakban AchR), sejtdhéziós molekulák szintézise fokozódik. Ekkor történik a növekedés és a speciális feladatokhoz való adaptálódás.

Ez a két fázis *in vitro* reprodukálható, de külső faktorok hiányában (beidegzés, hormonhatások, az extracelluláris mátrix jelenléte) a fejlődés ezen a stádiumon nem jut túl. A harmadik fázis, a késői differenciálódás jellegzetessége az izomtípusok szerinti differenciálódás.

I.1.2.1. Myoblastok

A myoblastok mezodermális sejtvonalból származó, miogén irányban elkötelezett sejtek. Az embrióban a vázizom kialakulási helye körül halmozódnak és szaporodnak fel. Egy részük az embrionális izomzatot alkotja, míg egy elkülönülő sejtvonalból stem sejt populációk, azaz szatellitasejtek alakulnak ki.

A szatellita sejtek a kifejlett vázizomrostok membránja és alaphártyája között található, nem osztódó, nyugvó állapotban levő sejtek, melyek az izom sérülésekor aktiválódnak és belőlük indul meg a sérült, vagy elpusztult izomrész regenerációja. A szatellita sejtek osztódó myoblastokká alakulva ugyanazt a fejlődési, differenciálódási útvonalat indítják be, mint ami az embrionális fejlődés során a magzati vázizomzat kialakulásához vezet (Grounds, 1991).

A myoblastok alakja a bipoláris, vagy orsó alakú, monopoláris mesenchymális sejtekéhez hasonlít és kezdetben (premyoblastok, vagy izom-prekurzor sejtek) látszólag megkülönböztethetetlenek a többi mesenchymális mezodermális sejttől (fibroblastok), melyek az izom kötőszövetes állományát alakítják majd ki. A premyoblastokból, melyek nem szintetizálnak izom-specifikus fehérjéket, myoblastok fejlődnek. Holtzer és Bishoff (1970) definíciója szerint a myoblastok „posztmitotikus mononukleáris sejtek, melyek fúzióra és kontraktilis fehérjék szintézisére képesek”.

I.1.2.2. Myotubulusok

A myoblastok sejtzincíciummá fuzionálnak, melyet myotubulusoknak (izomcsöveknek) neveznek. A sejtfelszíni adhéziós molekulák izoform átalakuláson mennek keresztül a fúzió előtt. A myotubulusok elongált, cilindrikus, sokmagvú sejtek, melyek kötegekbe rendezett kontraktilis fehérjéket tartalmaznak. A haránt irányú tagolódás (sarcomera) is megfigyelhető már ebben a fejlődési stádiumban. A sejtmagok

centrálisan helyezkednek el, a myofibrillumokat perifériás irányba tolják. A primer myotubulusok a myoblastok közelében helyezkednek el, és azokkal összeolvadva hozzák létre a szekunder myotubulusokat. Ebben a fejlődési stádiumban alakul ki az alaphártya, mely körülveszi az izomcsöveket.

I.1.2.3. Izomrostok

Az izomrostok kontraktilis fehérjéket szintetizálnak, melyek megnövekedett mennyisége a sejtmagokat a perifériára nyomja. Az egyes sejteket kötőszövet (endomysium) veszi körül. A sejtek kötegekbe rendeződnek, melyeket perimysium, illetve epimysium burkol.

Az izomrostok mérete nagyon változó. Az izmok leginkább hipertrófiával növekednek, melynek során nő a myofibrillumok átmérője és hossza, míg hiperplázia során az izomrostok száma nő. Emlősökben ez a szám a születés előtt, vagy közvetlenül a születés után meghatározódik, és később már nem változik. A hossznövekedést a fibrillumok végéhez csatlakozó sarcomerek számának megnövekedése okozza. Az újonnan szintetizált myofilamentumok a rostok átmérőjének növekedését idézik elő (Muntz, 1990).

I.2. A purinerg jelátvitel

Az adenin vegyületek hatásáról Drury és Szentgyörgyi számolt be először 1929-ben. Mintegy három évtizeddel később az ATP-t mint neurotranszmittert írták le, mely nyúl fülartériájában a szenzoros idegek antidrom stimulációjakor szabadul fel (Holton, 1959). Az 1960-as években utaltak először arra, hogy a gasztrointesztinális és a húgyivarrendszert ellátó idegek egy csoportja nem-adrenerg, nem-kolinerg ideg (NANC), transzmitterük az ATP (Burnstock és mtsai, 1963; Martinson és Muren,

1963). Az általuk közvetített jelátviteli folyamatot purinerg transzmisszióknak nevezték el. Később azonosították a hatásért felelős receptorokat. Ezeket a receptorokat két csoportba sorolták hatásuk és endogén aktivátoruk szerint (Burnstock, 1972). Az adenozinnal aktiválható adenosin- vagy P1 purinoreceptorok adenilát-cikláshoz kapcsolódtak. A metilxantin alacsony koncentrációban kompetitív módon képes gátolni ezeket a receptorokat, melyek idegvégződéseken és szinapszisokban helyezkednek el a preszinaptikus membránban. Aktivációjuk a neurotranszmitterek (Ach, NA, stb.) felszabadulását gátolja (De Mey és Mtsai, 1979) így a negatív visszacsatolási mechanizmusban, a purinerg jelátvitel autoregulációjában (önszabályozásában) vesznek részt. A másik csoportba azokat a receptorokat sorolták, melyek ATP-vel és ADP-vel aktiválhatóak. Ezeket P2 purinoreceptoroknak nevezték el. Számos sejttípusban előfordulnak, így az idegsejteken is, ahol főleg a posztiszinaptikus membránban találhatóak és stimuláló hatásúak az ingerületátvezetési folyamatokban.

A P2 purinoreceptoron keresztül ható ATP kotranszmitterként szabadul fel adrenerg, illetve kolinerg idegvégződésekből (szimpatikus idegekben noradrenalin, és Y neuropeptiddel, paraszimpatikus idegekben acetilkolinnal és vazóaktív intesztinális peptiddel (VIP), szenzomotoros idegekben CGRP-vel (kalcitonin gén-rokon peptid) és P-anyaggal (substance P), NANC inhibitoros idegekben pedig nitrogén-monoxiddal és VIP-pel; von Kügelgen és Starke, 1985; Silinsky, 1975). Az ATP nem idegi úton, szöveti károsodáskor, illetve hipoxiás körülmények között, valamint neuroendokrin, vagy epitheliális szekrécióval kerülhet az intracelluláris térből az extracelluláris térbe.

Az ATP hatását különböző állatfajokban vizsgálták, az egysejtűektől, az emlősökig. Mindegyikben sikerült kimutatni az ATP-t, energiaforrásként, nukleinsavak alkotóelemeként, és extracelluláris hírvivőmolekulaként. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy az ATP egy olyan ősi, alapvető transzmitter lehet, mely az evolúciós

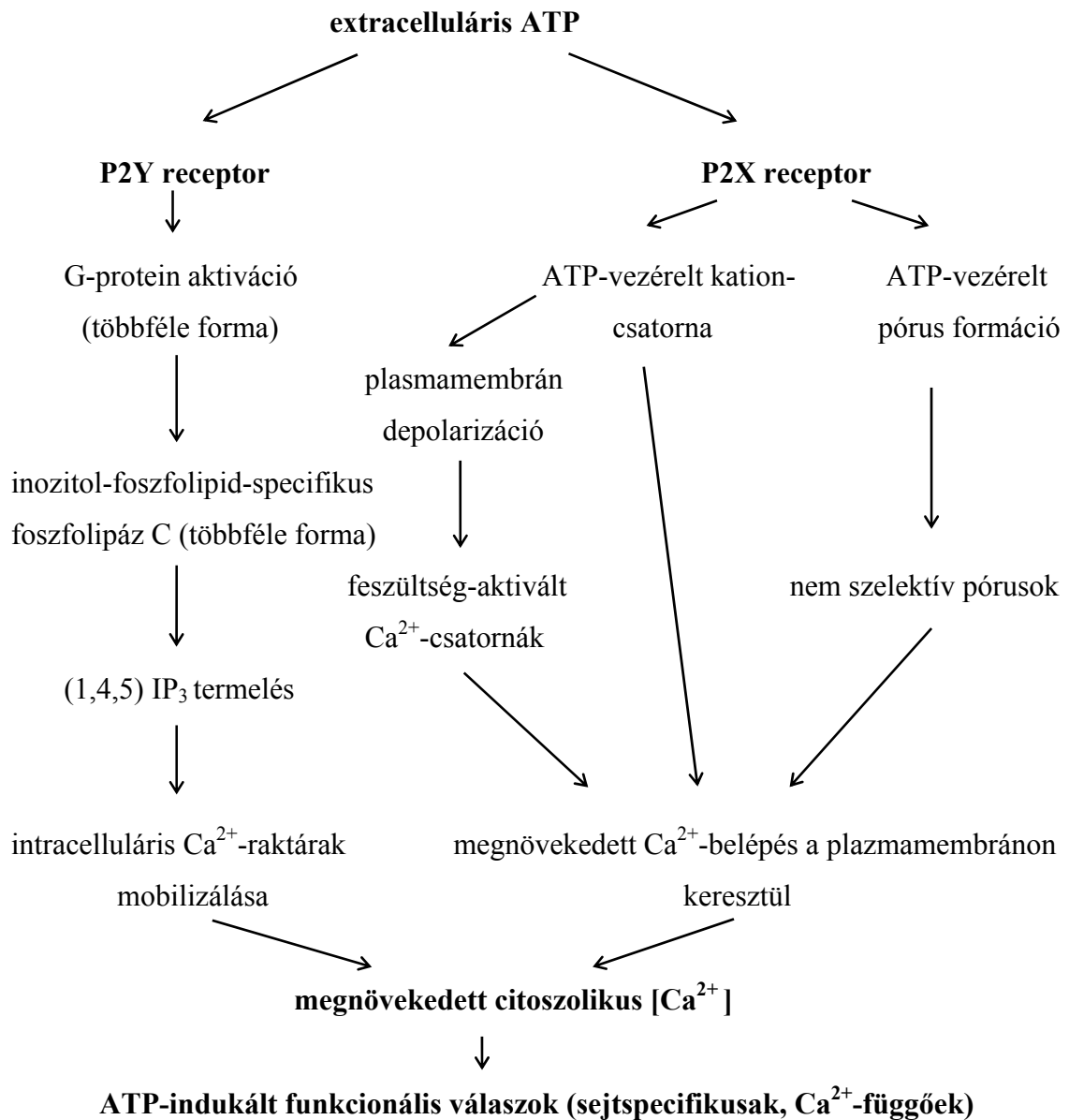
fejlődés során, mint kotranszmitter maradt meg, és szerepe eltérő lehet különböző fajok, illetve szövetek esetében.

I.2.1. *A purinoreceptorok osztályozása*

Az aminosav szekvenciájuk és jelátviteli útvonalaik szerint a P2 receptorok két csoportba (2. ábra) sorolhatók (Abbracchio és Burnstock, 1994):

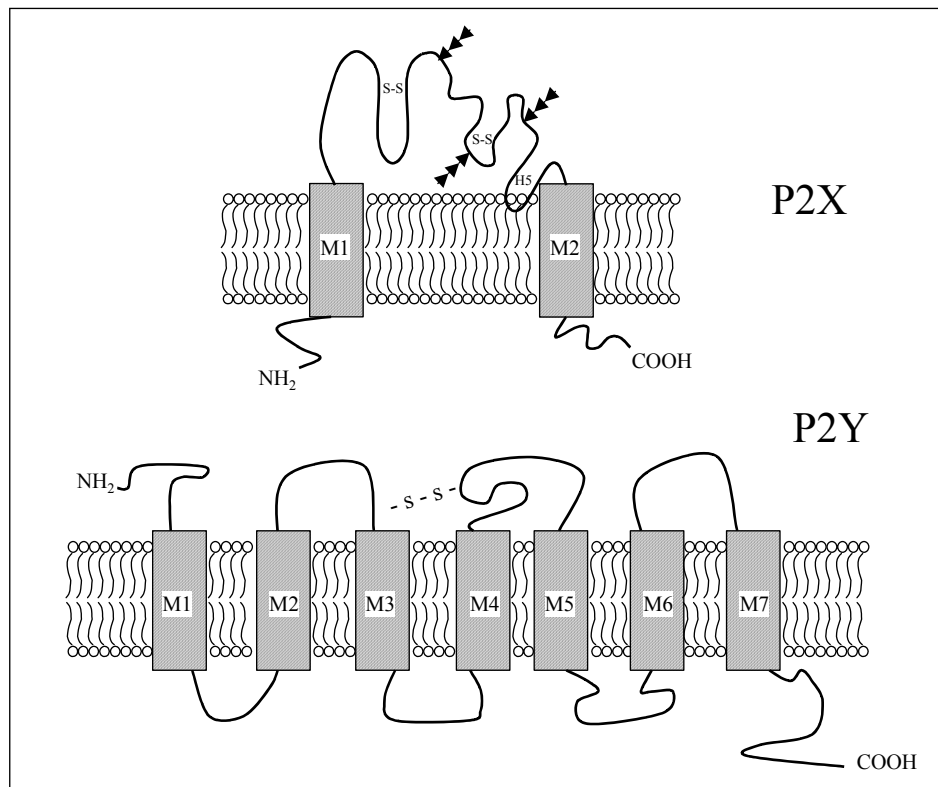
1. A P2X purinoreceptorok ligandvezérelt kationcsatornák, eddig 7 altípusukat klónozták, P2X₁₋₇. Két transzmembrán szegmensből és egy nagy, ciszteinben gazdag extracelluláris hurokból állnak, a C- és az N-terminális egyaránt intracelluláris elhelyezkedésű (Chizh és Illés, 2000; Barnard és Simon 2001; North, 2002). A korábban P2Z purinoreceptorként azonosított P2X₇ receptor egy nagy konduktanciájú, nem-szelektív csatorna. Megnyílása a sejt lízisét okozza. ATP⁴⁻ aktiválja, makrofágokban, limfocitákban, valamint hízósejtekben van jelentős szerepe.
2. A P2Y purinoreceptorok 7 transzmembrán doménből álló struktúrák, melyek G-proteinhez kapcsolódnak, azok közül is elsősorban a G_p fehérjékhez, melyek a foszfolipáz C útvonalat aktiválják. 8 klónozott altípusuk ismert. A korábban P2U-ként leírt típust újabban a P2Y₂ receptorral azonosítják (von Kügelgen és Starke, 1985, Silinsky, 1975).

A vázizom purinerg jelátviteli folyamataiban a P2X, valamint a P2Y altípusok (3. ábra) tölthetnek be fontos szerepet.



2. ábra: Az extracelluláris ATP különböző P2 purinoreceptor altípuson keresztül képes hatását kifejteni. Mindegyik altípus aktiválódása intracelluláris $[Ca^{2+}]$ növekedéssel jár, mely a Ca^{2+} -függő sejtfolymatokat aktiválja (pl. izomsejtek kontrakciója, az endokrin/neuroendokrin sejtek exocytosisa). A P2Y receptorok IP_3 termelést indukálnak, mely az intracelluláris Ca^{2+} -raktárakból Ca^{2+} -mobilizálást okoz. Ezzel szemben a P2X receptorok elsősorban a Ca^{2+} -influxot növelik, a plazmamembrán különböző csatornáin és pórusain keresztül (Burnstock, 1996. nyomán).

A



B

Altípusok	Szöveti lokalizáció	Aktiváció	Deszenzitizáció	Relatív ionpermeabilitás (P_{Ca} / P_{Na})
P2X ₁	KIR, simaizom, thymus, vérerek	gyors $\tau_{onset} \sim 5$ ms	monoexponenciális $\tau = 100 - 300$ ms	4
P2X ₂	KIR, mellékvesevelő	lassú $\tau_{onset} \sim 25$ ms	—	2,2
P2X ₃	KIR, szenzoros magok	gyors	biexponenciális $\tau = 50$ ms - 1 s gyors	4
P2X ₄	KIR, uterus, testis, thymus, nyálmirigy acinosus sejtjei	lassú	köztes forma, $\tau > 2$ s	4
P2X ₅	nervus trigeminus mesencephalicus magja	köztes időállandó $\tau_{onset} \sim 15$ ms	—	
P2X ₆	KIR, uterus, ovarium, bronchus epithelium		köztes forma $\tau > 2$ s	
P2X ₇	KIR, mikroglia sejtek	lassú	—	2

3. ábra (A) A P2X, valamint a P2Y purinoreceptorok általános felépítése. (B) A P2X receptorok jellemző tulajdonságai

I.2.2. *A P2X purinoreceptorok funkcionális tulajdonságai*

I.2.2.1. Agonista tulajdonságok

Szelektív antagonisták hiányában a P2X receptorok farmakológiai azonosítása elsősorban az agonista hatásprofilra épül. Valamennyi P2X purinoceptor típuson (4. ábra) agonistaként hat az ATP, a 2-metilthio-ATP, a 2-kloro-ATP, az ADP, és csak részleges agonista az ATP γ S, az Ap5A. A 3'-O-(4-benzoil) benzoilATP (BzATP) főként a P2X₇ receptoron hatásos (Surprenant, 1996). Az ATP félmaximális koncentrációja egyes P2X receptorok esetében néhány μ M (P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₅, P2X₇), míg más altípusok jóval érzékenyebbek, ezeken az ATP már nM-os koncentrációban is hatásos (P2X₃, P2X₆; Soto, és mtsai. 1997; North és Surprenant, 2000)

Eltérő az egyes receptorok érzékenysége más agonisták tekintetében is. Egyes altípusok az α,β -metilén-ATP-re érzékenyek és kevésbé, vagy egyáltalán nem a β,γ -metilén-ATP-re (P2X₁, P2X₃) míg más altípusok α,β -metilén-ATP-vel sem aktiválhatók (P2X₂, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇; Surprenant, 1996).

Egyes P2X receptorokra jellemző az agonista hosszabb idejű alkalmazása során fellépő deszenzitizáció, amit az agonista ismételt alkalmazásával járó válaszcsökkenés jelez (North, 1996; Surprenant, 1996).

I.2.2.2. Antagonista tulajdonságok

A purinoreceptorok fiziológiai vizsgálatokkal történő megkülönböztetése nehéz, mivel nincsenek az egyes altípusokra szelektív, nagy affinitású antagonisták. Bár több, használatban levő purinoceptor-antagonista ismert, a suramin, a pyridoxalfoszfát-6-azofenil-2,4'-diszulfon-sav (PPADS), a pyridoxál-5-foszfát (P5P), a 4,4'-

diisothiocyanostilben-2,2'-diszulfon-sav (DIDS), a Cibacron blue és egyes oxidált ATP-formák (4. ábra), ám ezek nem alkalmasak az altípusok elkülönítésére.

Míg a PPADS (McLaren és mtsai, 1994), a P5P és a DIDS hatása kevésbé reverzibilis, nehezen mosható ki, esetleg irreverzibilis, addig a suramin (von Kögelgen és Wetter, 2000) hatása gyorsan kialakuló és könnyen kimosható. A suramin és a PPADS hatásos koncentrációja 1-10 μ M koncentrációtartományba esik, magasabb koncentrációkban (>100 μ M) nem szelektív gátlást idéznek elő mind a P2X receptorokon, mind más ioncsatornákon (5-HT₃, GABA, kifelé egyenirányító K⁺- és N-típusú Ca²⁺-csatornákon).

A suramin és a PPADS hatásának kimoshatóságában mutatkozó különbségek arra utalnak, hogy a receptorfehérje más doménjei felelősek a kötésükért (Surprenant, 1996).

P2X altípusok	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇
Agonisták	ATP, 2-metilthio-ATP, 2-chloro-ATP, ADP, ATP γ S α,β -metilén-ATP, β,γ -metilén-ATP, BzATP						
	ATP +++	ATP +++	ATP +++	ATP ++	ATP ++	ATP +	ATP +
Antagonisták	suramin PPADS	suramin PPADS	suramin PPADS		suramin PPADS		
	DIDS, Cibacron Blue						

P2Y altípusok	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₃	P2Y ₄	P2Y ₅	P2Y ₆	P2Y ₇	P2Y ₈
Agonisták	ATP, 2-metilthioATP, ADP, ATP γ S							
	UTP	UTP	ATP ↓	UTP				
Antagonisták	suramin, reaktív blue2							

4. ábra A P2X, valamint P2Y purinoreceptorok farmakológiája, agonista- és antagonistá hatásprofil

I.2.2.3. Ion permeabilitás

Az ATP-vel aktiválható ioncsatornák egyaránt permeábilisak monovalens kationokra - Na^+ és K^+ ionokra - és a divalens Ca^{2+} -ionokra.

A relatív Ca^{2+} permeabilitási hányados Na^+ -ra nézve ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) 2 és 4 közé esik (Evans és mtsai, 1996). Ez kisebb, mint az NMDA, de nagyobb, mint a nikotinerg receptorok esetén. A Ca^{2+} áramok direkt mérésével kimutatták, hogy az csupán az ATP által kiváltott ionáramok 8-15%-át teszi ki fiziológias körülmények között. A pórus átmérője 0,9-1 nm, ami valamivel nagyobb, mint a nikotinerg receptor pórusátmérője, így áteresztő nagy szerves kationokra is (pl.: TRIS, N-metil-D-glükózamin; North, 1996; Surprenant, 1996).

A P2X receptorok fontos tulajdonsága a befelé egyenirányítás, bár ennek mértéke különbözik a sejtek, sejtípusok és az egyes P2X receptor altípusok között. Az egyenirányításban, eltérően az NMDA receptortól és a befelé egyenirányító K^+ csatornától, nem játszanak szerepet Mg^{2+} -ionok (Surprenant, 1996).

I.2.2.4. A purinerg anyagok hatásai

Míg a purinszármazékok rövid idejű hatásait széles körben tanulmányozzák, szöveti hatásai kevésbé ismertek. Az embrionális fejlődésben, a növekedési folyamatokban, a sejtproliferációban, az apoptózisban és a programozott sejthalálban már meghatározták a szerepüket. Nemrégiben írták le ezen anyagok szerepét a glia- és a neuronsejtek aktivációjában és azt is sikerült megállapítani, hogy ez kölcsönhatásban áll a növekedési faktorok termelésével és azok hatásaival. Kutatások folynak a purinszármazékok neuroimmun mechanizmusokban, csont- illetve porc-felszívódás folyamataiban betöltött esetleges szerepével kapcsolatban is (Burnstock, 1996).

I.2.2.5. Az ATP hatása vázizmokon

Korábban már leírták az extracellulárisan alkalmazott ATP hatásait izomsejteken (Henning és mtsai, 1997). Kimutatták, hogy az ATP acetilkolinnal együtt szabadul fel neuromuscularis junctioban az idegvégződésekből (Silinsky, 1975), és módosítja a synapticus ingerületátvitelt. Ezen kívül erőltetett izommunka (Cunha és Sebastião, 1993), illetve szöveti sérülés alatt is felszabadulhat ATP. Egy jelenleg elfogadott elképzelés szerint az extracelluláris ATP az izom differenciálódás szabályzásában vesz részt (Ryten és mtsai, 2002), valamint szerepe lehet egyes sarcoglycanopathiás betegségek kialakulásában (Betto és mtsai, 1999).

Mind az ionotróp P2X, mind a metabotróp P2Y receptorok jelenlétét kimutatták már harántcsíkolt izomsejteken, a P2X receptorokat csirkeembrión (Ruppelt és mtsai, 1999; Bo és mtsai, 2000), és humán vázizomsejteken (Urano és mtsai, 1997). A receptorok expressziója differenciálódás-függő mintázatot mutatott, a fejlődés korai stádiumában a legtöbb altípus megjelent a sejteken, míg a későbbi, differenciáltabb fejlődési stádiumban ezek nagy része eltűnt (Ruppelt és mtsai, 2001). A P2X receptorok a teljesen differenciált izomrostokon nincsenek jelen, bár denerválás hatására expressziójuk ismét fokozódik (Wells és mtsai, 1995). C2C12 egér vázizom eredetű sejtvonalon (Henning és mtsai, 1993), valamint embrionális izomsejteken (Cheung és mtsai, 2003) kimutatták a P2Y receptorok jelenlétét is. Bár mind a P2X, mind a P2Y receptorok aktiválódása az $[Ca^{2+}]_{ic}$ megemelkedéséhez vezet, de azt mindeddig nem sikerült megállapítani, hogy a két különböző útvonal milyen arányban vesz részt a folyamatban.

I.3. A proteinkináz C rendszer jellemzői és szerepe vázizomsejteken

A foszfatidil-inozitol útvonal (PI) P2Y receptoron keresztüli aktiválódása az $[Ca^{2+}]_{ic}$ megemelésétől (Keresztes és mtsai, 1991), aktiválja a proteinkináz C (PKC) enzimsalád tagjait is. A PKC rendszer elemei a szerin/threonin kinázok csoportjába tartoznak, amelyek központi szabályozó szerepet játszanak számos sejt típus működésében. Jelenleg 11 különböző izoenzimet ismerünk, amelyeket három csoportba sorolnak: a kalciummal és forbolészterekkel aktiválható „klasszikus” (PKC α , β I, β II, és γ), a kalciumtól független „új típusú” (PKC δ , ϵ , η , és θ), és az aktiválódásához sem kalciumot, sem forbolésztert nem igénylő, „atípusos” (PKC ζ és $\lambda/1$) családokba. Külön „csoportba” tartozik a PKC μ izoenzim. A kalciummal és forbolészterekkel való aktiválhatóságuk a szekvenciájukban található specifikus kötőhelyek meglététől függ, ezen domének hiányában az adott anyag nem szükséges az enzim működéséhez. Az izoenzimformák jellegzetes eloszlási mintázatot mutatnak a különböző sejtekben, és eltérő a proliferációban illetve differenciálódásban betöltött szerepük is (Ohno és mtsai, 1991; Goodnight és mtsai, 1994, 1995). Ismert az is, hogy egy adott válasz kialakítása nem csak bizonyos PKC izoformák aktiválódásához kötött, hanem a különböző típusok akár antagonisztikus hatásúak is lehetnek (Mischak és mtsai, 1993; Murray és mtsai, 1993; Brodie és mtsai, 1998), ami az egyes izoenzimek eltérő szabályozó funkciójára utal.

II. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a tenyésztett vázizomsejtek kalciumhomeosztázisának, valamint a kalciumfelszabadulás hátterében álló elemi eseményeknek a vizsgálatát.

Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan hat az extracellulárisan alkalmazott ATP tenyésztett vázizomsejteken?
2. Vannak-e purinerg receptorok tenyésztett vázizomsejteken, ha igen, milyen típusúak? Hogyan valósul meg rajtuk keresztül a sejt intracelluláris terébe történő kalciumbeáramlás és hogyan lehet ezt befolyásolni?
3. Van-e hatása az extracelluláris ATP-nek a sejtek osztódására és differenciálódására, és ha igen, milyen jelátviteli útvonalon keresztül valósul meg ez a hatás?
4. Milyen jellemzőkkel írhatók le az emlős vázizmok sarcoplasmaticus reticulumából történő kalciumfelszabadulás elemi eseményei?
5. Meghatározható-e az elemi események jellemzőiből az azokat létrehozó csatornák száma? Van-e ebből a szempontból különbség az elemi események két alapvető formája, a „spark” és az „ember” között? Befolyásolhatóak-e ezek valamilyen módon?

III. Anyagok és módszerek

III.1. Vázizomsejtek tenyésztése

Humán vázizom eredetű tenyészetek esetében az izomszövetek olyan egészséges páciensekből származtak, akik ortopédiai műtéten estek át. Egér vázizom tenyészetekhez a rostokat 4-10 napos egerek hátsó végtagjából preparáltuk.

A kimetszett izomszövetet fiziológiás sóoldatba helyeztük (Hanks-oldat: 136,75 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,34 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,81 mM MgSO₄, 1,26 mM CaCl₂, 5,56 mM glükóz, 4,17 mM NaHCO₃, 10 mg/l fenolvörös, 50 µg/ml gentamicin (Biogal, Debrecen, Mo.), pH: 7,2, ozmolaritás: 300 mosm/l), ollóval 3-5 mm-es darabokra vágtuk a mintát, majd oldatcserével vértelenítettük. Darabolást követően az izom emésztését Ca²⁺- és Mg²⁺-mentes, 1 mg/ml tripszint (Difco, detroit, MI, USA) és 0,75 mg/ml kollagenáz II-t (Sigma, St. Louis, MO, USA) tartalmazó foszfát pufferben (136,75 mM NaCl, 8,02 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 25 mM glükóz, 25 mM szacharóz, 50 µg/ml gentamicin, 50 U/ml penicillin (Biogal), 50 µg/ml streptomycin (Biogal), 1 mg/ml BSA (borjú savó albumin; Sigma), pH: 7,4, ozmolaritás: 300 mosm) végeztük, 37 °C-os rázófürdőben (1 Hz), 15 percig. Ezt követően a felülúszót lószérumot tartalmazó neutralizáló oldattal elegyítettük, mely tripszininhibitor hatásánál fogva leállította az enzimreakciót. Kétrétegű (50, illetve 20 µm pórusátmérőjű) nylon-membránon történő szűrés után 10 percig 1000/perc fordulaton centrifugáltuk az oldatot, majd az üledéket a megfelelő szérumtartalmú HAM F-12 tápoldatban (Sigma) oldottuk. Ez humán minta esetében 5% főtális borjúsavót (FCS, Sigma), 5% lószérumot (HS, Sigma), egér vázizom esetén 10% FCS és 10% HS-t, valamint minden esetben 50 U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomicint, és 1,25 µg/ml fungizont (Biogal) tartalmazott. A durva izomdarabokat tovább

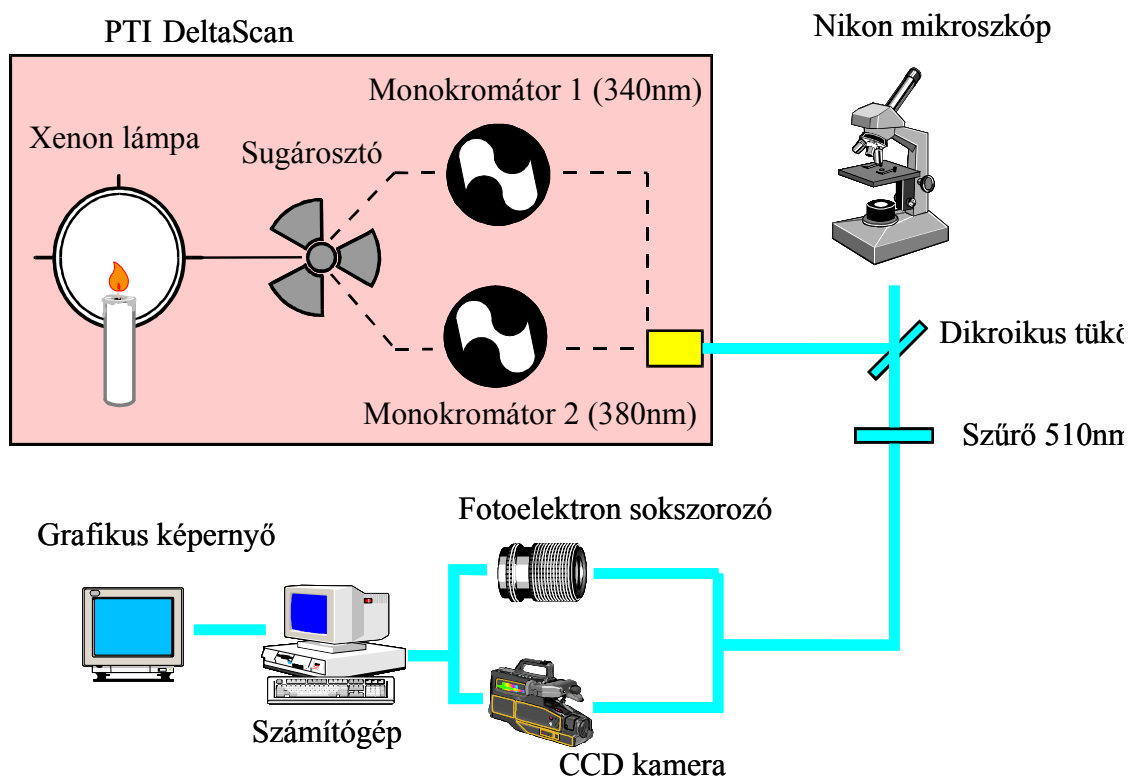
emésztettük, majd a frakciókat egyesítve, sejtszámolást követően a sejtszuspenziót 1%-os zselatinoldattal előkezelt, steril, üveg fedőlemezekre (savkezelt, hőlégsterilizált, 30 mm átmérőjű, 0,07 mm vastagságú; Mensel Glasser) szélesztettük. A tenyésztés első két napján a sejteket ebben a tápoldatban tartottuk, mely alacsony Ca^{2+} -tartalmánál és magas szérumtartalmánál fogva kedvez a sejtek osztódásának (Yasin és mtsai, 1977).

A tenyésztés 3. napján áttértünk a Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ra (DMEM; Sigma), mely humán tenyészet esetén 2% FCS-t, 2% HS-t, egér tenyészet esetében 4% lószérumot tartalmazott.

A tenyészetek fenntartása 5% CO_2 tartalom mellett 37°C -ra termosztált környezetben történt, a tápoldatot kétnaponta cseréltük.

III.2. Fluoreszcenciás $[\text{Ca}^{2+}]$ mérés

A méréseket 4-10 napos egér, illetve 7-14 napos humán tenyészetek sejtjein végeztük. Az eredmények kiértékelésénél figyelembe vettük a sejtek differenciáltsági fokát, melyet a sejtben található magok számával jellemeztünk. A sejtek feltöltéséhez 10 μM Fura-2-acetoxi-metilészter- (Fura-2 AM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), 75 μM pluronic (Sigma)-, és 150 nM neostigmin- (Pharmamagist, Bp. Mo.) oldatot használtunk. A töltés 37°C -on, 5% CO_2 tartalmú atmoszférában, 90 percig tartott. A mérések megkezdése előtt a sejteket szobahőmérsékleten ($22\text{--}24^\circ\text{C}$), normál Tyrode-oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 11,8 mM Hepes-NaOH, 1 g/l glükóz, pH: 7,4), tartottuk fél órán át, hogy a festék homogén eloszlását biztosítsuk. A festékkel feltöltődött sejteket tartalmazó tárgylemezt egy invertáló mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Japan) tárgyasztalára helyeztük. A sejtekbe juttatott festék megfelelő, 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését DeltaScanTM kettős monokromátoros berendezése (Photon Technology



5. ábra A PTI mérőrendszer felépítése

International, USA) biztosította. Fényforrásként a rendszer Xenon-lámpája szolgált, melynek fényét egy forgótükrös sugárosztó két nyalábra osztotta. A keletkező sugarak külön-külön monokromátoron haladtak át, melynek eredménye a méréseinkhez szükséges 340 illetve 380 nm hullámhosszúságú fénynyaláb. A monokromátorokból optikai szálak vezették el a fényt, ami egy csatoló egységen, valamint egy dichroikus tükrön keresztül jutott a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett sejtekre. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en, interferenciaszűrő közbeiktatásával, egy fotoelektron-sokszorozó (PMT) segítségével, 10 Hz mintavételi gyakorisággal detektáltuk (5. ábra). Az intracelluláris kalciumkoncentráció értékeket Grynkiewicz, Poenie és Tsien (1985) egyenlete alapján számítottuk:

$$[Ca^{2+}] = K_D * \beta * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \quad (1)$$

a 340 (F_{340}) és 380 nm hullámhosszon (F_{380}) mért fluoreszcenciaintenzitások hányadosából ($R=F_{340}/F_{380}$), felhasználva a már korábban mért (Bíró és mtsai, 1998) in vivo kalibrációs adatokat ($K_D=76$ nM, $R_{\min}=0,42$, $R_{\max}=8,6$, $\beta=15,3$). A háttérfluoreszcenciát a fedőlemezek sejtmentes helyein mértük, amit a program automatikusan levont a mért fluoreszcencia értékekből.

A vizsgált anyagokat perfúziós rendszer segítségével juttattuk a sejtek közvetlen közelébe. A méréseket normál Tyrode- illetve kalciummentes Tyrode-oldatban (összetétele megegyezett a normál Tyrode-oldat összetételével, de nem tartalmazott CaCl_2 -oldatot, viszont tartalmazott 5 mM EGTA-t) végeztük.

III.3. A kalcium fluxus számítása

A sejt intracelluláris terébe belépő kalciumionok származhatnak egyrészt az extracelluláris térből, másrészt a belső raktárakból. Az intracelluláris térbe jutó kalciumionokat a kalciumpumpák és a kalciumkötő fehérjék távolítják el. A megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentrációt kalciumérzékeny fluoreszcens festék segítségével közvetlenül mérni tudjuk. Az anyagmegmaradás törvénye értelmében a belépő, és az eltávolított kalcium mennyisége megegyezik a mért intracelluláris kalciumkoncentráció-változás mértékével. A kalciumkötő fehérjék koncentrációját, és kalciumkötő képességét korábban már megmérték (Schuhmeier és mtsai, 2003), így azt ismertnek tételeztük fel. A kalciumpumpa transzportsebességét a depolarizációval kiváltott kalciumtranziensek leszálló szárából, matematikai modell segítségével határoztuk meg. Tettük ezt azért, mert a depolarizáció olyan gyors és nagymértékű, hogy a kalciumtranziens leszálló szárán a feszültségfüggő csatornák már biztosan zárva vannak, vagy inaktiválódtak, nem történik rajtuk keresztül kalciumbeáramlás, a görbe ezen szakasza tehát a kalciumpumpák működését tükrözi.

Ennek bizonyítására 120 mM KCl-oldatot hosszú ideig adagoltunk. A rövid idejű KCl adagoláshoz képest sem a tranzienseken, sem a fluxusgörbéken nem tapasztaltunk eltérést. A kalciumeltávolító mechanizmusok paramétereinek, valamint magának a kalciumtranziensnek az ismeretében ki tudtuk tehát számolni a kalcium beáramlás sebességét, azaz a fluxust (F_I).

III.4. Ionáramok és membránpotenciálok mérése

Az izomsejtek ingerületi folyamatait patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében (whole-cell), szobahőmérsékleten tanulmányoztuk. A módszer előnyei, hogy az extra- és intracelluláris tér ionösszetétele egyaránt szabályozható, a diffúziós problémák minimálisak és az ingerületi folyamatokban részt vevő ionáramok elkülönítetten mérhetők. Méréseink során Axopatch 200A erősítőt (Axon Instruments, USA) használtunk, a mikropipettákat vékony boroszilikát üveg kapillárisokból (Bio Logic, Germany), izzítást követően készítettük. A mérésekhez használt, K⁺-aszpartát alapú belső oldattal (110 mM K-aszpartát, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM Hepes, 2 mM MgATP, pH 7,3, KOH-dal beállítva) feltöltött mikropipetták elektromos ellenállása 3-4 MΩ között volt. A sejtek ionáramait a mérőrendszer feszültség-rögzítés (voltage-clamp), míg a membránpotenciált áram-rögzítés (current-clamp) módjában detektáltuk. A sejtek elektromos ingerlését, a mintavételezést és az eredmények kiértékelését a pClamp 6.0.4 program (Axon Instruments, USA) segítségével valósítottuk meg. Az elektromos jelek mintavételezése 1 kHz-es gyakorisággal történt.

A sejtek passzív elektromos paramétereinek (kapacitás) meghatározásához 40 ms hosszú, -80 mV-os tartó (holding) potenciálról induló, 5 mV-os depolarizáló impulzust használtunk. A vizsgált sejtek lineáris kapacitása 100-600 pF volt. Az alkalmazott

oldatok cseréjét állandó sebességű perfúziós rendszerrel oldottuk meg. Az extracellulárisan alkalmazott ATP hatásait feszültség- és áram-rögzítés módban is nyomonkövettük. Előbbi esetben a tartó potenciált -80mV -on rögzítve az ATP jelenlétében kialakuló holding áram változását, mint ATP által kiváltott áramot (I_{ATP}) mértük. Áram-rögzítés módban az ATP hatására kialakuló membránpotenciál-változásokat, a depolarizáció mértékét vizsgáltuk.

III.5. A sejtosztódás és a differenciálódás vizsgálata

Az extracelluláris ATP sejtosztódásra, valamint differenciálódásra kifejtett hatásait egér primer izomsejttenyészeteken, a korábbiakban leírt módon (Boczán és mtsai, 2001) tanulmányoztuk. A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényekben tenyésztettük, az oldatot minden második nap cseréltük. Az ATP-t $180\text{ }\mu\text{M}$ koncentrációban alkalmaztuk, a tenyésztés 1. napjától a 3.-ig. Az exonukleotidázok jelenléte miatt az ATP tartalmú, szérummal kiegészített tápoldatot a kezelés ideje alatt naponta kétszer cseréltük. Az izomsejteket és a bennük található magok számát naponta, illetve a kezelés időtartama alatt naponta kétszer számoltuk, 2 fedőlemezen, fedőlemezenként 4 látótérben. A proliferáció mértékét a proliferációs rátával írtuk le, mely az izomsejtekben levő magok számának relatív változását mutatja. A differenciálódás mértékének jellemzésére kiszámítottuk a fúziós indexet (Fi), ami a többmagvú izomsejtekben található magok arányát mutatja az összes miogén maghoz viszonyítva. Az ATP kezelés hatását 4 független kísérletsorozatban vizsgáltuk. A fúziós index időfüggését a pontokra illesztett növekedési görbéből határoztuk meg

$$Fi = Fi_{\text{max}} / (1 + \exp\{-(t - t_{0,5})/k\}), \quad (2)$$

ahol Fi_{max} a fúziós index maximális értéke (felső határa = 1), a t a tenyészetben eltöltött napok száma, a $t_{0,5}$ az az idő, amikor az aktuális fúziós index megegyezik a fúziós index

maximális értékének felével, azaz a miogén magok fele van az izomcsövekben, a k pedig a meredekséget jellemző faktor.

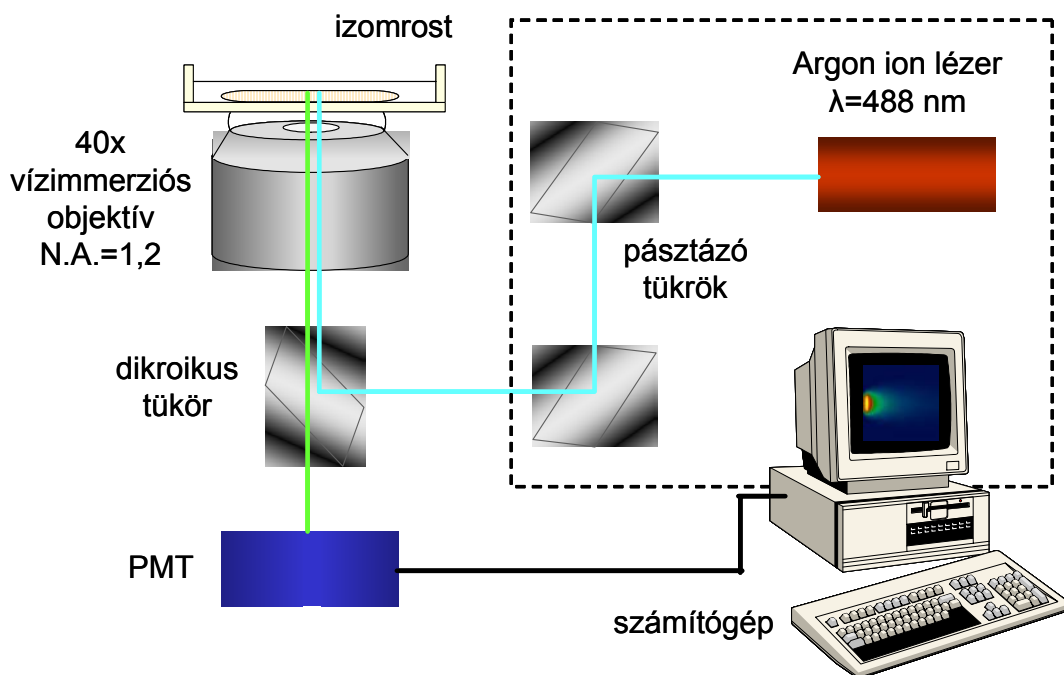
III.6. Immuncitokémia

A purinoreceptorokat és a PKC izoenzimeket immuncitokémiai módszerrel mutattuk ki. A tenyészeteket kalcium- és magnéziummentes foszfátpuffer oldattal (CMF-PBS, 136,75 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 50 µg/ml gentamicin, 300 mosm, pH: 7,2) háromszor átmostuk, majd 5 perces acetonos fixálást végeztünk. A fixálási folyamatot 30 percen keresztül alkalmazott 0,6% Triton X-100-at és 1% BSA-t (borjú szérum albumin) tartalmazó oldattal blokkoltuk. Ezután a sejteket egér dezmin ellenes antitesttel (1:100 DAKO, Glostrup, Denmark), valamint nyúlban termeltetett anti-PKC antitesttel (1:50 hígítás blokkoló oldatban, anti-PKC α , β , γ , ϵ , η , és ζ ; Sigma; anti-PKC δ , θ , λ /1 és μ ; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), illetve nyúlban termeltetett, poliklonális purinoreceptor ellenes antitesttel (epitópjuk az intracellulárisan elhelyezkedő C-terminálison található; 1:20 hígítás; Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael) inkubáltuk 1,5 órán keresztül. A fedőlemezeket háromszor mostuk foszfátpufferben (PBS, 136,75 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 0,49 mM MgCl₂*6 H₂O, 0,9 mM CaCl₂, 50 µg/ml gentamicin, 300 mosm, pH: 7,2). A mintákat ezt követően 1 órán át kecskében termeltetett, nyúl IgG ellenes, fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-konjugált antitesttel, majd 1 órán keresztül, lóban egér IgG ellen termeltetett, Texas Red-del jelölt, másodlagos antitesttel (Vector Labs., Burlingame, CA, USA) inkubáltuk (a hígítás mindkét esetben 1:300 volt). Az előbbi antitest a purinoreceptorok, illetve PKC izoenzimek, míg az utóbbi a differenciálódási marker dezmin jelölésére szolgál. Ismételt, PBS-ben történő mosást követően Vectashield-el fedtük a fedőlemezeket.

A specifikus antitestekkel és fluoreszcens festékekkel jelölt sejteket fluoreszcens mikroszkóppal (Eclipse E600, Nikon, Japan) vizsgáltuk.

III.7. Az elemi események nyomonkövetése

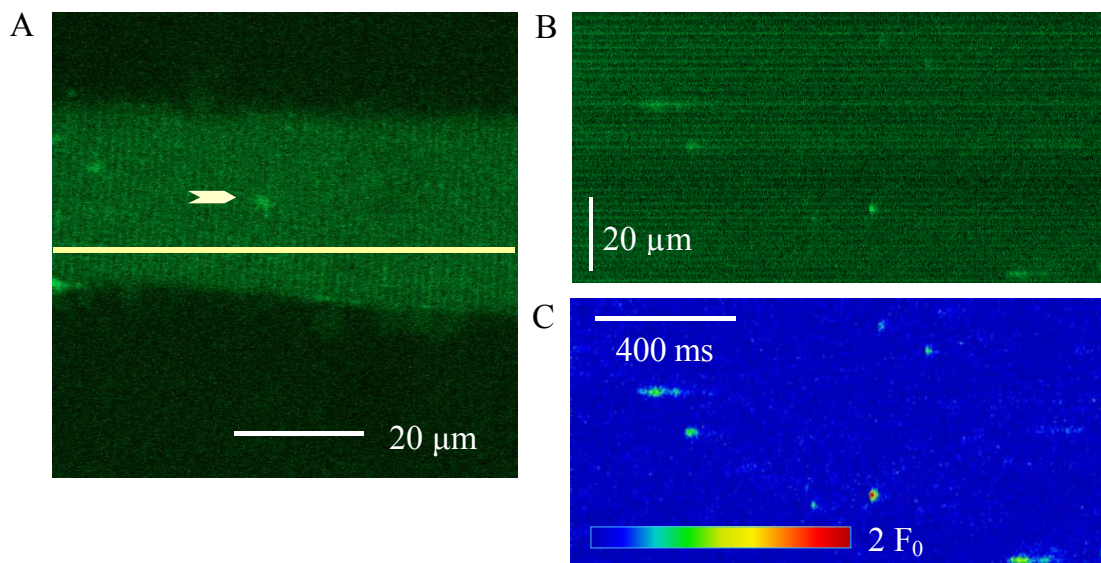
Kísérleteinkhez béka, valamint patkány hátsó végtagjaiból származó izomrostokat használtunk. Az állatokból altatás után kipreparáltuk a musculus semitendinosust, illetve az extensor digitorum communist, majd békák esetében mechanikus, patkányok esetében pedig enzimatisz izolálással (I. típusú kollagenáz, Sigma, 1-1 ½ óra, 37°C) egyedi izomrostokat nyertünk ki belőlük. Az izomrostot egy mérőkádba rögzítettük, majd 0,002% saponint tartalmazó K-glutamát alapú relaxáló oldattal (125 mM K-glutamát, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM Na₂-ATP, 10 mM Na-foszfokreatin, 10 mM glükóz, 0,13 mM CaCl₂ és 8% dextrán) 3 percig kezelve permeabilizáltuk a membránt. Annak érdekében, hogy a permeabilizálás folyamata nyomonkövethető legyen, a saponinos oldathoz kis mennyiségű (50 µM) Fluo-3 fluoreszcens festéket adtunk. Mikor a sejtmembrán permeabilizálódott, amit a festéknek a sejt intracelluláris terében történő megjelenése jelzett, glutamát-alapú oldattal mostuk a preparátumot. Ezután az oldatot lecseréltük egy káliumszulfát (95 mM K₂SO₄, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM Na₂-ATP, 10 mM Na-foszfokreatin, 10 mM glükóz, 0,13 mM CaCl₂, 8% dextrán és 0,1 mM fluo-3), illetve kálium-glutamát alapú belső oldatra majd a továbbiakban ebben az oldatban végeztük a méréseket. A spontán kialakuló elemi eseményeket egy pásztázó lézermikroszkóp (LSM 510, Zeiss, Oberkochen, Németország; 6. ábra) segítségével rögzítettük.



6. ábra A Zeiss LSM pásztázó lézermikroszkóp felépítése

A fluoreszcenciaintenzitásokat kétdimenziós pásztázás (7A ábra), illetve line-scan módszerrel (7B ábra) vizsgáltuk. Az előbbin a hely, az utóbbin a hely és az idő függvényében követhető nyomon a fluoreszcenciaintenzitásban bekövetkező változás. A line scan képek (x,t) 1,54 ms/line, 512 pixel/line (0,142 μm pixel méret) mérési paraméterekkel, 40X vízimmerziós objektív (numerikus apertúra 1,2, Zeiss) segítségével készültek, párhuzamosan a sejt tengelyével. A fluo-3 fluoreszcens festéket egy argon ion lézerrel gerjesztettük (488 nm-en, 5% lézerintenzitással), az emittált fényt szűrőkön keresztül összegyűjtöttük és 12 bit-en digitalizáltuk.

Az eredmények feldolgozása egy, az Élettani Intézetben kifejlesztett, automatikus detektáló program segítségével történt. Analizáláskor a program korrigálta a képen a fluoreszcens megvilágítás okozta fotokiolást. Ezt követően a kép elemi eseményt nem tartalmazó részein, ahol az intracelluláris kalciumkoncentráció és így a fluoreszcencia alacsony volt, meghatározta a fluoreszcencia minimum értékét (F_0).



7. ábra Az LSM rendszer képalkotása (A) Kétdimenziós pásztázás (xy), (B) line scan módszer (xt). Az xy képen jól kivehető a harántcsíkolatot mutató izomrost és a rajta megjelenő elemi események (az egyiket nyíllal jelöltük). A line scan kép a rost tengelyével párhuzamos vonal (az (A) ábrarészen sárgával jelölve) mentén készült. (C) Az automatikus elemző program által a (B) részen bemutatott képből készített hányadoskép. A bemutatott képen egy színskálán ábrázoltuk a fluoreszcencia hányados értékeket.

Ezzel elosztva a kép összes pontján mért fluoreszcencia intenzitásokat (F), kaptuk a normalizált értékeket (F/F_0). Ezt követően a program meghatározta azokat a területeket, melyek fluoreszcencia értéke a relatív küszöb felett volt, az ez alá eső értékeket zajnak tekintette, majd azokat a területeket tekintette tényleges elemi eseménynek, melyek amplitúdója nagyobb volt, mint $0,3 \Delta F/F_0$ (Cheng és mtsai, 1999). A bemutatott képen egy színskálán ábrázoltuk a fluoreszcencia hányados értékeket. A növekvő intracelluláris kalciumkoncentráció értékekhez növekvő fluoreszcencia értékek és a színskálán egyre melegebb színárnyalatok tartoznak (7C ábra). Az elemi események maximális amplitúdójának vonalában mért fluoreszcenciahányados értékeket külön görbéken tüntettük fel.

A program ezen kívül kiszámította az egyes elemi események jellemző paramétereit is, úgymint az amplitúdót ($\Delta F/F_0$), a maximális amplitúdó feléhez tartozó

térbeli szélességet (FWHM), valamint időtartamot (FTHM), az esemény időbeli hosszát és a csúcs eléréséhez szükséges időt (TTP) „spark”-ok és összetett eseményeknél, illetve az átlagos amplitúdót, az időtartamot és a FWHM-ot különálló „ember”-ök esetében.

III.8. Vegyszerek és statisztikai analízis

A fura-2 és fluo-3 fluoreszcens festékek a Molecular Probes Inc.-től (Eugene, OR, USA), a tripszin a Difco-tól (Detroit, MI, USA) a neostigmin Pharmamagist-tól (Budapest), az antibiotikumok a Biogal-tól (Debrecen), az antitestek a DAKO-tól (Glostrup, Denmark), az Alomone Labs.-tól (Jeruzsálem, Izrael), a SantaCruz Biotechnology Inc.-től, (Santa Cruz, CA, USA), valamint a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) származtak. A többi vegyszer a Sigma-tól került beszerzésre.

A statisztikai analízis során átlagértékeket és standard hibákat (S.E.) határoztunk meg. Szignifikáns változások kimutatására a Student-féle kétmintás t-próbát használtuk, $p < 0,05$ szignifikancia-szinttel.

IV. Eredmények

IV.1. Humán tenyésztett vázizomsejtek

IV.1.1 Az ATP hatásának vizsgálata

Humán tenyésztett vázizomsejteket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az extracellulárisan adagolt ATP tranziens $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedést váltott ki, melynek amplitúdója és kinetikája eltérést mutatott az izomsejtek különböző fejlettségi állapotaiban. A 8A és B ábrán két jellemző kinetikájú választ mutatunk be, melyet 180 μM ATP-vel - egy korábbi kísérletsorozatban megállapított biztosan telítő dózis - váltottunk ki. A tranziensek amplitúdója a több mint 5, de kevesebb, mint 10 centrális magot tartalmazó izomcsöveken volt a legnagyobb, ezért a reprezentatív görbéken bemutatott mérések ezen alakokon történtek. A kiváltott kalciumtranziensek leggyakrabban monoton emelkedést mutattak, viszonylag lassú felszállási meredekséggel. Különösen a fejlődésnek ebben a stádiumában azonban megfigyeltünk kétkomponensű válaszokat is, ahol a tranziensek egy korai gyors komponensből és egy késői, lassabb komponensből álltak. A korai komponenst nem mindig követte $[Ca^{2+}]_{ic}$ csökkenés, gyakoribb volt az az eset, amikor maga a felszálló szár volt kétfázisú, tehát

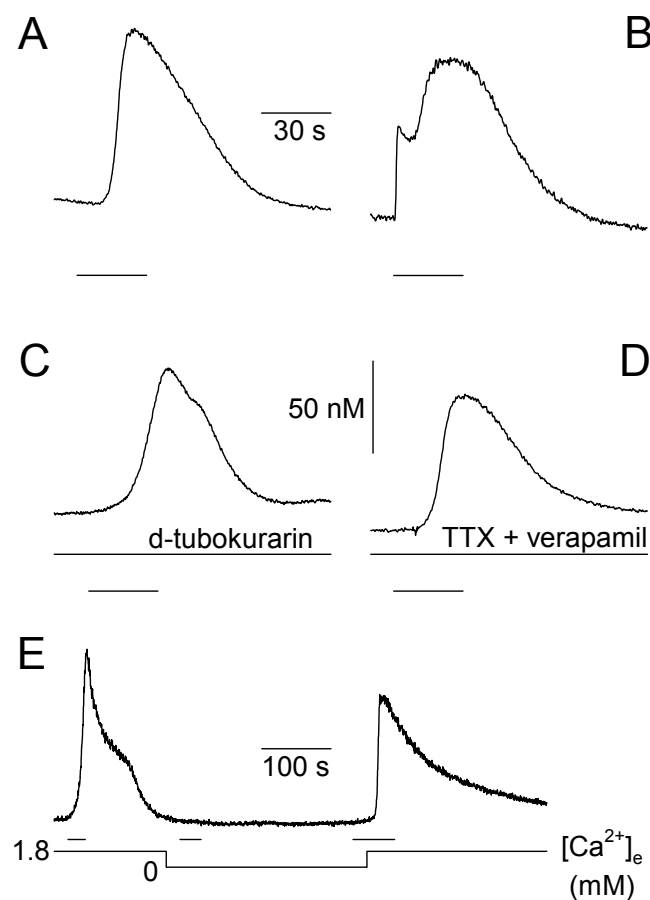
Fejlődési stádium	látencia (s)	a görbe felszálló szárának meredeksége (nM/s)	időállandó (s)
5-10 mag (n=31)	9,7 $\pm$ 0,7	26,7 $\pm$ 5,4	29,7 $\pm$ 2,3
>10 mag (n=14)	8,8 $\pm$ 0,8	14,1 $\pm$ 2,9	23,2 $\pm$ 2,0

1 táblázat. Az ATP által kiváltott kalciumjelek kinetikai paraméterei humán tenyésztett vázizomsejteken. Az időállandót a görbék leszálló szárára illesztett exponenciális függvényből határoztuk meg.

A bemutatott értékek az átlag $\pm$ standard hibát (SE) jelentik.

egy gyors, majd egy lassú emelkedés jellemezte. Ezt a gyors komponenst sem a fejlődés korai, sem a késői fázisaiban levő sejteken nem lehetett megfigyelni. A kalciumtranzienseket viszonylag hosszú látencia jellemezte. A jellemző paramétereket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A tranziensek másik jellemzője az volt, hogy a feszültségfüggő Na^+ -csatorna- (TTX), a nikotin típusú acetilkolin receptor- (d-tubokurarin) és a feszültségfüggő L-



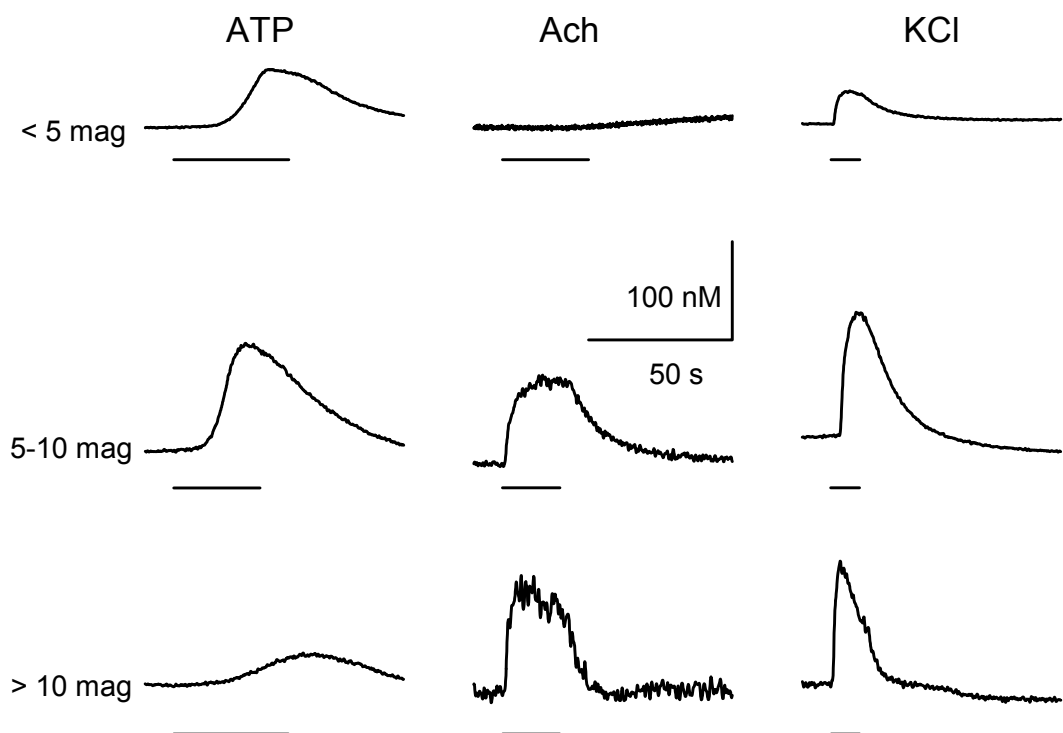
8. ábra 180 μM ATP alkalmazásával kiváltott kalciumtranziensek 5-10 magvú humán tenyésztett vázizomsejteken (A) Lassú válasz, melyet monoton emelkedés és viszonylag lassú felszállási meredekség jellemez. (B) Kétkomponensű válasz, a tranziens egy korai gyors és egy késői, lassabb komponensből áll. Sem 20 μM d-tubokurarin (C), sem 10 μM TTX és 100 μM verapamil (D) alkalmazása nem csökkentette az ATP által kiváltott válaszok nagyságát. (E) Az extracelluláris tér kalciumtartalmának elvonása alatt nem lehetett ATP adagolással $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést kiváltani. Ezen és a következő ábrákon a jelöletlen vízszintes vonalak az ATP adagolást jelzik. A görbéken a függőleges kalibráció megegyezik.

típusú kalciumcsatorna (Verapamil) gátlószereivel szemben nem mutattak érzékenységet (8C és D ábra). A kísérleteinkben alkalmazott 20 μM d-tubokurarin, illetve 100 μM verapamil alkalmazása sem csökkentette az ATP által kiváltott kalciumtranziens amplitúdóját (22 sejt esetében).

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a purinerg aktiváció hatására bekövetkező $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ megemelkedést okozó kalciumionok honnan származnak. Ennek vizsgálatára először eltávolítottuk a külső térből a kalciumot. Azt tapasztaltuk, hogy kalciummentes környezetben nem lehetett ATP-vel $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ változást kiváltani (8E ábra). Mivel a külső kalciumkoncentráció visszaállítása után, az újabb ATP adagolás hatására ismét megfigyelhető volt kalciumtranziens, ez arra utal, hogy a második, kalciummentes közegben adagolt ATP hatástalansága nem a jelátviteli folyamat deszenzitizációjából fakadt. Ismételt ATP adagolás során az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ változás kisebb mértékű volt, mint az első alkalommal, ami vagy egy lassú, kismértékű deszenzitizálódással, vagy a kalciumfelszabadító mechanizmusok kimerülésével magyarázható.

IV.1.2. Az ATP által kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ változás mértéke módosul az izomsejtek differenciálódásának függvényében

Már az első kísérletekből látszott, hogy az ATP által kiváltott válaszok nagysága és alakja függ a vizsgált izomsejtek fejlettségi állapotától. Az is korán kiderült, hogy a differenciálódás mértékét a sejtekben található magok száma jobban tükrözi, mint a tenyészetben eltöltött napok száma. Mint az a 9. ábrán látható, a kalciumtranziensek amplitúdója és kinetikája is változik a fejlődés előrehaladtával. Myoblastokon, valamint a kevesebb, mint 5 magvú myotubulusokon kisebbek és jellegzetesen lassúbbak a válaszok, a több mint 5 magot tartalmazó sejtek esetén a legnagyobb az amplitúdó és

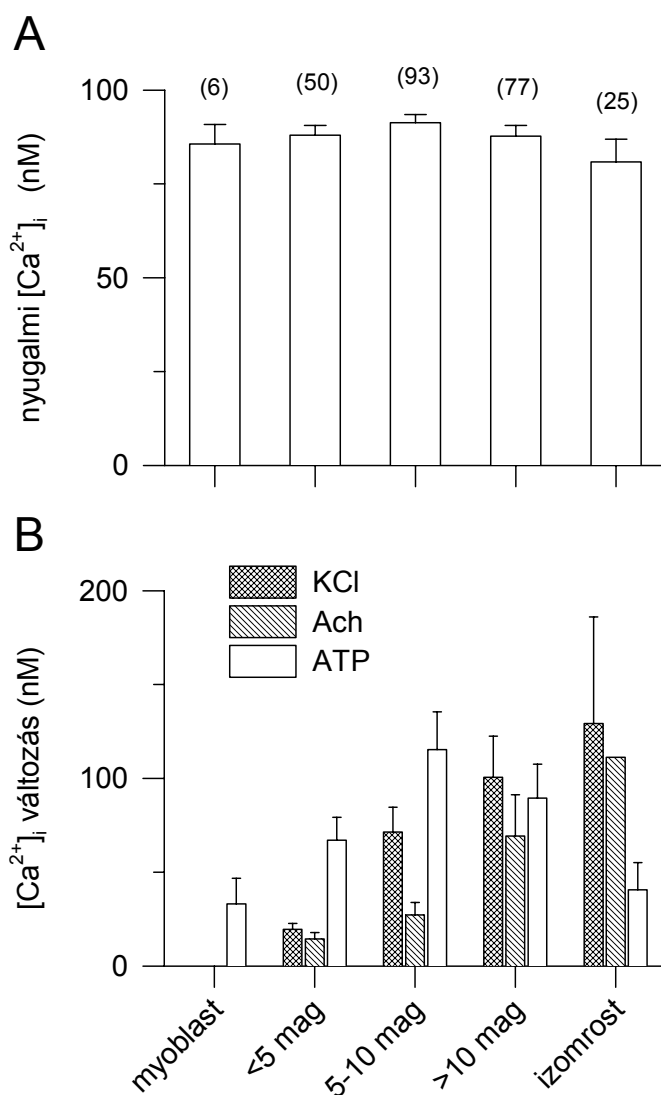


9. ábra 180 μM ATP, 20 μM Ach és 120 mM KCl oldat alkalmazásával kiváltott kalciumtranziensek differenciálódás-függő változásai. Figyeljük meg, hogy míg az acetilkolinnal és K^+ -depolarizációval kiváltott kalciumtranziensek amplitúdói egyre nőnek a sejtek fejlődésével párhuzamosan, ATP alkalmazása esetén a legnagyobb választ az 5-10 magvú sejtek esetében tapasztaltuk, majd ismét csökkent a kiváltható tranziensek amplitúdója.

gyakoriak a jellegzetes, kétfázisú tranziensek, majd a késői fejlődési fázisban levő, perifériás magokkal rendelkező izomrostok esetében csökkent a kiváltható válaszok amplitúdója. Eredményeinket összehasonlítottuk a 20 μM acetilkolin, illetve a 120 mM K^+ okozta depolarizáció által kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ változásokkal. Azt tapasztaltuk, hogy mind az acetilkolin, mind a depolarizáció esetében a válaszok amplitúdója a fejlődés előrehaladtával párhuzamosan nőtt, legnagyobbak a fejlett izomcsöveken mutatkoztak. Így, míg az ATP által kiváltott kalciumtranziensek korfüggése harangalakú, az acetilkolinnal, illetve a K^+ -depolarizációval kiváltott válaszok amplitúdója folyamatos növekedést mutatott (10B ábra), továbbá jól látható, hogy a myoblastok sem

acetilkolinra, sem K^+ -ra nem reagáltak, viszont az ATP kismértékű választ ezeken a sejteken is kiváltott. Míg az agonisták iránti érzékenység bizonyítottan függött a vizsgált sejtek differenciáltságától, a nyugalmi $[Ca^{2+}]_{ic}$ szintjéről ugyanez nem mondható el, értéke közel állandó, a 81 ± 6 és 91 ± 2 nM közötti tartományban volt (10A ábra).

Ezek a megfigyelések mutatják, hogy a humán vázizomsejtek alacsony nyugalmi

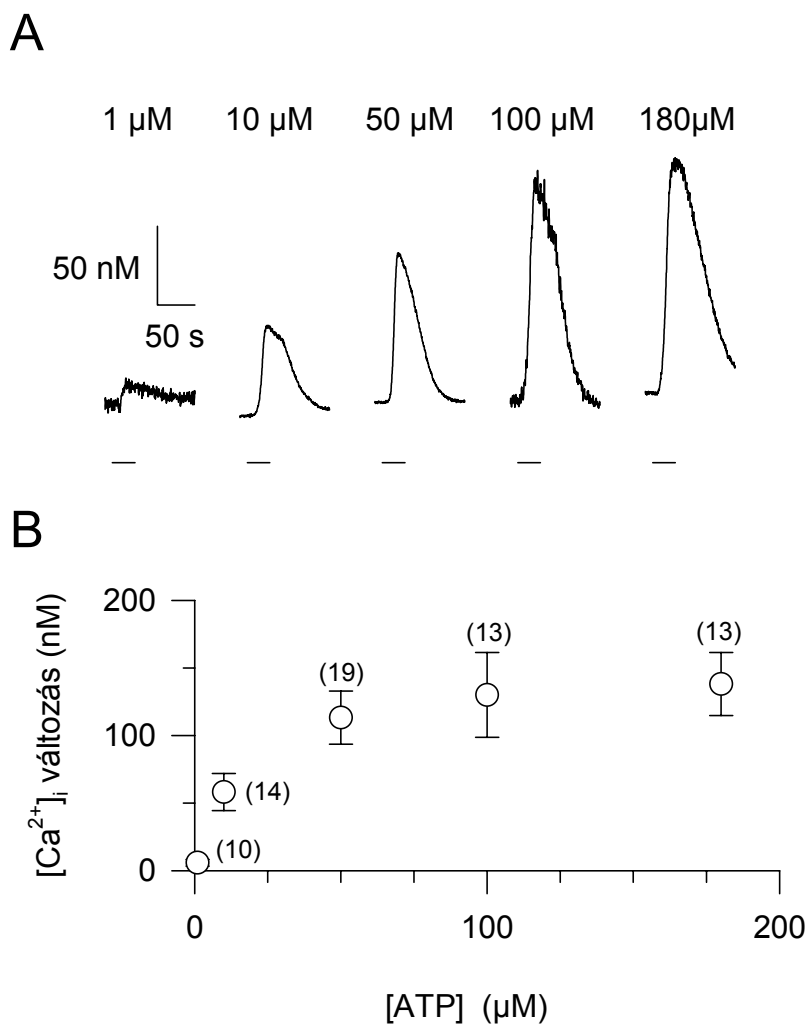


10. ábra (A) A nyugalmi intracelluláris kalciumkoncentráció, illetve (B) az ATP és az ACh alkalmazásával, valamint K^+ -depolarizációval kiváltott kalciumtranziensek átlagértékei a különböző fejlődési szakaszokban. Az ATP által kiváltott tranziensek korfüggése harangalakot mutat.

$[Ca^{2+}]_{ic}$ -val rendelkeznek, mely eredmény jó egyezést mutatott a korábban leírt, izolált (Struk és mtsai, 1998), illetve tenyésztett vázizomsejteken mért értékekkel (Benders és mtsai, 1997; Brown és mtsai, 1995; Censier és mtsai, 1998).

IV.1.3. Az ATP dózis-hatás összefüggése

Az ATP által kiváltott kalciumtranziensek koncentrációfüggését az agonista 1, és 180 μM közötti koncentrációkban történő adagolásával vizsgáltuk meg.



11. ábra Az ATP által kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ változások koncentrációfüggése. (A) 1, 10, 50, 100 és 180 μM ATP alkalmazásával kiváltott reprezentatív kalciumtranziensek. (B) Az ATP dózis-hatás görbéje.

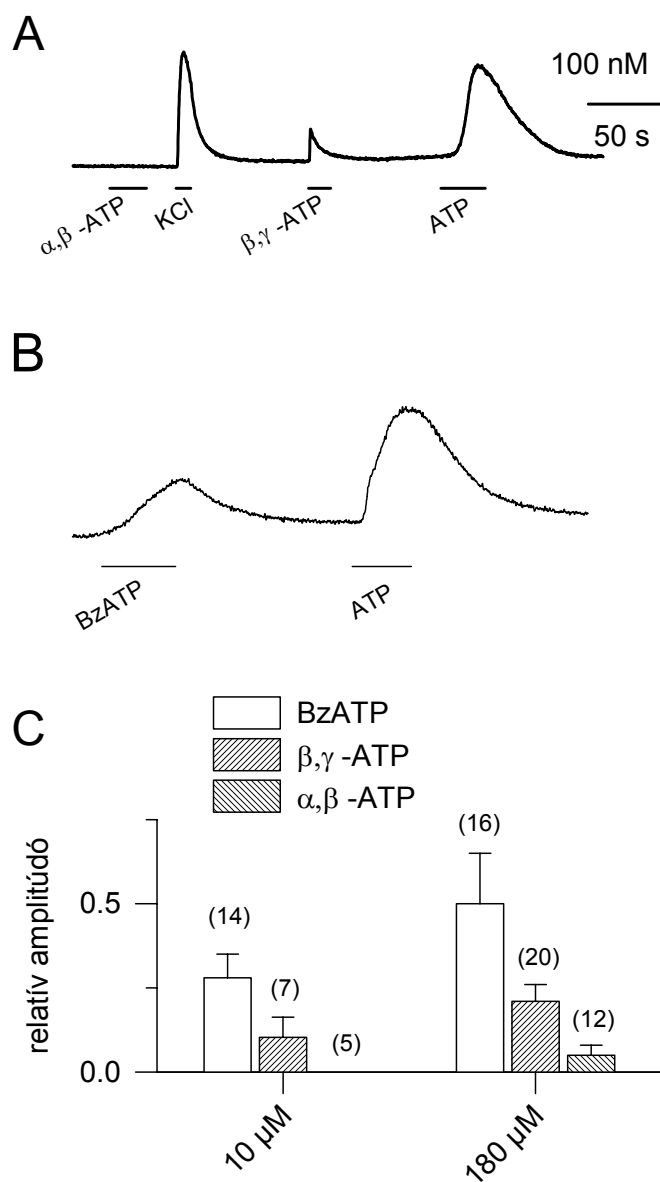
Mivel a legnagyobb amplitúdójú választ az 5-10 magot tartalmazó izomsejtek mutatták, a méréseket ilyen fejlettségi állapotú sejteken végeztük. Az esetleges deszenzitizáció okozta hibák elkerülése végett analizáláskor mindig csak az adott sejten mért, az ATP első adagolásával kiváltott tranziens amplitúdóját vettük figyelembe. A növekvő koncentrációjú ATP által kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ változások amplitúdóinak átlagát ábrázoltuk a koncentráció függvényében (11. ábra). A pontokat Hill egyenlettel megillesztve a félfhatásos dózis $16,1 \pm 0,5 \mu M$ -nak, a Hill-koefficiens pedig $1,0 \pm 0,1$ -nek adódott. Ez utóbbi érték az ATP kötőhelyek számára utal.

IV.1.4. *ATP analógok vizsgálata*

Következő kísérleteinkben az ATP különböző analógjainak hatását vizsgáltuk, összehasonlítva azokat az eddig bemutatott ATP hatásokkal (12. ábra).

Vizsgálataink alapján mind az α,β -metilén-ATP, mind a β,γ -metilén-ATP sokkal kevésbé bizonyult hatásosnak, mint az ATP (12A ábra). $180 \mu M$ -os koncentrációban az α,β - metilén-ATP a 12 vizsgált esetből 7-ben nem okozott mérhető $[Ca^{2+}]_{ic}$ változást. A β,γ - metilén-ATP hatásosabbnak bizonyult, a 20 vizsgált sejtéből 17 sejtben váltott ki kalciumtranzienseket, ám ezek amplitúdója sokkal kisebbnek bizonyult, mint az ugyanazon sejten alkalmazott ATP. Az α,β -metilén-ATP, valamint a β,γ -metilén-ATP adagolása nem okozott szignifikáns deszenzitizációt sem. Bár egy másik purinerg agonista, a 2'3'-O-(4-benzoil)benzoil-ATP (BzATP) sokkal hatásosabb volt, mint akár az α,β -, vagy β,γ -metilén-ATP, kísérleteinkben (12B ábra) ez sem váltott ki akkora hatást, mint maga az ATP. A $180 \mu M$ BzATP által kiváltott válaszok amplitúdója átlagosan a fele volt az azonos koncentrációban alkalmazott ATP által kiváltott válaszok átlagos amplitúdójának. α,β -metilén-ATP, valamint β,γ -metilén-ATP esetében ezek az

értékek 5, illetve 21%-nak adódtak (12C ábra). Alacsonyabb koncentrációban adagolva a vizsgált agonistákat a különbségek némileg kifejezettebbek voltak.



12. ábra ATP-analógokkal kiváltott reprezentatív kalciumtranziensek. (A) 180 μ M koncentrációban mind az α,β -metilén-ATP, mind a β,γ -metilén-ATP sokkal kisebb választ hozott létre, mint az azonos koncentrációban alkalmazott ATP. A vizsgált sejtek 58%-ánál az α,β -metilén-ATP nem váltott ki $[Ca^{2+}]_{ic}$ változást. (B) Bár a 3'-O-(4-benzoil) benzoilATP (BzATP) hatásosabbnak bizonyult, mint a másik két ATP-analóg, az általa kiváltott kalciumtranziensek sokkal kisebbek voltak, mint ATP esetében. (C) A különböző analógok relatív hatáserőssége. A kalciumtranziensek amplitúdóit az azonos koncentrációjú ATP alkalmazásával kiváltott tranziensek amplitúdójára normáltuk.

IV.2. Egér tenyésztett vázizomsejtek

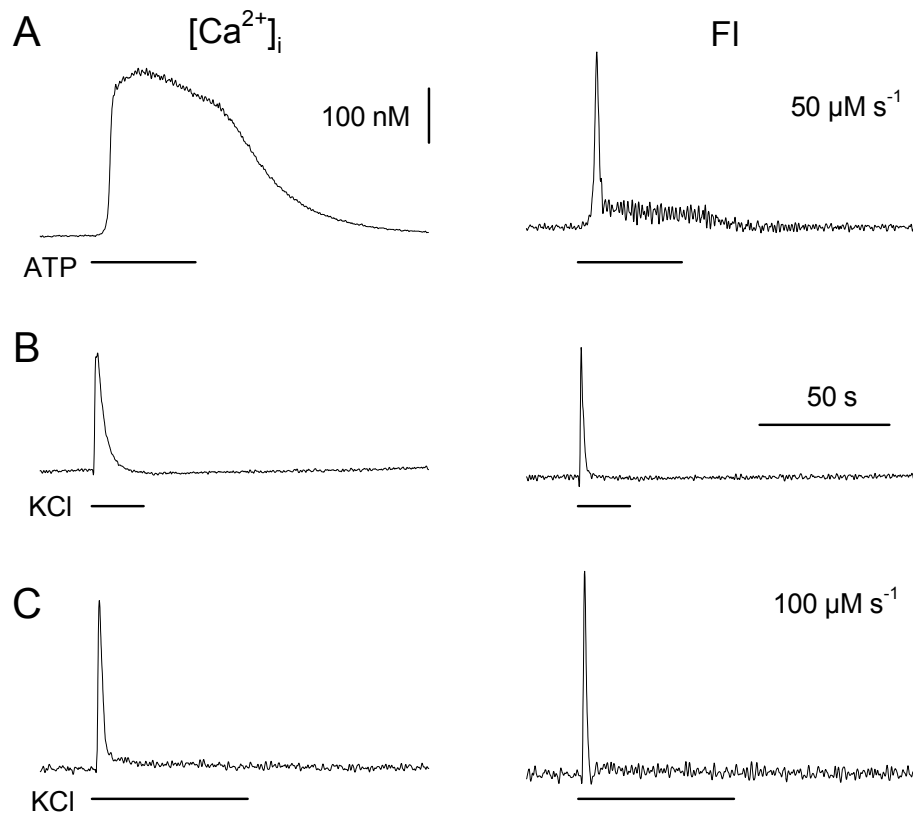
Miután sikerült kimutatnunk az ATP által aktivált purinoreceptorok jelenlétét humán tenyésztett vázizomsejteken, a további funkcionális vizsgálatokat egérből származó izomsejtek tenyésztetein folytattuk. Választásunk azért esett erre a fajra, mert egyrészt az egérizomból származó tenyészetek indítása tervezhető, míg a humán minták hozzáférhetősége esetleges, másrészt léteznek genetikailag módosított egértörzsek, így a genetikai módosítás és az ATP analógokra adott válasz közötti összefüggés is tanulmányozható. Ezen kívül fontos szempont volt az is, hogy a purinoreceptorokat kódoló emberi és egér gének között 83%-os a hasonlóság (Nawa és mtsai, 1998).

Először azt vizsgáltuk, hogy van-e hatása az ATP kezelésnek egér tenyésztett izomsejteken. Humán tenyésztett vázizomsejteken tapasztalt eredményekkel összevetve azt találtuk, hogy mind az ATP, mind pedig a KCl oldattal kiváltott depolarizáció hasonló alakú és nagyságú kalciumtranzienseket vált ki egér tenyésztett izomsejteken is (13. ábra). Különböző korú és fejlettségű sejteken alkalmazva az ATP-t, a humán izomsejteken előbb bemutatott korfüggést tapasztaltunk, azaz a kiváltható válaszok amplitúdója az izomsejtek differenciálódásával párhuzamosan nőtt, egészen az 5-10 magvú stádiumig, aztán ismét csökkenni kezdett. Ezek a megfigyelések megerősítettek azt a feltételezést, hogy az egér tenyésztett izomsejt jó modellje a humán vázizomtenyészetnek.

IV.2.1. Az ATP által kiváltott kalcium fluxus

Az ATP hatásmechanizmusának jobb megértése és feltérképezése érdekében megvizsgáltuk a kalciumionok sarcoplasmába történő belépésének sebességét, azaz a fluxust, hosszú ideig tartó depolarizációval, illetve ATP adagolásával kiváltott kalciumtranziensek esetében. A depolarizációt 120 mM KCl tartalmú extracelluláris

oldat alkalmazásával váltottuk ki. Az 13. ábrán 40 s hosszú ATP (13A ábra), illetve 20 (13B ábra), valamint 60 s-ig tartó KCl adagolás (13C ábra) hatására bekövetkező reprezentatív kalciumtranziensek láthatóak. Megfigyelhető, hogy mind a tranziens, mind az abból számolt fluxusgörbe alakja eltér ATP illetve KCl alkalmazásakor. K⁺-depolarizáció hatására egyfázisú, tranziens jellegű emelkedést tapasztaltunk, az $[Ca^{2+}]_{ic}$ még a KCl adagolása alatt, a depolarizáció megszűnése előtt visszatér a nyugalmi szintre. Ez a feszültségfüggő folyamatok gyors aktiválódásával, valamint



13. ábra Egér tenyésztett vázizomsejteken (5-10 mag) mért reprezentatív kalciumtranziensek (az ábra bal oldalán) és a belőlük számolt fluxusok (jobb oldali oszlop). (A) 40 s-ig tartó 180 μ M ATP, (B) 20 s-ig, illetve (C) 60 s-ig tartó 120 mM KCl alkalmazásával kiváltott válaszok. Megfigyelhető, hogy az ATP jelenlétében jellegzetesen kétfázisú a fluxus. Egy gyors, kezdeti tranziens emelkedést, mely nagyon hasonló a K-ionok által kiváltott fluxushoz, egy másik, fenntartott szakasz követ, mely az ATP jelenlétében végig megmarad. K⁺-depolarizáció hatására a második, fenntartott szakasz még a KCl tartós jelenlétében sem figyelhető meg. A kalciumpumpa maximális sebessége (PV_{max}) 394 μ M s⁻¹-nek adódott.

inaktiválódásával magyarázható. ATP esetén jellegzetes kétfázisú választ figyelhetünk meg. A gyors, kezdeti emelkedést ($Fl_{csúcs}$), mely nagyon hasonló a K-ionok által kiváltott fluxushoz, egy fenntartott szakasz követ ($Fl_{fenntartott}$), mely az ATP jelenlétében végig megmarad. A fluxus az ATP adagolása után sem szűnik meg azonnal. Az ábrán látható görbe esetében a fluxus maximális amplitúdója $125 \mu M/s$, a csúcs eléréséhez szükséges idő $5,8 s$, míg a félrelaxációs idő $0,9 s$ volt. A fluxus fenntartott komponense átlagosan a csúcs 11%-ának adódott, ami $15 \pm 4 \mu M/s$ sebességű kalciumbeáramlást jelent a myoplasmatikus térbe.

IV.2.2. Az ATP által kiváltott fluxus jellemző tulajdonságai változnak a fejlődés során

A fejlődés és differenciálódás különböző stádiumaiban levő sejteken alkalmazva az ATP-t, a kiváltott kalciumtranziensek, és így a fluxusgörbék paramétereiben és kinetikájában jelentős különbségek voltak megfigyelhetők. Ezt a jelenséget mutatja be a 14. ábra, ahol a bal oldalon ATP adagolásával kiváltott reprezentatív kalciumtranzienseket, míg jobb oldalt az ezekből számított fluxusgörbéket tüntettük fel különböző korú tenyészetekből származó sejtek esetében. Myoblastokon általában nem lehetett ATP alkalmazásával tranziens jellegű $[Ca^{2+}]_{ic}$ változást kiváltani (az ábrán nem került bemutatásra). A fejlődés kezdeti stádiumában levő, néhány magot tartalmazó sejteken (14A ábra), az ATP adagolás elején hirtelen megnő az intracelluláris kalciumkoncentráció, majd az ATP jelenlétében, bár alacsonyabb szinten, de folyamatosan fennmarad és csak miután a szer kimosódott a sejt közvetlen környezetéből, azután tér vissza a nyugalmi szintre. Ez a jellegzetes változás mind a kalciumtranziensek esetében, mind a számított fluxusgörbéken megfigyelhető volt. Az ábrán jól látható, hogy a fejlődéssel párhuzamosan először nő a tranziensek amplitúdója, majd megváltozik az alakja is. Az 5-10 magvú izomcsövek (14B ábra) esetében a tranzienseken, de főként a fluxusgörbéken a két, előzőekben bemutatott fázis egyre

jobban elkülönül. Ez egyrészt megnyilvánult abban, hogy a fluxus korai komponense keskenyebb lett, melyet a félértékszélesség (Fl_{HW}) csökkenése is mutat (2. táblázat),

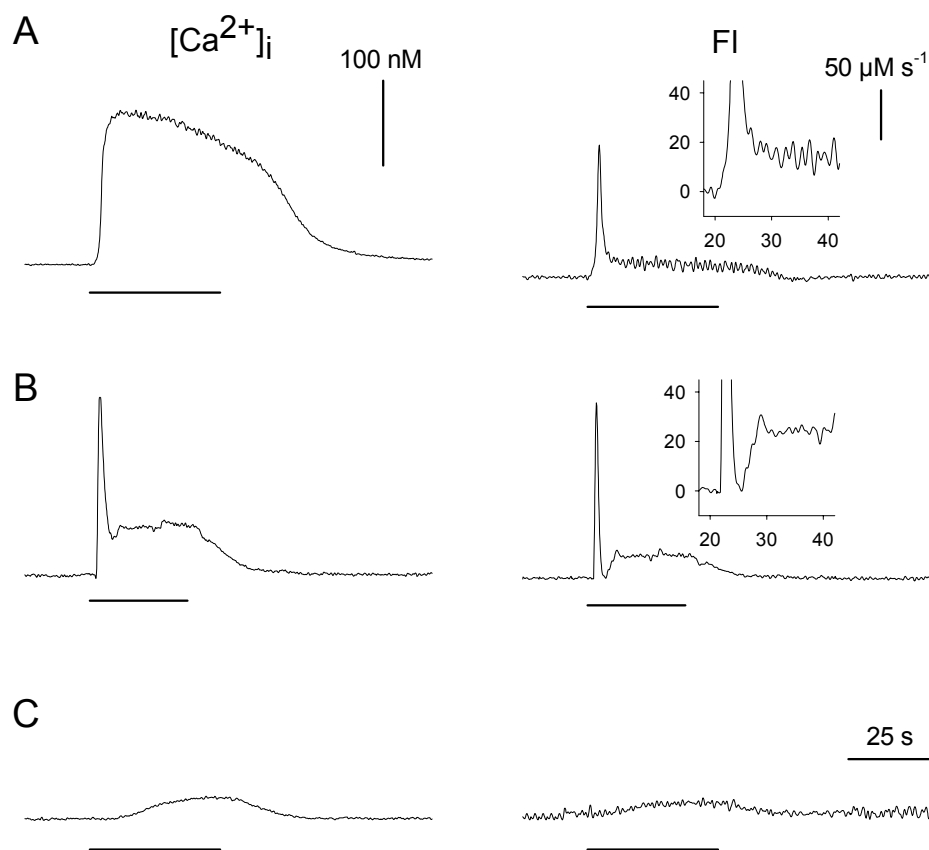
Fejlődési állapot	< 5 mag (35)	5-10 mag (27)	> 10 mag (23)
$\Delta[Ca^{2+}]_{ic}$ (nM)	264±27	64±20	34±9
$Fl_{csúcs}$ (μMs^{-1})	74±22	72±13	-
$Fl_{fenntartott}$ (μMs^{-1})	17±3	15±4	18±4
Fl_{HW} (s)	4,8±0,5	1,3±0,1	-
Csúcs eléréséhez szükséges idő (s)	17±2	2,6±0,7	-

2. táblázat. Az ATP által kiváltott kalcium fluxusok jellemző paraméterei különböző fejlettségű izomsejteken. A zárójelekben levő számok a vizsgált sejtek számát mutatják.

valamint abban, hogy a tranziens jellegű komponens és az őt követő fenntartott szakasz időben egyre jobban elvált egymástól (14. ábra kinagyított részletei).

Differenciáltabb sejteken (14B ábra) a két komponens teljesen elkülönül egymástól, olyannyira, hogy az első komponens lezajlása után az intracelluláris térbe történő kalciumbeáramlás teljesen megszűnik, majd csak ezután kezd el kifejlődni a második, fenntartott komponens. Az egészen nagy, sokmagvú, differenciált sejteken a kiváltható válaszok amplitúdója csökken (14C ábra), a nagy myotubulusok és az izomrostok 25%-a nem is reagált az ATP kezelésre.

A fluxusgörbéken látható első komponens kinetikájában nagyon hasonlít a K-depolarizációval kiváltott fluxushoz. Ez a kinetikai hasonlóság valószínűleg azzal magyarázható, hogy az ionotróp purinerg receptorokon keresztül a sejtbe áramló kationok depolarizálják a membránt. A második, fenntartott fázis az ATP adagolása

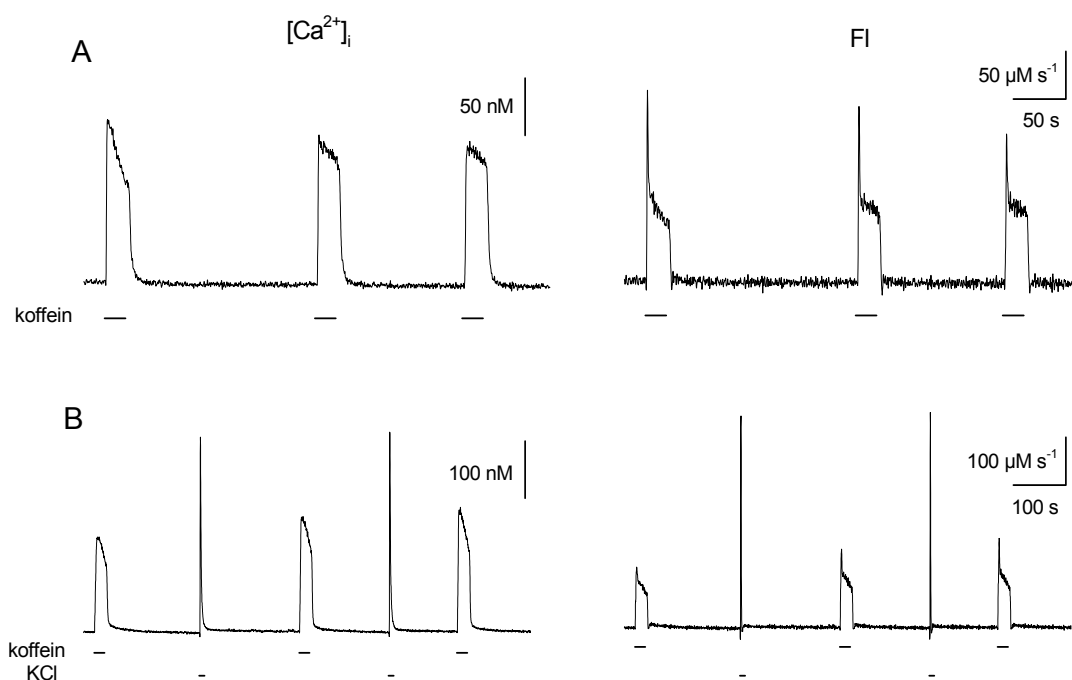


14. ábra ATP által kiváltott kalciumtranziensek és fluxusok különböző differenciálódási stádiumban levő egér tenyésztett vázizomsejteken. (A) Kevesebb, mint 5 maggal rendelkező, (B) 5-10 magvú, (C) több, mint 10 magvú izomsejteken mért reprezentatív kalciumtranziensek és a belőlük számolt fluxusok. A nyugalmi $[Ca^{2+}]_{ic}$, illetve PV_{max} rendre 120, 82 és 54 nM, valamint 63, 91 és 198 $\mu M s^{-1}$ a három eltérő fejlettségű sejten. Az (A) és (B) ábrán feltüntetett kis ábrarészek a fluxus kezdeti szakaszának kinagyított részletét mutatják. A (B) ábrán a korai csúcs után egy tisztán elkülöníthető második emelkedés figyelhető meg.

alatt folyamatosan fennmaradt és csak lassan szűnt meg. Ez azzal magyarázható, hogy a P2X receptorok ez idő alatt végig nyitva voltak, így a rajtuk keresztül beáramló, valamint az intracelluláris raktárakból felszabaduló kalciumionok okozták a lassú és kismértékű intracelluláris kalciumkoncentráció-emelkedést.

IV.2.3. Az ATP ismételt adagolásának hatása

Ahhoz, hogy az ATP adagolásával kiváltható válaszok farmakológiai vizsgálatát el tudjuk végezni, tudnunk kellett, hogy az egyes anyagok ismételhető válaszokat váltanak-e ki tenyésztett vázizomsejteken. Ennek kiderítésére először azt vizsgáltuk meg, hogy vajon a K^+ -depolarizációval, 5 mM koffeinnel, valamint 180 μM ATP-vel kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedés változik-e a második, illetve a harmadik adagolást követően az első tranzienshez képest (15. ábra). Mint a 15A ábrán látható, a koffein ismételt adagolásával hasonló nagyságú válaszokat lehetett kiváltani, a második, illetve a harmadik tranziens relatív amplitúdója, az első tranzienshez viszonyítva rendre 0,87

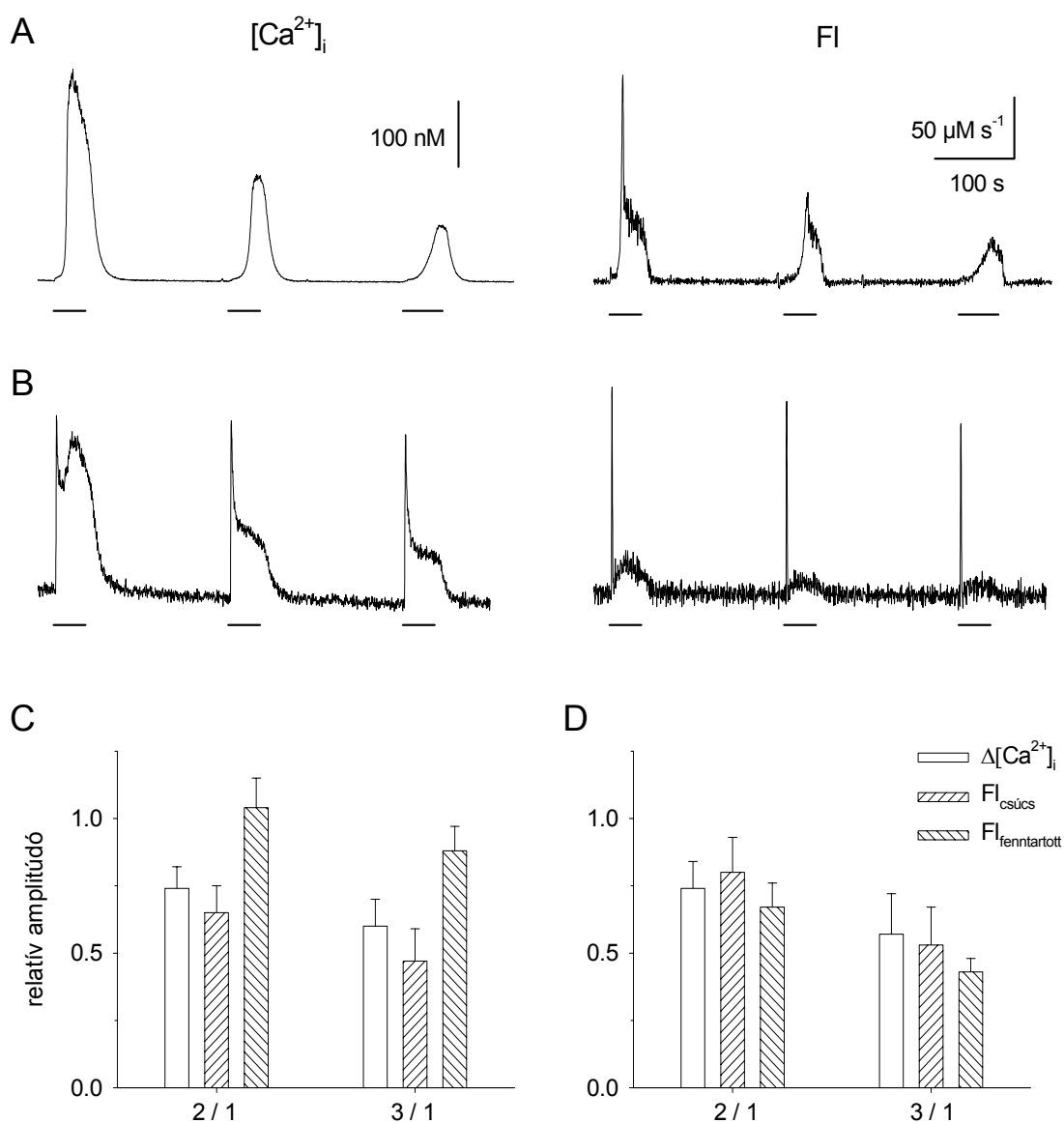


15. ábra Koffein, illetve KCl ismételt adagolásával kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ és fluxus. (A) 15 mM koffein 20 s hosszú ismételt alkalmazásával a kiváltható válaszok amplitúdói kismértékben csökkentek. (B) Ha a koffeint 120 mM KCl (10 s) oldattal felváltva adagoltuk a sejtet körülvevő extracelluláris térbe, a válaszok amplitúdója nem csökkent, sőt, kismértékű emelkedést lehetett megfigyelni. A kalciumpumpa maximális sebessége (PV_{max}) 559, illetve 499 $\mu M s^{-1}$ -nek adódott a két vizsgált sejt esetében.

valamint 0,81 volt a vizsgált esetben. A koffeinnel kiváltott tranziensekből számított fluxusok az ATP által kiváltott fluxusgörbékhez hasonlóan kétkomponensűek, egy korai, tranziens emelkedést egy kisebb amplitúdójú, lassan csökkenő szakasz követ, mely a koffein adagolása alatt végig fennmarad, utána pedig gyorsan lecsökken. Az ismétlés hatására bekövetkező amplitúdóbeli csökkenés nemcsak a kalciumtranzিয়েsen volt megfigyelhető, hanem a fluxusok esetében is. Koffein jelenlétében a korai csúcs kismértékben csökkent (relatív amplitúdó a második tranziens esetében átlagosan $0,88 \pm 0,12$ -nek adódott $n=7$), a fenntartott fluxus nem változott szignifikánsan ($1,09 \pm 0,11$). A csúcserték kismértékű csökkenését valószínűleg a sarcoplasmaticus reticulum kalciumtartalmának kismértékű csökkenése okozhatta. Ezzel szemben a depolarizációval kiváltott kalciumtranzিয়েsek amplitúdói és a fluxusgörbék csúcsai kismértékben növekedtek. Ez arra utal, hogy a depolarizáció által aktivált csatornák rövid idő alatt visszatérnek az újra aktiválható állapotba, a rajtuk keresztül beáramló kalciumionok kismértékben töltik a raktárakat is, így a következő depolarizációval nagyobb mennyiségű kalciumion lesz felszabadítható. Ennek az elképzelésnek az ellenőrzésére a koffein- és a KCl-oldatot felváltva alkalmaztuk. Várakozásunknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy mind a koffeinnel, mind a depolarizációval kiváltott tranziensek és a belőlük számított fluxusgörbék amplitúdója kismértékben nőtt (15B ábra). Feltételezhető tehát, hogy a depolarizáció alatt beáramló kalciumionok feltöltik az intracelluláris raktárakat, így egyre nagyobb mennyiségű kalcium válik felszabadíthatóvá az SR-ből.

Ezután megvizsgáltuk az ATP-vel kiváltott kalciumtranzিয়েs ismételhetségét (16. ábra). A különbség kifejezettebb a fiatal, kevesebb, mint 5 magot tartalmazó sejthalakokon (16A és C ábra), mint a differenciáltabb, 5-10 magvú sejteken (16B és D ábra). A differenciálódás korai szakaszában a második ATP adagolás hatására átlagosan

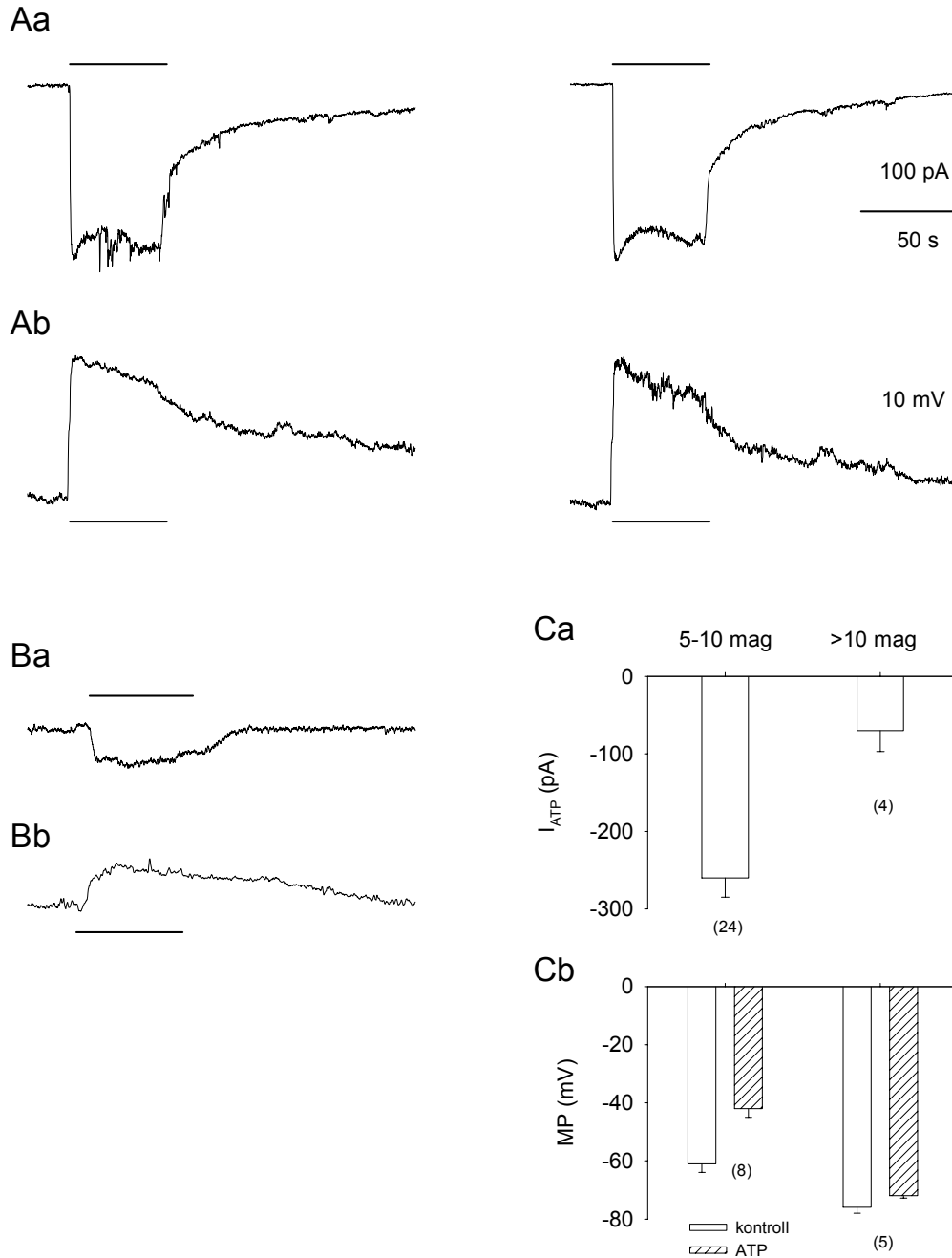
26±8, míg a harmadik alkalmazást követően 40±10%-kal csökkent a kiváltható kalciumtranziensek nagysága az első adagolás hatására kialakuló válaszhoz viszonyítva. A fluxusgörbék alakja is megváltozott. Mint a 16A ábrán látható, a korai, gyors, tranziens jellegű csúcs lecsökken, a változás átlagosan 35±10 illetve 53±12%, a fenntartott komponens amplitúdója viszont alig változik (4±11 és -12±9%-os a csökkenés). Differenciáltabb sejteken, ahol a legnagyobb az ATP-vel kiváltható $[Ca^{2+}]_{ic}$ változás, a kalciumtranziensek amplitúdója csak kismértékben csökken, viszont a fluxusgörbék nagysága és alakja megváltozik, a korai csúcs és a fenntartott szakasz amplitúdója egyaránt csökken (16D ábra).



16. ábra ATP ismételt adagolásával kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ és fluxus. A 180 μM ATP oldatot 40s hosszan alkalmaztuk a kevesebb, mint 5 maggal rendelkező (A), valamint az 5-10 magvú egér tenyésztett vázizomsejteken (B). A számolt fluxus (PV_{max}) 117, illetve 142 $\mu M s^{-1}$ volt, a bemutatott sejtek esetében. (C és D ábra) Az oszlopdiagrammokon az intracelluláris kalciumkoncentráció változások ($\Delta[Ca^{2+}]_{ic}$), valamint a fluxus korai, csúcs ($FI_{cs\acute{u}cs}$) és fenntartott komponenseinek ($FI_{fenntartott}$) első tranziensre normált értékeit tüntettük fel (átlag $\pm$ SE) a kevesebb, mint 5 (C), illetve az 5-10 maggal rendelkező (D) izomcsövek (5-5 vizsgált sejt) esetében.

IV.2.4. *ATP hatása az inward áramokra és a membránpotenciálra*

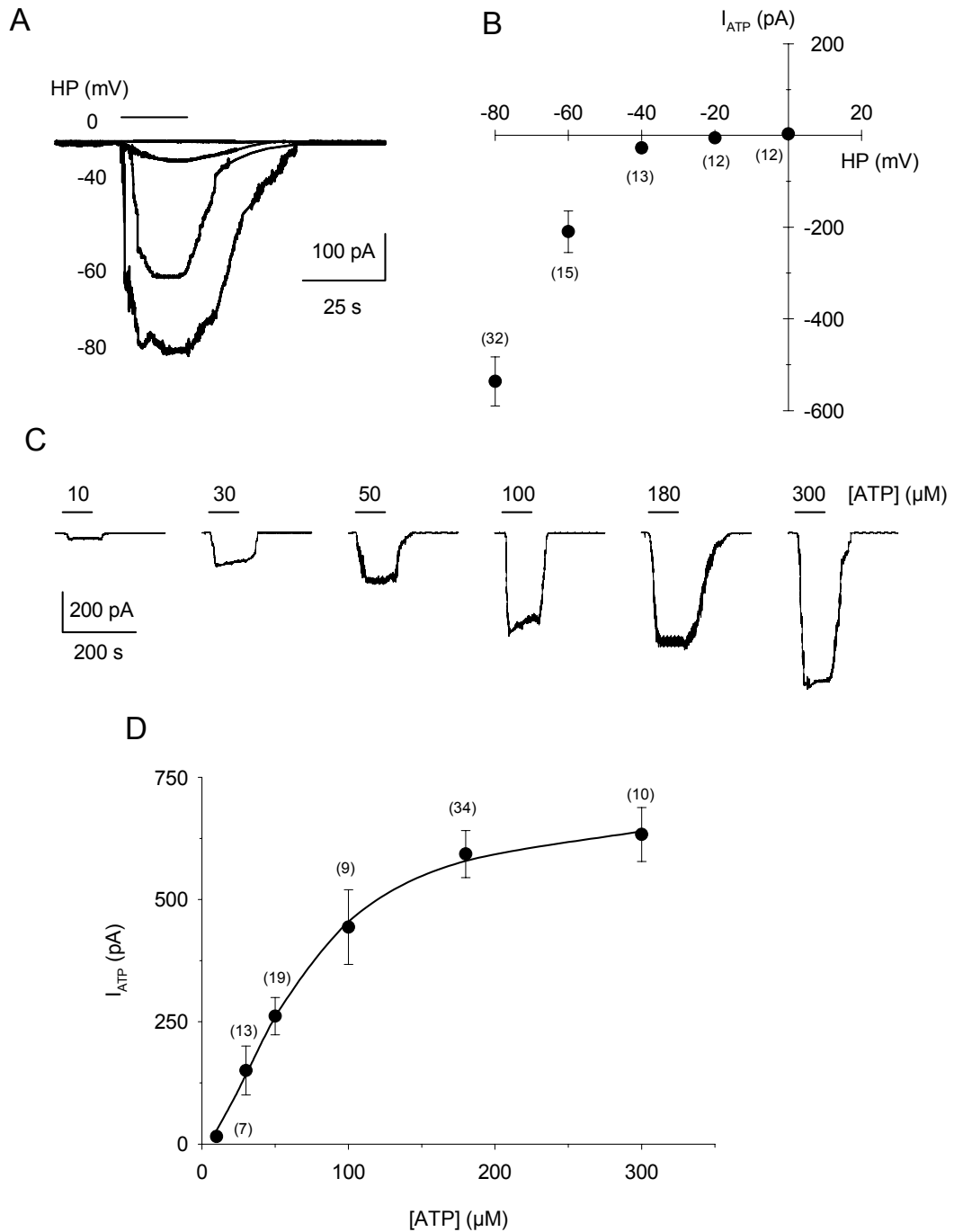
Mint azt korábban, tenyésztett humán vázizomsejteken megállapítottuk, és mint azt embrionális emlős vázizomsejteken is leírták (Collet és mtsai, 2002), az ionotróp P2X receptorokon keresztül befelé irányuló áramok aktiválódnak. Ezen útvonalak deszenzitizálódása magyarázhatja a kalciumbeáramlásban megfigyelt csökkenést. Az ATP által kiváltott áramok (I_{ATP}) meghatározásához a patch clamp technika teljes sejtes konfigurációjában, feszültség-rögzítéssel összárámokat mértünk. A 17 és a 18. ábra az ATP hatását mutatja a különböző differenciáltságú sejtek transzmembrán áramaira és membránpotenciáljára. Az 17A ábrán egy olyan, 5-10 magvú sejten regisztrált, demonstratív áramgörbe látható, ahol a 20 másodpercig tartó ATP adagolás hatására egy fenntartott, befelé irányuló (inward) áram alakul ki, melynek amplitúdója nem csökken a szer ismételt adagolásakor sem. Az általunk vizsgált 6 myotubuluson a második áramcsúcs relatív amplitúdója az első $97 \pm 12\%$ -a volt. A több, mint 10 centrális maggal rendelkező izomcsöveken az így kiváltható áramok jóval kisebbek (17Ba ábra). Átlagosan, -60mV-os tartó potenciál mellett, a kevésbé differenciált sejteken az ATP által kiváltott áramok 250 pA-nél is nagyobbak, míg kevesebb, mint 100 pA-nek adódtak a fejlődés későbbi szakaszában levő izomcsöveken (17Ca ábra). Ezeken a sejteken ugyanakkor, áram-rögzítés módban, membránpotenciál változásokat is mértünk (17Ab és Bb ábrarészek). Az már régóta ismert, hogy az izomsejtek membránpotenciálja változik a fejlődés előrehaladtával.



17. ábra ATP jelenlétében kialakuló áram- és membránpotenciálváltozások. (A) 5-10 magvú egér tenyésztett vázizomsejteken mért reprezentatív görbék. (Aa) Az ATP két, egymást követő, 20 s ig-tartó alkalmazása alatt mért összáramok (I_{ATP}). A sejt kapacitása 173 pF volt. (Ab) A sejten ugyanakkor, áram-rögzítés módban, membránpotenciál (MP) változást is mértünk. A nyugalmi membránpotenciál -62 mV-nak adódott. (B) Az előzőekhez hasonlóan megmértük az I_{ATP} és a MP-t több, mint 10 magot tartalmazó, differenciált sejteken. Az itt bemutatott sejt nyugalmi membránpotenciálja -76 mV, kapacitása 511 pF volt. (C) Azonos körülmények közt mért I_{ATP} (Ca) és MP (Cb) átlagértékeit oszlopdiagrammokon tüntettük fel. A differenciálódás előrehaladtával nyugalmi membránpotenciál értéke egyre negatívabb értékeket vesz fel, ATP hatására pedig egyre kisebb I_{ATP} és a MP változásokat figyelhetünk meg.

Ezt méréseink is alátámasztották, fiatal sejteken a nyugalmi membránpotenciál értéke -61 ± 3 mV, idősebb sejtek esetében pedig -76 ± 3 mV-nak adódott, azaz a differenciáltabb sejthalakok nyugalmi membránpotenciálja negatívabb, hiperpolarizáltabb volt a kevesebb maggal rendelkező sejtekéhez képest. Ugyanakkor az ATP által kiváltott membránpotenciál-változás (17Cb ábra) fiatal sejteken körülbelül 20 mV-os, a differenciáltabb sejthalakokon kevesebb, mint 5 mV-os volt. Az is megfigyelhető, hogy az ATP ismételt adagolásával sem a kiváltható áramok, sem a membránpotenciál változások nagysága nem csökkent jelentősen.

A P2X receptoron keresztül megvalósuló jelátviteli folyamatok további karakterizálásához megvizsgáltuk az ATP hatására bekövekező áram feszültség- és koncentrációfüggését (18. ábra). A tartási potenciált -80 mV-ról, 20 mV-os lépésenként emeltük 0 mV-ig, és az ily módon -80 , -60 , -40 , -20 és 0 mV-ra mesterségesen beállított membránpotenciálú sejten vizsgáltuk az ATP hatását (18A ábra). Az áram-feszültség összefüggést 12-32 sejt átlagértékeiből szerkesztettük meg (18B ábra). Az ATP adagolásával kiváltott áramok a vizsgált tartási potenciálokon befelé irányulók voltak, ami arra utal, hogy ez egy nem specifikus kationáram, mely a P2X receptorokra jellemző, befelé egyenirányító karakterisztikával bír. A 18C és D ábra mutatja be az I_{ATP} koncentrációfüggését 10 és 300 μ M-os koncentrációtartományban. A méréseket olyan sejteken végeztük, melyek a legnagyobb $[Ca^{2+}]_{ic}$ változást mutatták. A 18C ábra egy-egy jellemző mérési eredményt mutat. Figyeljük meg, hogy az áram kinetikája nem függött az alkalmazott koncentrációtól. A 18D ábrán, 7-34 sejten mért áramgörbék amplitúdóinak átlagértékei láthatók, minden vizsgált ATP koncentráció esetében. A dózis-hatás görbe illesztése után a félhatásos dózis (EC_{50}) 68 ± 5 μ M-nak, a Hill koefficiens pedig $1,66 \pm 0,14$ -nak adódott.



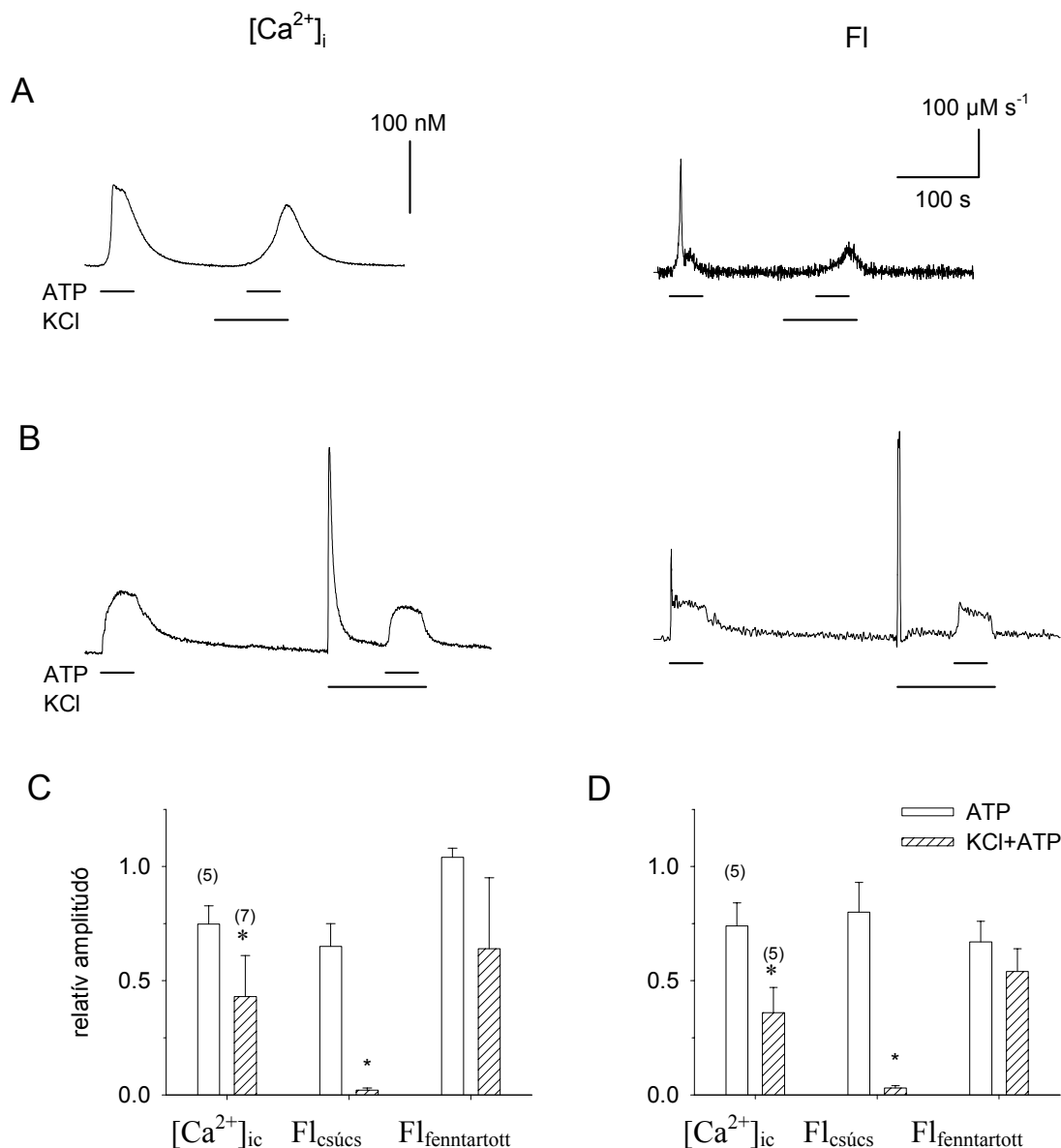
18. ábra Az I_{ATP} feszültség- és koncentrációfüggése. (A) A tartási potenciált változtatva az így módon mesterségesen beállított membránpotenciálú sejten vizsgáltuk 180 μ M ATP hatását. A sejt kapacitása ebben az esetben 179 pF volt. (B) Az áram-feszültség összefüggést 12-32 sejt átlagértékeiből szerkesztettük meg. (C) Különböző koncentrációjú ATP jelenlétében mért reprezentatív áramgörbék. A 30, 50 és 180 μ M ATP hatását egy sejten vizsgáltuk, melynek kapacitását 131 pF-nak mértük. A többi ATP koncentráció hatását egy másik sejten vizsgáltuk, melynek kapacitása 119 pF volt. Mindkét sejt membránpotenciálját -80 mV-on rögzítettük. (D) Az I_{ATP} koncentrációfüggése. A méréseket 5-10 magvú, egér tenyésztett vázizomsejteken végeztük. A pontokat Hill-egyenlettel illesztettük, az így kapott értékek $EC_{50} = 68 \mu$ M, $n = 1,66$.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a P2X receptorok által mediált útvonal fontos szerepet játszhat az ATP által kiváltott kalciumbeáramlás kialakításában. Az áram differenciálódással párhuzamos csökkenése és ezzel együtt a kisebb depolarizáció is arra utal, hogy a P2X útvonal differenciálódás alatti down regulációja összefüggésben van a $[Ca^{2+}]_{ic}$ -ban, valamint a fluxusban tapasztalt, előzőekben bemutatott változásokkal.

IV.2.5. *Az ATP által kiváltott fluxus függ a sejtek feszültségfüggő folyamataitól*

A purinerg folyamatok pontosabb megismerése miatt farmakológiai vizsgálatokat végeztünk. Elsőként a depolarizáció hatását vizsgáltuk. Az 19A és B ábrán bemutatott görbéken hosszú ideig tartó kálium-depolarizációt követő ATP adagolások hatásai látható. A depolarizáció lehetővé tette, hogy az ATP hatásait úgy vizsgáljuk, hogy egyrészt inaktiváljuk a feszültségfüggő folyamatokat (a felszíni membrán feszültségfüggő kalciumcsatornáit, a DHPR-RYR aktivációt), másrészt, hogy megakadályozzuk a P2X receptorokon keresztül történő kationbeáramlást. A sejteket ezért egy olyan mérési protokoll alkalmazásával vizsgáltuk, ahol először ATP-vel, majd 120 mM KCl-oldattal kezeltük őket, aztán pedig az ATP-kezelést a K^+ -depolarizáció alatt ismételtük meg. A kevésbé differenciált, kevesebb, mint 5 maggal rendelkező sejteken általában nem lehetett K^+ -depolarizációval tranziens kalciumválaszokat előidézni (19A ábra). Az ATP azonban mind KCl jelenlétében, mind anélkül képes volt $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedést kiváltani, bár a tranziensek kisebbek voltak a depolarizált sejteken és a felszálló szár meredeksége is kisebbnek adódott. A fluxusgörbéken még szembetűnőbbek voltak a változások, ugyanis a korai csúcs eltűnt, és a késői komponens is csökkent a depolarizált sejteken. A fejlődés későbbi szakaszában levő, 5-10 magvú sejteken a depolarizáció nagy $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedést okozott (19B ábra),

csakúgy, mint az ATP kezelés. A kisebb sejteken tapasztaltakhoz hasonlóan, a fluxus korai, gyors komponense eltűnt a depolarizált myotubulusokon, de ezeken a sejteken a fluxus fenntartott komponense kevésbé csökkent.



19. ábra ATP által kiváltott kalciumfluxusok depolarizált izomsejteken. (A) Egy kevesebb, mint 5 magot tartalmazó sejten mért, két, egymást követő ATP adagolással kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ változás és a belőle számított fluxus ($PV_{max} = 51 \mu M s^{-1}$). A második ATP adagolást megelőzően a sejtet 120 mM KCl-oldat alkalmazásával depolarizáltuk. (B) Hasonló kísérleti elrendezés mellett 5-10 magvú sejten mért demonstratív kalciumtranziens és a számított fluxus ($PV_{max} = 119 \mu M s^{-1}$). (C) Fiatal alakokon, és (D) differenciáltabb, 5-10 magvú sejteken mért, első ATP alkalmazással kiváltott tranziensekre normált átlagértékek. A csillagok a szignifikáns változásokat jelzik.

Mivel az ismételt ATP adagolás maga is csökkentette a kiváltható tranziensek amplitúdóját, a depolarizáció alatti, ATP-vel kiváltott kalciumtranziens amplitúdóját az első, ATP adagolásával kiváltott tranziensre normáltuk (19C és D ábra). Ezeket aztán összehasonlítottuk a nem-depolarizált sejteken mért, ismételt ATP adagolással kiváltott, hasonlóan számolt értékekkel. Az átlagértékek mindkét vizsgált sejtpopuláció esetében azt mutatják, hogy a depolarizáció szignifikánsan ($p < 0,05$) lecsökkentette a kalciumtranziensek amplitúdóját és eltűntette a fluxus korai csúcskomponensét ($Fl_{csúcs}$). Másrészt viszont a depolarizáció nem csökkentette szignifikánsan jobban a fluxus fenntartott komponensét, mint ami az ATP ismételt alkalmazásakor megfigyelhető volt ($p > 0,1$).

Extracelluláris kalciumionok hiányában, valamint feszültségfüggő Na^+ - és Ca^{2+} -csatorna gátlószerek (TTX és verapamil) jelenlétében, mind a K-depolarizációval, mind az extracellulárisan alkalmazott ATP-vel kiváltható válaszok csökkentek. Az ATP alkalmazásával kiváltott fluxusok korai, gyors komponensében volt a legszembetűnőbb a hatás. Ezek, valamint a depolarizált sejteken tapasztalt eredmények alátámasztják azon elképzelésünket, mely szerint az ATP által kiváltott fluxus korai komponensét a depolarizáció hozza létre.

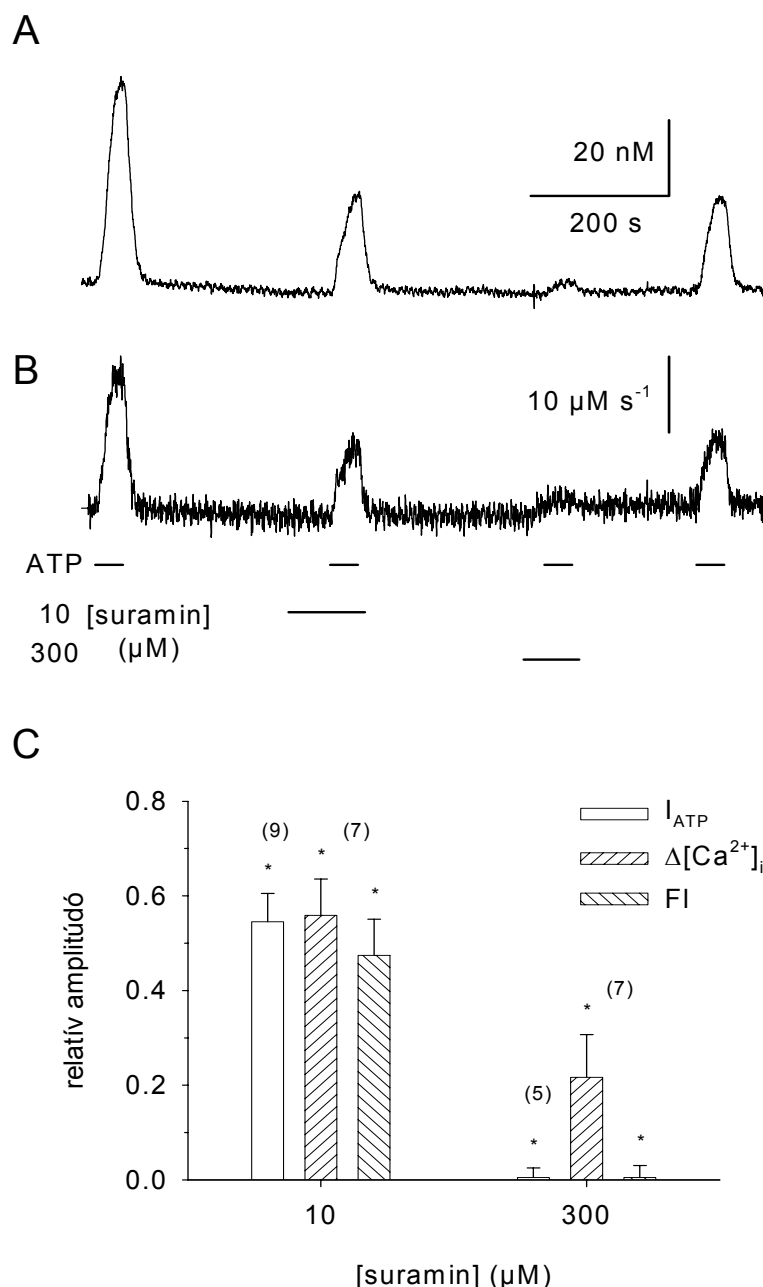
IV.2.6. *Mind a P2X, mind a P2Y receptorok aktiválódása szerepet játszik az ATP által kiváltott kalcium fluxus kialakításában*

Tekintettel arra, hogy az ATP által kiváltott fluxus fenntartott komponense nem, vagy alig változik depolarizáció, vagy TTX és verapamil hatására, illetve extracelluláris kalcium hiányában, ez a komponens részben független kell, hogy legyen a P2X receptorok aktiválódásától. A továbbiakban tehát az volt a kérdés, hogy az ATP egy

másik, specifikus purinerg, vagy esetleg egy nem specifikus útvonalon keresztül hozzá-e létre az intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedésnek ezt az összetevőjét.

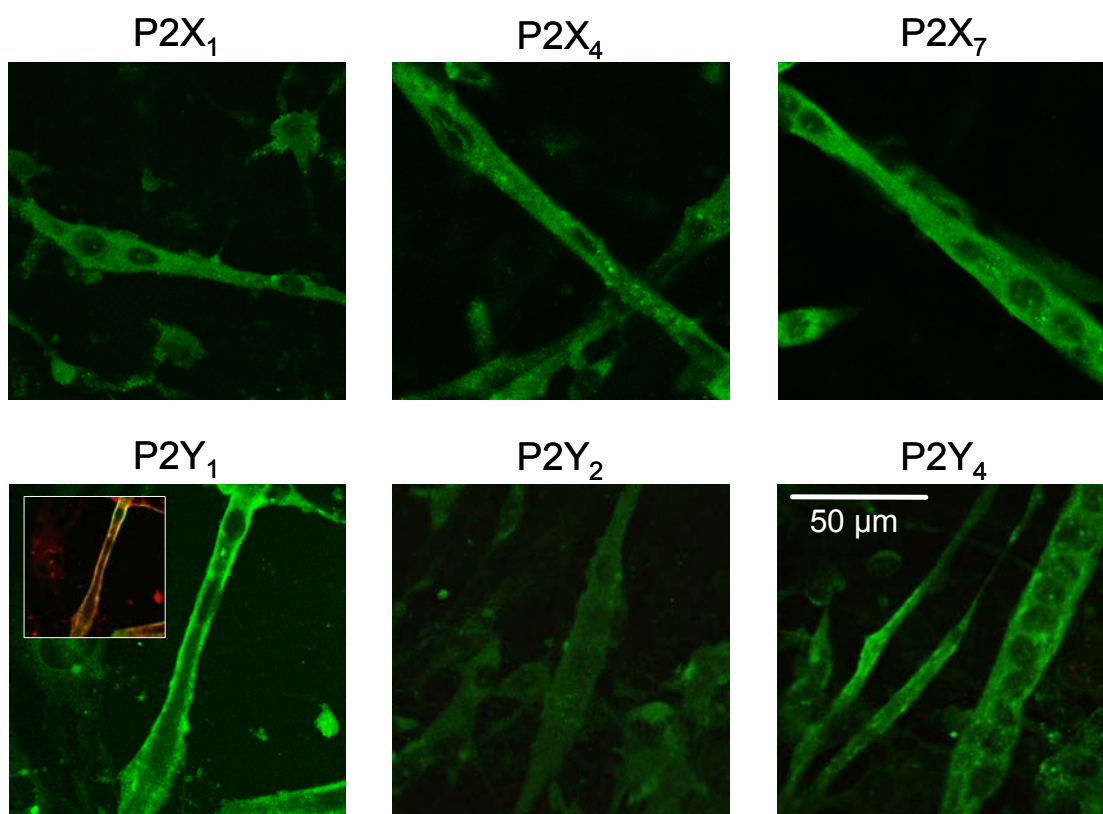
Ennek eldöntésére megvizsgáltuk, hogy a suramin, mely egy általánosan ismert és használt purinoreceptor blokkoló (von Kügelgen és Wetter, 2000; North, 2002) képes-e befolyásolni az ATP hatására kialakuló fenntartott komponens paramétereit. Ezekhez a vizsgálatokhoz a fejlődés késői szakaszában levő izomcsöveket használtunk, mert ezeken ATP hatására csak a fenntartott komponens volt megfigyelhető (lásd 20. ábra). 10 és 300 μM suramin adagolásának hatására csökkent mind az ATP-vel kiváltható válaszok nagysága (20A ábra), mind a számított fluxus (20B ábra). A suramin részlegesen kimoshatónak bizonyult, mind a kalciumtranziensek, mind a kalcium fluxusok értékei visszatértek a kiindulási szint közelébe, miután a szert eltávolítottuk a sejtek környezetéből. Az ábrán jól látható, hogy a suramin 10 μM koncentrációban csak részleges csökkenést (mintegy 50%) okozott mind a tranziensek, mind a fluxusok értékeiben, ha viszont a koncentrációját 300 μM -ra növeltük, az ATP-vel kiváltható válasz csaknem teljesen eltűnt. Feszültség-rögzítés módban megismételve a kísérletet azt tapasztaltuk, hogy az ATP alkalmazásával kiváltható áramok, hasonlóan az előzőekben leírtakhoz, részlegesen csökkentek 10 μM suramin alkalmazásának hatására és nem lehetett ATP által kiváltott áramokat mérni 300 μM suramin jelenlétében. A suramin tehát koncentrációfüggő módon csökkentette az ATP által aktivált áramok amplitúdóját, 10 μM suramin esetében 45%-kal, míg 300 μM suramin esetében nem volt mérhető áram. A kalciumtranziensek esetében ezek az értékek 32, illetve közel 80%, míg a fluxus kb. 50%-kal csökkent 10 μM suramin jelenlétében, és praktikusán megszűnt a nagy koncentrációjú suramin adásakor, hasonlóan az áramgörbénél tapasztaltakhoz (20C ábra). Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a fluxus fenntartott komponensének kialakításáért, vagy legalábbis annak jelentős részéért a

purinerg jelátviteli mechanizmus a felelős. Mivel a fenntartott komponens megmarad depolarizált sejteken is, valószínű, hogy a primer tenyészetek izomsejtjein metabotróp P2 receptorok vannak jelen.



20. ábra Suramin hatása az ATP hatására létrejövő kalciumfluxusokra és ionáramokra. (A) A reprezentatív görbén 180 μM ATP adagolása során mért kalciumtranzienseket és a belőlük számolt fluxust (B) mutatjuk be ($PV_{\text{max}} = 222 \mu\text{Ms}^{-1}$). A második ATP adagolás 10 μM , míg a harmadik 300 μM suramin jelenlétében történt. (C) A diagramm a suramin I_{ATP} -re, kalciumtranziensekre, valamint fluxusokra kifejtett hatását mutatja be, úgy, hogy a suramin jelenlétében tapasztalt változásokat az első ATP adagolásával kiváltott válaszokra normáltuk.

A különböző purinoreceptor altípusok meghatározásához immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk. A sejteket P2X és P2Y receptor ellenes antitestekkel jelöltük. Mivel a P2 receptorok megtalálhatóak a fibroblasztok membránjában is, kettős immunfestést alkalmaztunk, a tenyésztett sejteket izomspecifikus fehérje (dezmin) ellenes antitesttel is kezeltük és csak a dezmin-pozitív sejteket tekintettük izom-eredetű sejteknek. Ezt mutatja be a 21. ábra kis képe is, ahol a zöld szín jelöli a megfelelő P2 receptor festődését, pirosan festődött a dezmin, míg a sárga szín a P2 receptor és a dezmin együttes jelenlétére utal. Az ábrán az immunfestés eredményeként, fluoreszcens mikroszkóppal készült képek láthatóak, amely szerint az 5-10 magvú, tenyésztett



21. ábra A purinireceptor altípusok immuncitokémiai meghatározása egér tenyésztett vázizomsejteken. A sejteket purinoreceptor ellen termeltetett antitestekkel jelöltük, majd a specifikus festődést fluoreszcein-izotiocianáttal jelzett másodlagos antitesttel való jelöléssel tettük láthatóvá. A miogén sejteket egy izomspecifikus fehérje, a dezmin együttes jelölésével azonosítottuk. A kis kép egy ilyen kettős festést mutat, ahol a dezmin piros fluoreszcens festékekkel tettük láthatóvá. A nagy képeken látható kalibrációs egyenes (50 μm) a kis képen 120 μm -nek felel meg.

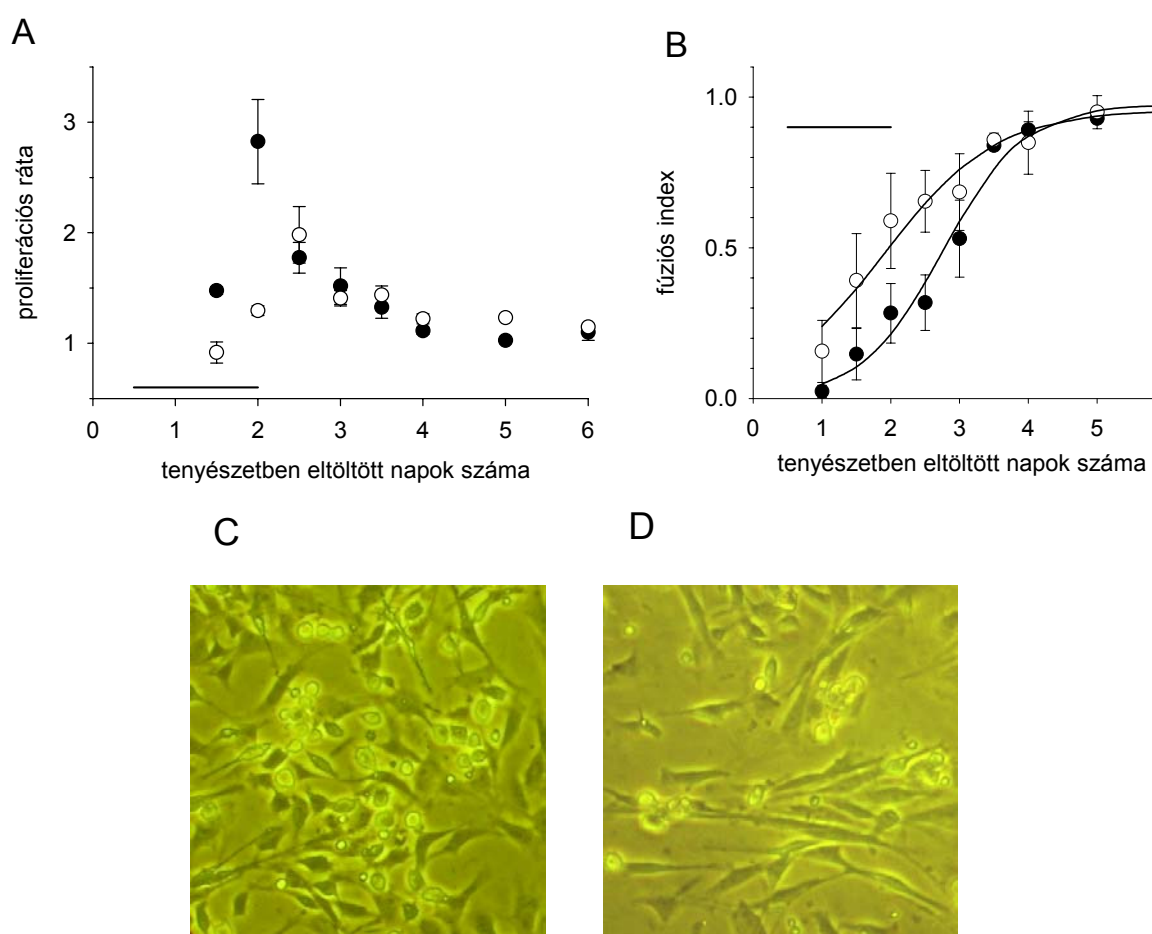
vázizomsejteken 6 különböző P2 receptor, a P2X₁, P2X₄, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂ és a P2Y₄ van jelen. Míg a festődés erősnek bizonyult a P2X₄, P2X₇, P2Y₁ és a P2Y₄ altípusok esetében, viszonylag gyengének mondható a P2Y₂ receptorra. A P2X₂ receptortípust egy esetben sem sikerült kimutatnunk a vizsgált sejteken (az ábrán nem tüntettük fel). A P2Y₁ purinoreceptor esetében megfigyelhető a felszíni membránban való elhelyezkedés.

IV.2.7. Az ATP gátolja a sejtosztódást, de serkenti a tenyésztett vázizomsejtek differenciálódását primer tenyészetekben

Korábban már leírták, hogy az ATP, P2X₅ receptorok aktiválódásán keresztül, patkányok myoblastjainak differenciálódását idézi elő (Ryten és mtsai 2002). Vizsgálataink során egér vázizomból indított tenyészeinkhez 180 μ M ATP-t tartalmazó tenyésztőoldatot adtunk a tenyésztés 1.-3. napján. A 22. ábra mutatja be az ATP-nek a myoblastok és a korai differenciálódás szintjén álló myotubulusok proliferációjára és differenciálódására kifejtett hatását. A sejtosztódás mértékét a proliferációs ráta, azaz a miogén eredetű sejtek magszámában tapasztalható relatív változás mutatja (22A ábra). Kontroll körülmények között a proliferációs ráta csúcsa a 2. napon van, míg ATP kezelés hatására ez a csúcs kisebb és jobbra tolódott, a legnagyobb mérvű osztódás a szer eltávolítása után figyelhető meg.

A proliferáció csökkentésével egyidőben az ATP elősegítette a tenyésztett vázizomsejtek differenciálódását, amit a fúziós index változásával követtünk nyomon (22B ábra). A fúziós index kontroll körülmények között először lassú emelkedést mutatott, majd meredekebbé vált, amikor a sejtek többmagvú myotubulusokká olvadnak össze. Végül a fúziós index értéke 1 közeli értéken stabilizálódott, mivel erre az időszakra közel az összes myoblast fuzionált. Az ATP kezelés hatására a fúziós index görbéje balra tolódott. Ez azt jelenti, hogy az izomsejtek fúziója korábban következik be

a kezelt tenyészetekben. A fúziós index időfüggésének pontosabb leírásához a pontokra növekedési görbét illesztettünk. Az illesztés után a $t_{0,5}$ (az az idő, amikor az aktuális fúziós index megegyezik a fúziós index maximális értékének felével, tehát a miogén magok fele van az izomcsövekben) $3,8 \pm 0,1$, illetve $2,9 \pm 0,1$ napnak, a k (meredekséget jellemző paraméter) értéke pedig $0,59 \pm 0,09$, valamint $0,82 \pm 0,16$ napnak adódott kontrollban, illetve az ATP kezelés hatására. Mindez azt jelzi, hogy a fúzió hamarabb



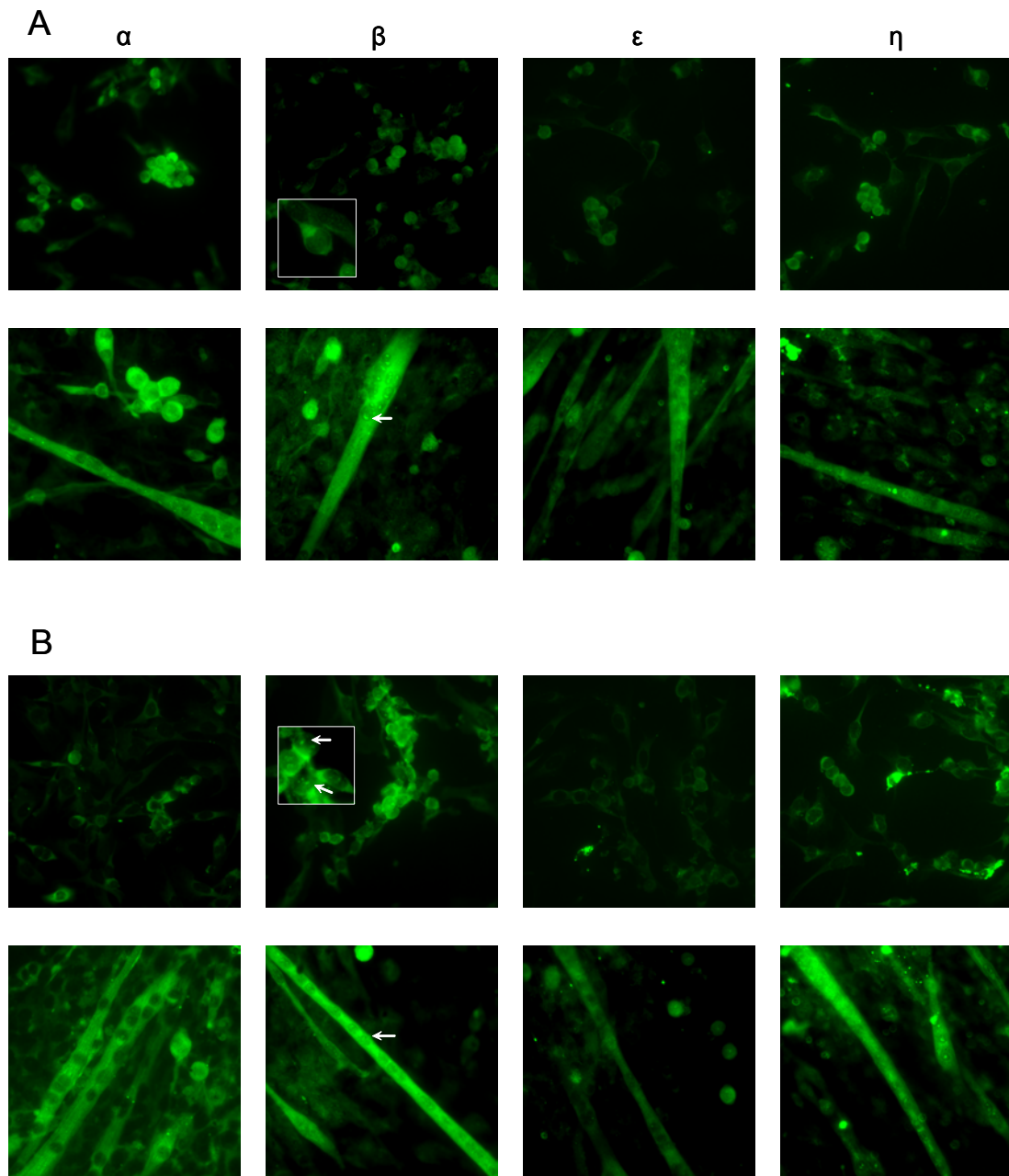
22. ábra ATP jelenlétében megváltozott a tenyésztett vázizomsejtek proliferációja és differenciálódása. (A) A proliferációs ráta kontroll tenyészetekben (teli szimbólumok) és ATP jelenlétében (üres szimbólumok). A proliferációs rátát úgy számítottuk, hogy a miogén magok számát elosztottuk az előzőleg számolt magszámmal. (B) A fúziós index változása. A fúziós index meghatározásához a többmagvú izomsejtekben található magok számát elosztottuk az összes miogén mag számával. A pontokat az Anyagok és módszerek részben leírt 2. egyenlet segítségével illesztettük. A $F_{i_{max}} = 0,98$ -nak, és $0,96$ -nak, a $t_{0,5} = 3,8$ és $2,9$ napnak, a $k = 0,59$ és $0,82$ napnak adódott kontroll körülmények között, illetve ATP hosszantartó kezelés hatására (vízszintes vonal). (C) 2 napos kontroll és (D) ATP kezelt tenyészetekről készített fénymikroszkópos képek (nagyítás 200X).

következett be azokon a sejteken, amelyeket ATP tartalmú oldatban tenyésztettünk. A különböző körülmények mellett a tenyészetek jellegzetes morfológiai különbségeket is mutattak (22C és D ábra). Kontroll oldatban (22C ábra) a 2 napos tenyészetekben a főleg myoblastok voltak jelen, melyek egy része szétszórta, míg mások csoportokba rendeződve helyezkedtek el. ATP jelenlétében (22D ábra), az azonos korú tenyészetek sejtjei jellegzetesen sorokba rendeződtek, ami a sejtek fúzióját megelőző állapot.

IV.2.8. Az ATP befolyásolja a PKC izoenzim mintázatot

A következőkben arra kerestük a választ, hogy az ATP-vel való hosszantartó kezelés milyen jelátviteli mechanizmusokat aktivál. Mivel már több sejttypuson bebizonyították, hogy a proliferáció és a differenciálódás szabályozása részben a foszfatidil-inozitol útvonalon, a proteinkináz C (PKC) izoenzimcsalád aktiválódásán keresztül hat, immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk annak megállapítására, hogy az ATP a proliferációt csökkentő és differenciálódást serkentő hatását, a PKC izoenzimeken keresztül fejt-e ki. Az ismert izoenzimeket, a klasszikus (cPKC) α , β és γ , az új típusú, vagy novel (nPKC) δ , ϵ , ζ és η , és az atípusos (aPKC) θ , ζ , λ valamint μ izoenzimeket 2 és 5 napos tenyészetek sejtjein mutattuk ki. Azért választottuk vizsgálatainkhoz pont ezt a két időpontot, mivel az ilyen korú tenyészetek reprezentálják a legjobban az intenzív sejtosztódás, illetve a késői differenciálódás stádiumait. Bár kísérleteink során megvizsgáltuk az atípusos PKC izoenzim mintázatbeli változását is ATP kezelés hatására, nem tapasztaltunk különbséget a festődésükben, ami nem meglepő, mivel ezek az izoenzimtypusok aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem diacilglicerolt nem igényelnek. A klasszikus és az újtypusú PKC izoenzimek közül négy, az α , β , ϵ és η festődött kontroll körülmények között a tenyésztett izomsejtekben, a másik három izoenzim sem kontrollban, sem ATP kezelés hatására nem volt kimutatható. A 23A.

ábra mutatja be ezen izoformák celluláris eloszlását 2 és 5 napos tenyészetek sejtjein. Mind a négy izoenzim jelen van a fejlődés korai és késői stádiumában egyaránt. A második napon ezek az izoenzimek kivétel nélkül a citoplazmában jelennek meg, nem mutatnak szubcelluláris elrendeződést. Az 5 napos tenyészetek sejtjein azonban a PKC β jellegzetes festődést mutat, a sejtmagban, pöttyözötten jelenik meg (23. ábrán, a kis képen kinagyítva látható). Ugyanezt a négy izoenzimet sikerült kimutatni az ATP-vel tartósan (1.-3. tenyésztési napig) kezelt sejteken is (23B ábra), két szembetűnő különbséggel. A PKC α festődése sokkal gyengébb volt az ATP kezelés hatására, valamint a kontroll esetben idősebb sejteken megjelenő, PKC β izoenzimre jellemző mintázat már a kétnapos, ATP-vel kezelt sejteken megfigyelhető volt.



23. ábra PKC izoformák kontroll körülmények között (A), illetve ATP jelenlétében tenyésztett vázizomsejteken (B). Az immunfestést az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint végeztük. (A) Pozitív immunreakciót adó klasszikus és új típusú PKC izoformák kontroll körülmények közt, valamint (B) ATP jelenlétében tenyésztett 2 napos, proliferáló (A és B ábrarész első sora), illetve 5 napos, differenciálódó (alsó sorok) egér tenyésztett vázizomsejteken. A kis ábrákon 2X-ére nagyított jellemző mintázatot mutató sejtek láthatóak. A nyilak ezt, a PKC β izoenzim esetében tapasztalható pöttyözött magfestést jelölik. A képek 400X nagyítással készültek.

IV.3. A kalciumfelszabadulás elemi eseményei

Az intracelluláris kalciumkoncentráció egész sejtre kiterjedő változásainak tanulmányozását követően a kalciumfelszabadulás háttérében álló folyamatokat vizsgáltuk meg. Mint ismeretes, a harántcsíkolt izmok felépítése és működése különbözik kételtűek, valamint emlősök esetében. Ez a különbség egyrészt a sarcoplasmaticus reticulum morfológiai eltéréseivel, másrészt a kalciumfelszabadulásban részt vevő rianodin receptorok szerkezetének különbözőségeivel magyarázható. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy míg béka izomrost esetén csak „spark”-ok, addig patkány izomrost esetében „spark”-ok és „ember”-ek is előfordultak. Ez utóbbiak vagy magányosan, vagy a „spark”-ok előtt, illetve után következtek be. Kísérleteink során a „spark”-ok jellemző paramétereit: az amplitúdót, az esemény időbeli hosszát, a maximális amplitúdó feléhez tartozó időtartamot, valamint a térbeli szélességet vizsgáltuk meg. Eltérés mutatkozott a „spark”-ok jellemző paramétereiben is a két faj esetében. Az események amplitúdója a békák esetében volt nagyobb, míg a többi vizsgált paraméter (FWHM, FTHM, valamint az időtartam) a patkány rostokon mutatott magasabb értékeket. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy emlősökön kisebb amplitúdójú, hosszabb ideig tartó elemi események, és így RYR megnyílások figyelhetők meg. A térben azonos helyen megjelenő „spark” és „ember” TTP-jét összehasonlítva a résztvevő csatornák aránya hozzávetőleg 15-nek adódott. Ennek megfelelően, míg a „spark” kialakításában valószínűleg több tíz rianodin receptor vesz részt, addig az „ember” létrehozásáért csak néhány rianodin receptor egyidejű megnyílása lehet a felelős.

IV.4. Az emlős vázizmokon megfigyelhető elemi események jellemzése és farmakológiai befolyásolhatósága

Bár ismereteink szerint emlős vázizomban a RYR-ok megnyílása a DHPR-ok szoros kontrollja alatt áll, számos egyéb tényező ismert, mely képes megváltoztatni az SR kalciumcsatornájának működését (Zucchi és Ronca-Testoni, 1997). Az emlős izmokon tapasztalható események nemcsak megjelenésükben különböznek a kételtű izmokon található eseményektől, úgy tűnik egyes szerek is eltérően hatnak rájuk.

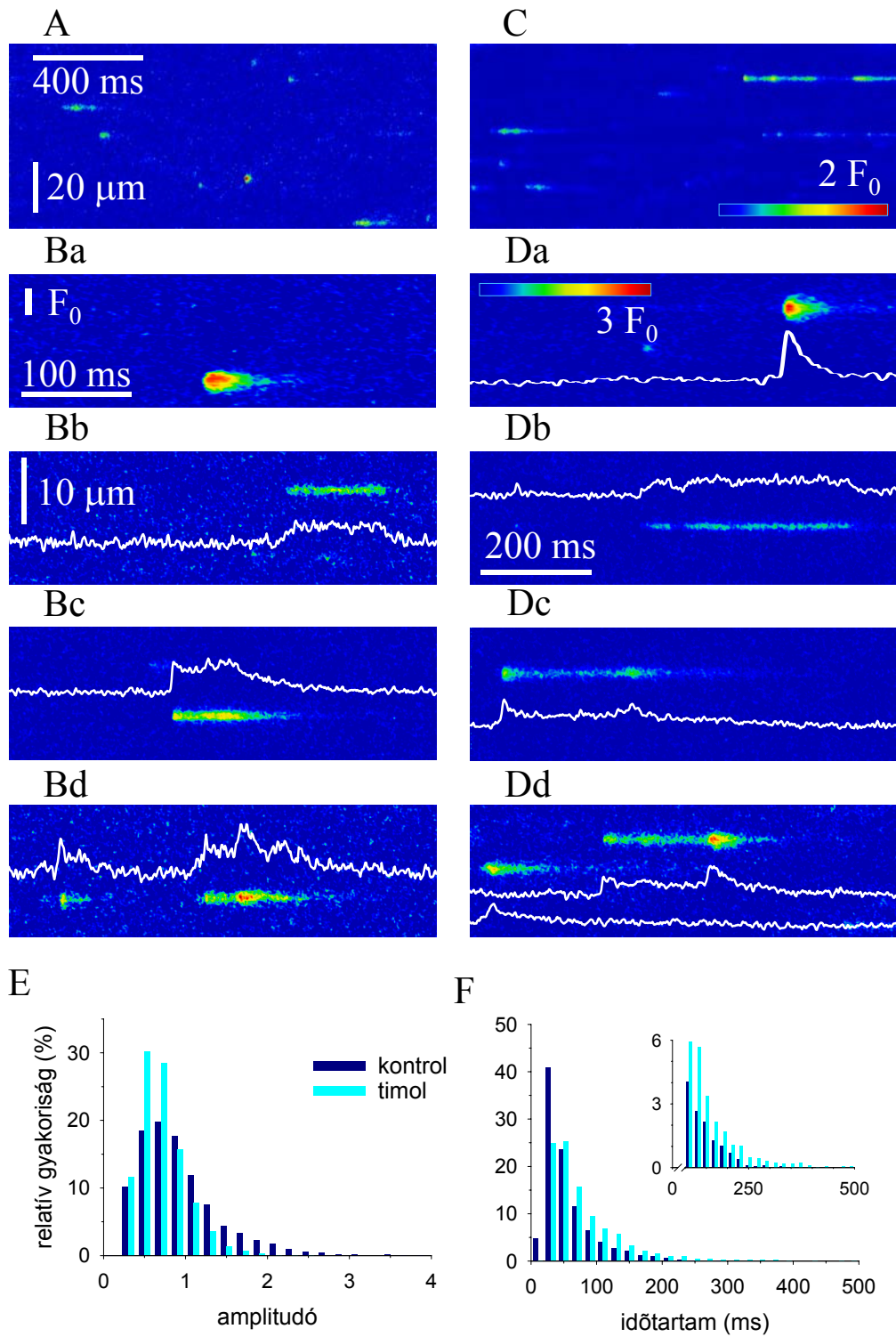
Számos fenolszármazékról írták már le, hogy befolyásolja a RYR-ok működését. Ezek közé tartozik a 4-kloro-meta-kresol (4CmC, Hermann-Frank és mtsai, 1996), és a metil-hidroxi-benzoát (Cavagna és mtsai, 2000). Alacsony koncentrációkban ezek az anyagok fokozzák az izolált RYR-ok megnyílási valószínűségét, valamint az intracelluláris kalciumraktárakból történő kalciumfelszabadulást. Egy további, a gyógyszeriparban is használt fenol analógról, a timolról is kimutatták már, hogy megnöveli az SR kalciumpermeabilitását (Takishima és mtsai, 1979). Neuronokon a timol hatására spontán kalciumtranziensek alakulnak ki és ezzel egyidejűleg az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelkedése figyelhető meg (Kostyuk és mtsai, 1991). Hasonló eredményeket írtak le simaizompreparátumokon (Hisayama és Takayanagi, 1986). A timol különböző sejttípusokra kifejtett hatásának vizsgálata azért jelentős, mert széles körben alkalmazzák tartósítószerként az élelmiszer-, a kozmetikai-, valamint a gyógyszeriparban.

Korábbi eredményeink szerint a timol módosítja a RYR-ok működését. Kíváncsiak voltunk tehát, hogy a szer befolyásolja-e az elemi kalciumfelszabadulási események tulajdonságait. Azt találtuk, hogy a timol már alacsony koncentrációban (30 μ M) is módosította az elemi események megjelenését, valamint jellemző paramétereit. Míg kontroll körülmények között az elemi események előfordulási gyakorisága

0,0587±0,0020 s⁻¹sarcomer⁻¹ volt, 30 µM timol alkalmazását követően ez az érték 0,0654±0,016 s⁻¹sarcomer⁻¹-re nőtt. Az elemi események megoszlása is megváltozott a szer hatására. Kontroll esetben (24A ábra) leggyakrabban „spark”-ok fordultak elő (az összes esemény 63%-a, 24Ba ábra), kevésbé voltak gyakoriak a magányos „ember”-ök (22%, 24Bb ábra) és a „spark”+„ember”-ök (13,9%, 24Bc ábra), legritkábban pedig az „ember”+„spark” összetett események fordultak elő (1,1%, 24Bd ábra). Timol jelenlétében (24C ábra) a hosszabb és összetettebb események domináltak, a magányos „spark”-ok relatív előfordulása csökkent (az összes esemény 41%-a, 24Da ábra), az „ember”-ök gyakorisága nőtt (35%, 24Db ábra), a „spark”+„ember” gyakorisága pedig csak kismértékben változott (20%, 24Dc ábra). A legnagyobb relatív változást az „ember”+„spark”-ok esetében tapasztaltunk, melyek csaknem négyszer gyakrabban fordultak elő a kezelést követően (4%, 24Dd ábra). A kontroll körülmények közt 20 roston mért 2030, valamint a 30 µM timol hozzáadása után, 9 roston előforduló 2478 esemény jellemző paramétereit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

Vizsgált paraméterek	kontroll		30 µM timol	
	„spark” (n=1576)	„ember” (n=454)	„spark” (n=1605)	„ember” (n=873)
amplitúdó	0,92±0,01	0,210±0,004	0,70±0,01*	0,168±0,002*
FWHM (µm)	1,81±0,03	1,76±0,03	1,74±0,01*	1,77±0,02
Csúcs eléréséhez szükséges idő (TTP) (ms)	9,4±0,1	-	9,6±0,1	-
időtartam (ms)	56±1	87±2	79±1*	102±2*

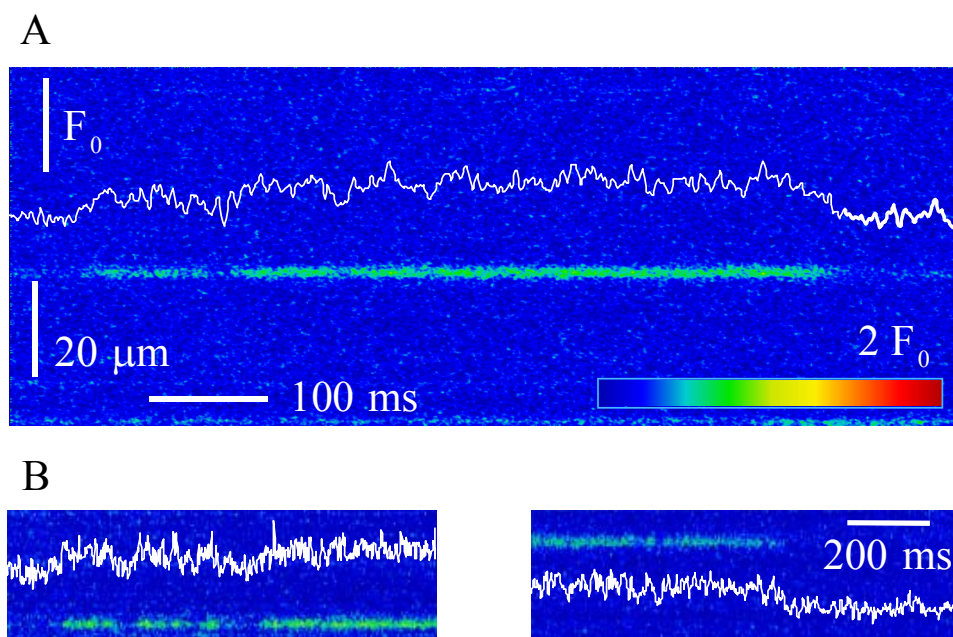
3. táblázat Az értékek az átlag± SE mutatják, a csillaggal a szignifikánsan eltérő értékeket jelöltük. A „spark”-csoportba mindazok az események beletartoznak, melyek „spark”-ot tartalmaznak.



24. ábra Elemi kalciumfelszabadulási események kontroll körülmények között (A és B), valamint 30 μM timol jelenlétében (C és D). A nagy képek (A és C) a frekvenciát, míg a kis képek (Ba-Bd, Da-Dd) a különböző típusú eseményeket mutatják be, így a „spark”-ot, az „ember”-t, a „spark”+„ember”-t, illetve az „ember”+„spark”-ot. Az ábrákon feltüntetett görbék az esemény maximális amplitúdójának vonalában mért F/F_0 értéket mutatják. (E) „Spark”-ot tartalmazó események amplitúdójának relatív eloszlása. (F) Az összes esemény időtartamának relatív eloszlása. A kis kép a hosszú események nagyobb előfordulását mutatja timol jelenlétében.

A timol csökkentette a „spark”-ok amplitúdóját $0,92 \pm 0,01$ -ről $0,70 \pm 0,01$ -re, „ember”-ök esetében az átlagos amplitúdót $0,210 \pm 0,004$ -ről $0,168 \pm 0,002$ -re (24E ábra, illetve 3. táblázat), valamint a „spark”-ok FWHM értékét. A csúcs eléréséhez szükséges idő nem változott jelentősen. Ezzel szemben az összes kalciumfelszabadulási esemény időtartama jelentősen megnövekedett (24F ábra).

Ezután megvizsgáltuk hogy milyen hatásokat vált ki a timol magasabb koncentrációban. $150 \mu\text{M}$ timol hatására a permeabilizált rostokon sok esetben egy nagy mértékű kalciumfelszabadulást tapasztaltunk, mely a rost összehúzódását, majd halálát jelentette. Csak néhány esetben sikerült rögzítenünk elemi kalciumfelszabadulási eseményeket, melyek statisztikai elemzése lehetetlen volt, viszont szembetűnőek voltak morfológiai jellegeik (25. ábra). Mint az ábrán is látható, „spark”-ot $150 \mu\text{M}$ timol jelenlétében nem lehetett megfigyelni, viszont nagyon hosszú, gyakran több száz ms-ig



25. ábra Elemi kalciumfelszabadulási események $150 \mu\text{M}$ timol jelenlétében. A reprezentatív képek néhány nagyon hosszú eseményt mutatnak be (A), ezek kezdő és végpontja gyakran nem is található meg egy képen (B).

is elhúzódó események jelentek meg. Ezen események jellemző értékei, az átlagos amplitúdójuk, a térbeli szélességük, nagyon hasonlított az alacsony koncentrációjú timol alkalmazásakor, a magányos „ember”-ök esetében tapasztaltakhoz. Mivel az amplitúdó az események teljes hosszában állandó volt, ez arra utal, hogy ezeket az eseményeket valószínűleg egy, vagy néhány csatorna folyamatos nyitvatartása hozta létre.

Az itt bemutatott eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy a timol hosszú ideig tartó RYR megnyílást idéz elő, melynek hatására hosszú elemi kalciumfelszabadulási események jelennek meg. Ezeket az eseményeket nem előzték meg, illetve nem követték „spark”-ok, ami arra utalhat, hogy vagy egyes csatornák, vagy a csatornák kis csoportjainak összehangolt megnyílása hozta létre őket. Ez a megfigyelés alátámasztani látszik azt az elképzelést, miszerint az „ember” a kalciumfelszabadulás elemi építőköve emlős vázizomban.

V. Megbeszélés

V.1. Az ATP szerepe harántcsíktolt izomsejtek működésében

Egyes, korábban végzett kísérletek már kimutatták az ATP hatását különböző sejteken, így vázizomsejteken is. In vivo körülmények között, az ATP acetilkolinnal együtt szabadul fel a neuromuscularis junctioban. Az idegekből felszabaduló ATP egyrészt postjunctionális modulátorként hat és az Ach hatását erősíti, másrészt az ATP bomlástermékeként felszabaduló adenzin P1 purinoreceptorokon keresztül gátolja az Ach felszabadulását. Sokáig úgy gondolták, hogy az ATP kotranszmitter, az acetilkolinnal együtt szabadul fel és a nikotin típusú kolinerg receptoron keresztül fejti ki módosító hatását. Henning és mtsaihoz (1996) hasonlóan, az általunk bemutatott, tenyésztett vázizomsejteken mért eredmények is arra utalnak, hogy az ATP más útvonalon, eltérő hatásmechanizmussal, P2X, illetve P2Y purinoreceptoron keresztül hat. Ezt bizonyítja a megfigyelés, hogy az ATP által kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ -változás kinetikája, nagysága, valamint farmakológiai befolyásolhatósága különbözött az acetilkolin által kiváltott válaszok tulajdonságaitól.

Az ATP nemcsak idegsejtekből, hanem a szomszédos sejtekből is felszabadulhat. Bár fiziológiás testhőmérsékleten az ATP féléletideje rövid, diffúzióval eljuthat a szatellita sejtekig, illetve a fuzionáló myoblastokig, ahol minden valószínűség szerint purinoreceptorokon keresztül, intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedést indukál.

Az ionotróp purinoreceptorok pórusátmérője nagyobb (0,9-1 nm), mint a nikotin típusú acetilkolin receptoré, illetve a Ca^{2+} -ra vonatkoztatott relatív ionpermeabilitásuk ($P_{Ca/Na} = 2,2 - 4$) is mintegy 10-szer nagyobb a kolinerg receptorhoz képest ($P_{Ca/Na} = 0,3$). Mindez azt jelenti, hogy a purinerg receptoron át történő Ca^{2+} -beáramlás sokkal jelentősebb, mint az acetilkolin által aktivált nikotin típusú receptorokon.

V.1.1.1. *Az ATP hatásai humán tenyésztett vázizomsejteken*

Humán tenyésztett vázizomsejteken, eredményeink szerint, az ATP koncentrációfüggő módon képes $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedést kiváltani. A kalciumtranzienseket két könnyen elkülöníthető csoportba lehetett besorolni. Az egyikbe a lassú, fokozatos növekedést mutató tranziensek, a másikba pedig a kétfázisú válaszok tartoztak. Ez utóbbi esetben a korai, gyors felszálló szár után egy viszonylag lassabb, egyenletesebb Ca^{2+} -beáramlás volt megfigyelhető. Az ATP hatását nem gátolta a nikotin-típusú acetilkolin receptor antagonistájaként ismert d-tubokurarin, a feszültségfüggő Na^+ csatornák gátlószere a TTX, valamint az L-típusú Ca^{2+} csatorna blokkoló verapamil. Kísérleteinkben extracelluláris Ca^{2+} hiányában, ATP hatására nem történt $[Ca^{2+}]_{ic}$ változás, tehát úgy tűnt, hogy a külső Ca^{2+} -beáramlás szükséges a tranziens létrehozásához. A kísérleteknek ebben a szakaszában úgy gondoltuk, hogy a kétfázisú tranziens első részét a külső térből, közvetlenül az ionotróp receptorokon keresztül beáramló Ca^{2+} -ok váltják ki, a második részét, pedig az intracelluláris raktárakból felszabaduló Ca^{2+} -ok hozzá létre. A vázizomsejtek fejlettségétől nagyban függ, hogyan válaszolnak a sejtek különböző anyagokra. Míg a sejtek differenciálódásával előbb nő, majd csökken az ATP alkalmazásával kiváltható válaszok nagysága, acetilkolin, illetve K^+ -depolarizáció hatására folyamatos a növekedés. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a vázizomsejtek fejlődése során az izomsejtek membránpotenciálja egyre negatívabb lesz, a membrán depolarizációjának hatására megnyíló feszültségfüggő ioncsatornák nagyobb mértékű kationbeáramlást idéznek elő. Másik fontos megállapítás, hogy a differenciálódás előrehaladtával a sarcoplasmaticus reticulum is egyre fejlettebb lesz (Kelly, 1971; Franzini-Armstrong és Jorgensen, 1994), melynek hatására nő az intracellulárisan raktározható Ca^{2+} mennyisége, aminek fontos szerepe lehet a sejten belüli Ca^{2+} -koncentrációt növelő mechanizmusokban.

Az ATP a vázizom embrionális fejlődésében csakúgy, mint a sérülések utáni regenerációs folyamatokban, valószínűleg nagyon fontos szerepet tölt be. A fejlődés korai szakaszában egyes sejtfolyamatok beindításához, illetve a génexpressziót szabályozó folyamatokhoz a másodlagos hírvivőként szereplő Ca^{2+} koncentrációjának megemelkedése elengedhetetlen. Az acetilkolin ilyen irányú szerepe ezzel szemben korlátozott, hiszen az embrionálisan fejlődő izomsejteknek kezdetben még nincs motoneuronos beidegzése, tehát a sejtekbe, bár rendelkeznek nikotin-típusú acetilkolin receptorokkal, acetilkolin hiányában nem történik Ca^{2+} -belépés. Felnőtt egyedekben a motoros véglemes területén felszabaduló acetilkolin hatása lokális, mert a neuromuscularis junctionban jelen levő acetilkolin-észteráz enzim, mely a szervezet egyik legnagyobb aktivitással rendelkező enzime, nagyon gyorsan és hatékonyan bontja a neurotranszmittert, amely így nem képes eldiffundálni a szinapszis közvetlen közeléből, így hatása a fejlődő izomsejteken nem jelentkezik.

V.1.2. Egér tenyésztett vázizomsejtek

Miután sikerült kimutatnunk az ATP által aktivált purinoreceptorok jelenlétét humán tenyésztett vázizomsejteken, a további funkcionális vizsgálatokat egérből származó izomsejtek tenyészetein folytattuk. Az extracellulárisan alkalmazott ATP egér tenyésztett vázizomsejteken is kalciumfelszabadulást eredményezett, ami egy korai csúccsal és egy azt követő lassabb, fenntartott komponenssel volt jellemezhető. Az ATP-vel kiváltható kalciumtranziensek a humán izomsejtekhez hasonló módon korfüggést mutattak. Az ATP által kiváltott fluxus időbeli lefolyása a differenciálódás előrehaladtával jellegzetesen módosult. A tranziens és a fenntartott komponens elkülönült, majd a korai tranziens csúcs a teljesen differenciált sejteken eltűnt. A gyors komponens elsősorban a P2X receptorok aktivációjától és az azt követő

depolarizációtól, míg a lassabb, fenntartott fluxus a P2Y receptoroktól függ. ATP ismételt adagolása fiatal, kevesebb, mint 5 magvú sejteken a kalciumtranziensek amplitúdójának, valamint a fluxus gyors komponensének jelentős csökkenését okozta, differenciáltabb sejteken ez a hatás nem volt ilyen jelentős.

Megvizsgáltuk az ATP által kiváltott áramokat is. Méréseink szerint ezek nem szelektív kationáramok, melyek nagysága korfüggést mutat. ATP ismételt adagolásának hatására az áram amplitúdója nem csökkent jelentősen. A membránpotenciál a differenciáltabb alakokon egyre negatívabb értékeket vesz fel. Ezzel párhuzamosan az ATP hatására bekövetkező membránpotenciálváltozás egyre kevésbé jelentős.

V.1.3. *A fluxust létrehozó kalciumionok eredete*

Korábban már beszámoltak arról, (Ryten és mtsai, 2002), hogy az extracellúlarisan alkalmazott ATP a P2X receptorok aktiválásán keresztül fejti ki hatását tenyésztett emlős vázizomsejteken. A P2X receptor aktiválódása és a vele járó depolarizáció, ha elég nagy, események egész sorát indítja be, melynek látható eredménye a kalciumtranziens. A sejt intracelluláris terébe belépő kalcium származhat az extracelluláris térből, a P2X receptoron, mint ionotróp receptoron (North, 2002), vagy feszültségérzékeny kalciumcsatornákon keresztül (Beam és Knudson, 1988; Cognard és mtsai, 1993), valamint felszabadulhat a belső raktárakból, főként az SR-ből, feszültség- és/vagy kalcium-indukált kalcium felszabadulás révén.

ATP alkalmazása az 5-10 maggal rendelkező myotubulusokon nagy, befelé irányuló áramokat és ezzel egyidejűleg depolarizációt okozott (5. ábra). Ez a depolarizáció (20 mV) elegendő volt ahhoz, hogy akciós potenciált váltson ki a sejteken, így aktiválva a feszültségfüggő T- és L-típusú kalcium áramokat (Cognard és mtsai, 1993). Ezek a folyamatok magyarázhatják az ATP adást követő, nagy

kalciumfluxust. Másrészt viszont a T-típusú kalcium áramok gyorsan inaktiválódnak (Perez-Reyes, 2003), s még a lassabb, L-típusú áramok is teljesen megszűnnek néhány másodperc alatt. Mivel a feszültségérzékeny folyamatok inaktivációja izomrostokon kevesebb, mint 10 másodpercen belül bekövetkezik (Brum és Ríos, 1987), a fluxus fenntartott komponense, mely hosszan, az ATP adagolása alatt végig megmarad, a feszültségfüggő folyamatokkal nem magyarázható. Differenciált izomcsövekben ezzel szemben sokkal negatívabb a membránpotenciál, az ATP alkalmazásával kiváltható depolarizáció pedig jóval kisebb (4 mV), így az feltehetően nem elegendő a feszültségfüggő folyamatok aktiválásához. Valószínűnek tűnik tehát, hogy az ATP által kiváltott kalciumfluxus fenntartott komponenséért a szer alkalmazásának ideje alatt folyamatosan nyitott állapotban levő P2X receptorokon keresztül megvalósuló kalciumbeáramlás, vagy egy, a P2X receptortól független mechanizmus a felelős. Azt korábban már leírták, hogy a P2X₇ receptor, ATP aktiválás alatt, folyamatosan nyitott állapotban van, rajta keresztül egy konstans áram folyik (North, 2002). Ez egyike azoknak a purinoreceptor típusoknak, melyet sikerült immunocitokémiai módszerrel kimutatnunk egér tenyésztett vázizomsejteken. A receptor relatív kalcium permeabilitási hányadosa (P_{Ca}/P_{Na}) 2, így a használt oldatösszetétel mellett, az összáramnak körülbelül 4%-át hordozzák kalciumionok. Kiszámolva az erre vonatkozó fluxust ($Fl = I_{ATP} / V / F / 2$, ahol V az átlagos sejttérfogat (20 pl), F a Faraday állandó) azt kaptuk, hogy az lényegesen kisebb (mintegy $3 \mu\text{Ms}^{-1}$), mint a fluxus fenntartott komponensének értéke ($15 \mu\text{Ms}^{-1}$). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a tenyésztett myotubulusokon jelen van egy P2X receptoroktól független fluxus is. Immunfestéssel kimutattattuk egyes P2Y receptorok jelenlétét is. Mivel kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az ATP által kiváltott kalciumtranziensek és a belőlük számított fluxusok gátolhatók voltak suraminnal, ami a P2Y receptorok gátlószere, ez

megerősítette azon feltételezésünket, miszerint a fluxus fenntartott komponensének hozzávetőleg 80% -áért a P2Y receptorok aktivációja és így az SR-ből történő kalciumfelszabadulás a felelős.

V.1.4. Az ATP által kiváltott kalcium fluxus időbelisége

Az extracellulárisan alkalmazott ATP hatása a P2X receptorokon általában rövid ideig tart. A P2X₁ és P2X₃ receptor gyorsan, míg a P2X₂ és a P2X₄ altípusok lassan deszenzitizálódnak. Ráadásul az ATP-t gyorsan lebontják az extracellulárisan mindenhol előforduló exonukleotidázok.

Tekintettel arra, hogy az I_{ATP} amplitúdója nem változik jelentősen az ATP adagolás alatt, a fluxus korai csökkenése nem magyarázható a P2X receptor deszenzitizációjával. Másrészt viszont rámutattunk, hogy a fluxus csúskomponensét teljesen megszüntette a hosszú ideig tartó depolarizáció. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy ezt a komponenst a felszíni membránon keresztül belépő, valamint az SR-ből felszabaduló kalciumionok hozzák létre. A hosszú ideig nyitva levő P2X receptorok azonban elnyújtott depolarizációt is okoznak, ami mind a T-, mind L-típusú áramokat inaktiválja. Hasonlóképpen a tartós depolarizáció a DHPR-ok, mint feszültség szenzorok inaktivációját is előidézi. Ez az SR-ből történő kalciumfelszabadulás megszűnéséhez vezet. Ezen folyamatok együttese a kezdeti kalciumfluxus gyors, néhány másodperc alatt bekövetkező csökkenését eredményezi, ami összhangban áll a megfigyeléseinkkel.

Az, hogy az ATP adagolás hatására megjelenő, tranziens csúcs eltűnik a differenciálódás késői fázisában, az előbbieket alapján két dologgal magyarázható. A fejlődéssel párhuzamosan, a P2X receptorok által okozott depolarizáció egyre kisebb lesz, míg a sejtek nyugalmi membránpotenciálja hiperpolarizáltabb értékeket vesz fel.

Az ATP tehát ezeken a sejthalakokon nem képes akciós potenciált kiváltani, így csak az ionotróp P2X receptorokon keresztül folyamatosan beáramló kalcium, az általa okozott, intracelluláris raktárakból történő, kalcium aktivált kalciumfelszabadulás valamint a P2Y receptorok aktivációja okozhat intracelluláris kalciumkoncentráció növekedést.

V.1.5. Purinoreceptor altípusok tenyésztett vázizomsejteken

Vázizomsejteken több P2X receptor jelenlétét mutatták már ki, így a P2X₁, P2X₂, P2X₅ és P2X₆ (Soto és mtsai, 2003; Ryten és mtsai, 2001; Ruppelt és mtsai, 2001; Meyer és mtsai, 1999) altípust. Ryten és mtsai (2001) mutattak rá, egy jól szabályzott expressziós mintázatra, ennek során a P2X₅ receptor jelenik meg először, majd a P2X₆ és P2X₂ altípus expressziója lesz kimutatható patkány izom embrionális fejlődése során. Mivel a P2X₅ receptor jelenik meg először az embrionális élet során, úgy gondolják, hogy szerepe lehet az izomfejlődés szabályozásában (Ryten és mtsai, 2002). Kísérleteinkben egér primer izomtenyészetben, az 5-10 magot tartalmazó sejteken három P2X receptor altípust sikerült kimutatnunk a P2X₁-, P2X₄- és P2X₇-et. A P2X₂ receptor jelenléte nem volt kimutatható sejtjeinken, ami jó egyezést mutat azzal, amit Ryten és mtsai (2001) állapítottak meg, miszerint ez a receptor altípus csak a késői differenciálódás szakaszában jelenik meg.

A P2X₄ és P2X₇ altípusok jelenlétét vázizmokon eddig még nem írták le. Bo és mtsai (2003) monoklonális antitesteket használva, kimutatták a P2X₄ receptor jelenlétét több patkány szövettípusban, így simaizmokban is. A P2X₇ receptort is csak tengerimalac simaizmain sikerült kimutatni (Menzies és mtsai, 2003). Úgy gondoljuk, hogy az eltérést a fajok, a tenyésztett és az izolált sejtek közti különbözőség, illetve az immunjelölés során fellépő esetleges keresztreakció okozhatja. Ez utóbbi feltevés a legvalószínűtlenebb, mivel kísérleteink során patkány P2X receptorok ellen termeltetett

antitesteket használtunk, melyek nagy fokú homológiát mutatnak az egér purinoreceptorokkal. A $P2X_4$ receptor esetében például az a szekvencia, ami ellen az antitestet termelték azonos patkány és egér esetében, a patkány $P2X_7$ receptor ellenes antitestek kötődését az egér receptorhoz pedig már bemutatták (Solle és mtsai, 2001). Továbbá az általunk megfigyelt I_{ATP} kinetikája, a hosszú ideig fennmaradó, nagy amplitúdójú áram, a $P2X_7$ receptorra jellemző. A kísérleteinkben meghatároztuk a kötőhelyek számát tükröző Hill-koefficiens értékét, és az kettőhöz közeli értéknek adódott ($n=1,66$). Ez összhangban áll azzal a korábbi megállapítással, miszerint az ATP két helyen kötődik a receptorához (Klapperstück és mtsai, 2001).

Bár a $P2Y$ receptorokról már kimutatták, hogy számos emlősfaj simaizomsejtjein előfordul, többek között egérben is, emlősök vázizomsejtjein előfordulásukat eddig még nem dokumentálták. A $P2Y_1$ receptorokról azonban kimutatták, hogy az acetilkolin receptorokkal együtt fordul elő neuromuscularis junctioban, és részt vesz az acetilkolin-észteráz, valamint az AchR mRNS szintjének szabályzásában is csirke myotubulusokban (Choi és mtsai, 2001). Egérben a $P2Y_1$, $P2Y_2$ és a $P2Y_4$ receptorok jelen vannak az embrionális fejlődés alatt (Cheung és mtsai, 2003), expressziós szintjük folyamatosan változik, és a születés után mindhárom receptor altípus down-regulálódik. Immuncitokémiailag mindhárom receptort sikerült kimutatnunk egér tenyésztett vázizomsejteken, bár a $P2Y_2$ receptor expresszióját alacsonynak találtuk. Tenyésztett vázizomsejtek felszíni membránjában az AchR-ok homogénen helyezkednek el, a beidegzés és így a neuromuscularis junctiók hiányában. Ez magyarázhatja az általunk tapasztalt egyenletes eloszlást a $P2Y_1$ receptorok tekintetében.

V.1.6. PKC izoformák jelenléte proliferáló és differenciálódó myotubulusokon

Korábbi tanulmányok már számot adtak arról, hogy a PKC izoenzimcsalád számos tagja megtalálható vázizomsejtekben. A megfigyelések szerint, a tenyésztett humán (Boczán és mtsai, 2000) és patkány (Hong és mtsai, 1995) vázizomsejtek expressziós mintázata eltér egymástól. Korábban már meghatározták az egér tenyésztett vázizomsejteken található PKC izoformákat (Zappelli és mtsai, 1996). Kísérleteinkben a klasszikus és új típusú izoenzymeik közül a PKC α , β , ϵ , és η jelenlétét tudtuk kimutatni. Az atípusos PKC ζ izoforma esetében is intenzív festődést tapasztaltunk, míg a PKC λ / ι és μ jelölődése gyengének bizonyult. Bár a PKC θ izoformáról eredetileg azt tartották, hogy vázizomspecifikus (Osada és mtsai, 1992), de tenyésztett vázizomsejteken sem nekünk, sem más kutatócsoportoknak (Zappelli és mtsai, 1996) a jelenlétét nem sikerült kimutatni.

A PKC izoformák és expressziós mintázatuk számos sejttípusban (Martelli és mtsai, 1999) így vázizomsejtekben is (Boczán és mtsai, 2001) kapcsolatban hozható a sejtek proliferációjával és differenciálódásával. Feltételezhető, hogy a PKC klasszikus izoformái, különösképpen a PKC α , közvetlenül részt vesznek az izomsejtek proliferációjának szabályzásában (Capiati és mtsai, 2000).

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az izomsejtek osztódását mutató proliferációs ráta maximuma, kontrollban a második napon van. ATP jelenlétében ennek értéke lecsökken, és későbbre tolódik. A PKC α kimutatható mind a fejlődés korai, mind késői szakaszában kontroll körülmények között. Az ATP kezelés hatására, a PKC α szintje lecsökken, ezzel egyidőben a sejtosztódás üteme lelassul. A kontroll körülmények között tenyésztett differenciált izomsejtekre jellemző a PKC β pöttyözött magfestődése. ATP kezelés hatására ez a mintázat már a két napos tenyészetek sejtején megfigyelhető volt. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az ATP, a P2Y receptorok

aktiválásával, a PI útvonalon keresztül képes befolyásolni a tenyésztett vázizomsejtek proliferációját/differenciálódását.

V.2. Elemi kalciumfelszabadulási események permeabilizált rostokon

A kalciumfelszabadulás elemi eseményeinek vizsgálata egy viszonylag új módszer, mely mostanában kezd teret hódítani. Az $[Ca^{2+}]_{ic}$ változás építőelemeinek számító események mind megjelenésükben, mind jellemző paramétereik tekintetében különböznek emlősök (Conklin és mtsai, 2000; Kirsch és mtsai, 2001; Zhou és mtsai, 2003), illetve kétélűek esetében (Tsugorka és mtsai, 1995; Klein és mtsai, 1996). Emlősök esetében az elemi események mindkét formája, mind „spark”-ok, mind „ember”-ök előfordulnak, de az események relatív frekvenciája béka izom esetében sokkal nagyobb. Korábbi vizsgálatok alapján kiderült, hogy ezeket az elemi kalciumfelszabadulási eseményeket intakt, Fluo-3-mal jelölt, illetve átvágott emlős izomroston nem lehet megfigyelni, így Kirsch és mtsai (2001) által leírt módszert követve kísérleteinket úgynevezett kémiaailag nyúzott rostokon végeztük. Mérési adataink kielemezéséhez térbeli és időbeli karakterisztikán alapuló elemi eseményeket detektáló módszert alkalmaztunk. Mindez lehetővé tette, hogy összehasonlítsuk a kontroll körülmények közt mért, valamint timol jelenlétében tapasztalt eseményeket.

V.2.1. Kalciumfelszabadulási események timol jelenlétében

A timol 30 μ M koncentrációban növelte az elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciáját, 0,0587-ről 0,0654 s^{-1} sarcomer $^{-1}$ -re. Ez az eredmény összhangban van az átvágott rostokon mért kalciumfelszabadulás változásával, illetve az izolált RYR megnyílási valószínűségének megnövekedésével. Az események frekvenciájának növekedése azonban azt jelzi, hogy nem csak az egész sejtre kiterjedő

kalciumfelszabadulásról van szó az esetünkben. Továbbá az „ember”-ök (melyek valójában az „elemi” események emlős izmokon) relatív aránya a frekvenciánál is jobban nő. Ha összehasonlítjuk mind a „spark”-ok, mind az „ember”-ök átlagos amplitúdóit kontroll körülmények között (0,93 és 0,21), illetve a timol kezelést követően (0,70 valamint 0,17), azt tapasztaljuk, hogy mindkét esetben 20-24%-os a csökkenés. Az események amplitúdójának csökkenését úgy lehet magyarázni, hogy a timol fokozza a nyugalmi kalciumkilépést a raktárból, így az SR kalciumtartalma csökken. Az amplitúdó csökkenésével párhuzamosan nő a csúcs eléréséhez szükséges idő és az események hossza.

Magasabb koncentrációban a timol a legtöbb esetben egy nagymértékű kalciumfelszabadulást okoz, mely oly mértékű, hogy lehetetlené teszi az egyes események detektálását. Néhány esetben a rostok túlélnek a 150 μM timol hozzáadását, ilyenkor azt tapasztaltuk, hogy az események frekvenciája lecsökken, míg az „ember”-ök relatív előfordulása tovább nő. 150 μM koncentrációban a timol hosszú események megjelenését idézi elő. Ezek nagyon hasonlítanak azokra az eseményekre, melyeket korábban béka vázizmokon írtak le, Imperatoxin A kezelés hatására (González és mtsai, 2000; Shtifman és mtsai, 2000). Ez a toxin a csatorna kapuzását befolyásolta, a lipid kettősrétegbe beépített egycsatornás modellen a RYR hosszú ideig tartó megnyílását okozta. Az a tény, hogy a kalciumfelszabadulási események állandó fluoreszcenciaértéket és egyforma térbeli kiterjedést mutatnak, arra utal, hogy a felszabaduló kalcium mennyisége egyensúlyt tart a diffúzióval és a kalciumionok megkötődésével.

Míg az Imperatoxin a kalciumcsatornát egy félig nyitott (szubkonduktancia) állapotban rögzíti (Tripathy és mtsai, 1998), a timolnak méréseink szerint nincs hatása a csatorna vezetőképességére. Tekintettel arra, hogy a kontroll körülmények között mért

„ember”-ök átlagos amplitúdója lényegében megegyezik a timol jelenlétében rögzített hosszú események átlagos amplitúdóival -a kismértékű különbséget az SR kalciumtartalmának változása okozhatja- valószínűsíthető, hogy ezek az események jelentik a kalciumfelszabadulás elemi egységét. Ez azt jelenti, hogy az „ember” vagy egy csatorna nyílását-záródását, vagy több csatorna szinkronizált kapuzását jeleníti meg (Marx és mtsai, 1998; Zhou és mtsai, 2003).

Ahhoz, hogy meghatározzuk az egy „spark” létrehozásáért felelős csatornák számát, először megvizsgáltuk, hogy mekkorák a legnagyobb amplitúdójú események. Mint azt korábban már leírták (Ríos és mtsai, 1999; Jiang és mtsai, 1999) az elemi események amplitúdóiban megfigyelhető különbségek elsősorban abból adódnak, hogy a mérés síkja a kalciumfelszabadulás helyétől változó távolságra (alatta vagy fölötte) helyezkedik el. Minél messzebb van ugyanis a mérés helye a kalciumfelszabadulás helyétől, annál alacsonyabb a lokális $[Ca^{2+}]_i$. Ennek megfelelően a legnagyobb amplitúdójú események feltehetően azon mérésekből származnak, ahol a mérés síkja pontosan egybeesett a kalciumfelszabadulás helyével. A 15 legnagyobb eseményt megvizsgálva azt találtuk, hogy azok átlagos amplitúdójuk 2,96, míg a FWHM érték 2,09 μm volt. A legnagyobb „ember”-ök esetében ezek a paraméterek átlagosan 0,43-nak, illetve 1,72 μm -nek adódtak. A Sun és mtsai (1998) által az elemi események jellemzésére bevezetett „signal mass” (SM) egyrészt arányos az amplitúdó és a FWHM harmadik hatványának szorzatával (Chandler és mtsai, 2003), míg annak első deriváltja a RYR-on átfolyó árammal (ZhuGe és mtsai, 2000). Utóbbi, feltételezve, hogy a hajtóerő nem változik, arányos a résztvevő csatornák számával. Így a „spark” és „ember” létrehozásáért felelős csatornák arányát a

$$N_s / N_e = \{d(A_s \cdot FWHM_s^3)/dt\} / \{d(A_e \cdot FWHM_e^3)/dt\}, \quad (3)$$

képlettel lehet kiszámolni, ahol az s és e alsó indexek jelölik, hogy „spark”-ról, vagy „ember”-ről van szó, az A az amplitúdó, a FWHM a maximális amplitúdó felénél mért térbeli szélesség.

A fenti 15 „spark” és „ember” esetében az SM első deriváltja átlagosan $8,4 \pm 1,0$, illetve $0,29 \pm 0,7 \text{ pls}^{-1}$ volt. Ez azt jelenti, hogy körülbelül 20-30-szor annyi csatorna megnyílása hoz létre egy „spark”-ot, mint egy „ember”-t. Ennek megfelelően, ha az „ember”-t tekintjük egy csatorna megnyílása által létrehozott elemi eseménynek, a „spark” kialakításáért 20-30 csatorna egyidejű megnyílása lehet a felelős. Ha pedig az „ember”-t több csatorna együttes megnyílása okozza, egy „spark” létrehozásában akár 100 csatorna megnyílása is részt vehet (Stern és mtsai, 1997). Fontos megemlíteni, hogy ZhuGe és mtsai (2000) lipid kettősrétegbe visszaültetett RYR-on végzett árammérései alapján meghatározták a csatornán átfolyó áram nagyságát, ami 0,5 pA-nek adódott. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy míg egy „ember” létrehozásának hátterében 1, vagy maximum 2 csatorna áll, addig a „spark” -ot közel 50 csatorna egyidejű megnyílása okozza.

VI. Összefoglalás

Kísérleteink célja a tenyésztett vázizomsejtek kalciumhomeosztázisának, valamint a kalciumfelszabadulás háttérében álló elemi eseményeknek a vizsgálata volt.

Az eredményeink azt mutatják, hogy az ATP megemeli az $[Ca^{2+}]_{ic}$ szintjét mind humán, mind egér tenyésztett vázizomsejteken. A tranziensek vagy lassú, monoton emelkedést mutattak, vagy kétfázisúak voltak, ahol az első, gyorsan kialakuló komponenst egy lassabb, második kalciumbeáramlás követte. A kalciumtranziensek amplitúdója a sejtek differenciálódásának előrehaladtával kezdetben nőtt. Az emelkedés az 5-10 magvú izomcsövek stádiumában érte el a maximumát, majd az amplitúdók csökkenni kezdtek. Ezzel szemben a K-depolarizációval, acetilkolinnal, valamint koffeinnel kiváltható válaszok nagysága a sejtek differenciálódásával párhuzamosan nőtt. Ez egyrészt a feszültségfüggő folyamatok kiépülésével, és a nyugalmi membránpotenciál hiperpolarizáltabb irányba történő megváltozásával illetve az intracelluláris raktárak fejlődésével magyarázható, másrészt a receptorok számának differenciálódás alatti csökkenése is megfigyelhető.

Az ATP adagolásával deszenzitizációt nem mutató, befelé irányuló áramot lehetett kiváltani. Az áramgörbék felszálló szára igen meredek, az áram maximumát körülbelül 300 ms alatt éri el. Az ATP hatásait nem befolyásolta a nAChR antagonistá d-tubokurarin, ami azt igazolta, hogy az ATP nem a nikotin-típusú acetilkolin receptoron keresztül hat, hanem egy ionotróp purinoreceptor aktiválódását idézi elő. A depolarizáció, a feszültségfüggő csatornák gátlása, valamint a külső kalcium eltávolítása főként az ATP alkalmazásával kiváltható fluxusok gyors komponensét csökkentette. A purinoreceptorokat gátló suramin koncentrációfüggő módon csökkentette az ATP alkalmazásával kiváltható válaszokat. Ezzel összhangban mind P2X, mind P2Y

purinoreceptorok jelenlétét sikerült immuncitokémiai módszerekkel is kimutatni. Az ATP hosszantartó alkalmazása a tenyésztett vázizomsejtek proliferációját csökkentette, míg a differenciálódást elősegítette. Az ATP ezen hatása valószínűleg a PKC rendszeren keresztül, a foszfatidil-inozitol jelátviteli útvonalon keresztül valósul meg.

Kísérleteinkben sikerült meghatározni az egész sejtre kiterjedő kalciumfelszabadulások háttérében álló, elemi kalciumfelszabadulási események jellemző paramétereit emlős vázizomban. Kimutattuk, hogy a timol megváltoztatja ezeket a paramétereket, növeli az események előfordulási valószínűségét, csökkenti az amplitúdót és a térbeli kiterjedést, de az események időtartamát megnyújtja. Kis koncentrációban alkalmazva a szert az események megoszlása is megváltozik, az „ember”-ök és az összetett események gyakrabban fordulnak elő, mint kontroll körülmények között. Nagy koncentrációban alkalmazva a timol több száz szekundum hosszú elemi kalciumfelszabadulásokat idéz elő.

Ezek az eredmények hozzájárulhatnak a vázizomsejtek kalciumhomeosztázisának jobb megismeréséhez.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Csernoch Lászlónak, az MTA doktorának, akinek szakmai iránymutatása, értékes segítsége, baráti támogatása nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el. Külön köszönettel tartozom Dr. Cseri Julianna főiskolai docensnek és Dr. Szigeti Gyula adjunktusnak, akik hasznos tanácsaikkal segítettek.

Köszönöm Dr. Kovács László akadémikusnak, a DE OEC Élettani Intézete igazgatójának, hogy munkám elkészítéséhez minden feltételt megadott intézetében és munkám során támogatására mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet minden dolgozójának, különösen Tálasné Őri Róza és Dr. Varga Attiláné asszisztensnőknek munkám során nyújtott önzetlen segítségükért.

Végezetül, de nem utolsósorban köszönöm családom és barátaim megértő támogatását, amely erőt és biztonságos hátteret adott munkám végzéséhez.

Irodalomjegyzék

- Abbracchio MP, Burnstock G (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **64**, 445-475.
- Ashley CC, Mulligan IP, Lea TJ (1991). Ca^{2+} and activation mechanisms in skeletal muscle. *Quart. Rev. Biophys.* **24**, 1-73.
- Barnard EA, Simon J (2001). An elusive receptor is finally caught: P2Y₁₂, an important drug target in platelets. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 388-391.
- Beam KG, Knudson CM (1988). Effect of postnatal development on calcium currents and slow charge movement in mammalian skeletal muscle. *J Gen Physiol* **91**, 799-815.
- Betto R, Senter L, Ceoldo S, Tarricone E, Biral D, Salviati G (1999). Ecto-ATPase activity of alpha-sarcoglycan (adhalin). *J Biol Chem* **274**, 7907-7912.
- Bíró T, Szabó I, Kovács L, Hunyadi J, Csernoch L (1998). Distinct subpopulation in HaCaT cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch Dermatol Res* **290**, 270-276.
- Bo X, Schoepfer R, Burnstock G (2000). Molecular cloning and characterization of a novel ATP P2X receptor subtype from embryonic chick skeletal muscle. *J Biol Chem* **275**, 14401-14407.
- Bo X, Kim M, Nori SL, Schoepfer R, Burnstock G, North RA (2003). Tissue distribution of P2X₄ receptors studied with an ectodomain antibody. *Cell Tissue Res* **313**, 159-165.
- Boczán J, Boros S, Mechler F, Kovács L, Bíró T (2000). Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol* **99**, 96-104.

- Boczán J, Bíró T, Czifra G, Lázár J, Papp H, Bárdos H, Ádány R, Mechler F, Kovács L (2001). Phorbol ester treatment inhibits proliferation and differentiation of cultured human skeletal muscle satellite cells by differentially acting on protein kinase C isoforms. *Acta Neuropathol* **102**, 55-62.
- Brodie C, Kuperstein I, Acs P, Blumberg PM (1998). Differential role of specific PKC isoforms in the proliferation of glial cells and the expression of the astrocytic markers GFAP and glutamine synthetase. *Brain Res Mol Brain Res* **56**, 108-117.
- Brown SC, Beurg M, Grouselle M, Koenig J, Krueger S, Lucy JA, Georgescauld D (1995). Spatial and temporal distribution of $[Ca^{2+}]_i$ in normal human myotubes. A fura-2 imaging study. *Eur J Cell Biol* **66**, 382-388.
- Brum G, Rios E (1987). Intramembrane charge movement in frog skeletal muscle fibres. Properties of charge 2. *J Physiol* **387**, 489-517.
- Burnstock G, Campbell, G, Bennett, M, Holman, ME (1963). Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. *Nature* **200**, 581-582.
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* **24**, 509-81.
- Burnstock G (1996). P2 purinoceptors: historical perspective and classification. In: *P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms. Edited by Wiley, J. and Sons Chichester England* 1-34
- Capiati DA, Vazquez G, Tellez Inon MT, Boland RL (2000). Antisense oligonucleotides targeted against protein kinase C alpha inhibit proliferation of cultured avian myoblasts. *Cell Prolif* **33**, 307-315.
- Cavagna D, Zorzato F, Babini E, Prestipino G, Treves S (2000). Methyl p-hydroxybenzoate (E-218) a preservative for drugs and food is an activator of the ryanodine receptor Ca^{2+} release channel. *Br. J. Pharmacol* **131**, 335-341.

- Censier K, Urwyler A, Zorzato F, Treves S (1998). Intracellular calcium homeostasis in human primary muscle cells from malignant hyperthermia-susceptible and normal individuals. Effect of overexpression of recombinant wild-type and Arg163Cys mutated ryanodine receptors. *J Clin Invest* **101**, 1233-1242.
- Chandler WK, Hollingworth S, Baylor SM (2003). Simulation of calcium sparks in cut skeletal muscle fibers of the frog. *J. Gen. Physiol.* **121**, 311-324.
- Cheng H, Lederer WJ, Cannel MB (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. **262**, 740-744.
- Cheng H, Song LS, Shirokova N, Gonzales A, Lakatta EG, Ríos E, Stern MD (1999). Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images. Theory and studies with an automatic detection method. *Biophys. J.* **76**, 606-617.
- Cheung KK, Ryten M, Burnstock G (2003). Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Dev Dyn* **228**, 254-266.
- Chizh BA, Illes P (2000). P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev* **53**, 553-568.
- Choi RC, Man ML, Ling KK, Ip NY, Simon J, Barnard EA, Tsim KW (2001). Expression of the P2Y1 nucleotide receptor in chick muscle: its functional role in the regulation of acetylcholinesterase and acetylcholine receptor. *J Neurosci* **21**, 9224-9234.
- Cognard C, Constantin B, Rivet-Bastide M, Raymond G (1993). Intracellular calcium transients induced by different kinds of stimulus during myogenesis of rat skeletal muscle cells studied by laser cytofluorimetry with Indo-1. *Cell Calcium* **14**, 333-348.
- Collet C, Strube C, Csernoch L, Mallouk N, Ojeda C, Allard B, Jacquemond V (2002). Effects of extracellular ATP on freshly isolated mouse skeletal muscle cells during pre-natal and post-natal development. *Pflügers Arch* **443**, 771-778.

- Conclin MW, Ahern CA, Vallejo P, Sorrentino V, Takeshima H, Coronado R
Comparison of Ca^{2+} sparks produced independently by two ryanodine receptor isoforms (type I or type 3). *Biophys. J.* **78**, 1777-1785.
- Cunha RA, Sebastião AM (1993). Adenosine and adenine nucleotides are independently released from both the nerve terminals and the muscle fibres upon electrical stimulation of the innervated skeletal muscle of the frog. *Pflügers Arch* **424**, 503-510.
- David JD, See WM, Higginbotham C-A (1981). Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: role of calcium influx preceding membrane union. *Develop Biol* **82**, 297-307.
- De Mey J, Burnstock G, Vanhoutte P M (1979). Modulation of evoked release of noradrenalin in canine saphenous vein of via presynaptic receptors for adenosin but not ATP. *Eur Jornal of Pharmacology* **55**, 401-405.
- Delgado J, Moro G, Saborido A, Megias A (1997). T-tubule membranes from chicken skeletal muscle possess an enzymatic cascade for degradation of extracellular ATP. *Biochem J* **327**, 899-907.
- Drury AN, Szent-Györgyi A (1929). The physiological activity of adenin compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *Journal of Physiology* **68**, 231-237.
- Dubyak GR, El-Moatassim C (1993). Signal transduction via P_2 -purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* **265**, C577-C606.
- Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, North RA (1996). Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol* **497**, 413-422.

- Flucher BE, Conti A, Takeshima H, Sorrentino V (1999). Type 3 and type 1 ryanodine receptors are localized in triads of the same mammalian skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* **146**, 621-30.
- Franzini-Armstrong C, Peachey LD (1981). Striated muscle-contraction and control mechanisms. *J Cell Biol* **91**, 166-186.
- Franzini-Armstrong C, Jorgensen AO (1994). Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu Rev Physiol* **56**, 509-534.
- González A, Kirsch WG, Shirokova N, Pizarro G, Stern MD, Ríos E (2000). Involvement of multiple intracellular release channels in calcium sparks of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **115**, 139-157.
- Goodnight JA, Mischak H, Mushinski JF (1994). Selective involvement of protein kinase C isoenzymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv Cancer Res* **64**, 159-209.
- Goodnight JA, Mischak H, Kolch W, Mushinski JF (1995). Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isoenzymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem* **270**, 9991-10001.
- Grounds MD (1991). Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path. Res. Pract.* **187**, 1-22.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- Henning RH, Duin M, den Hertog A, Nelemans A (1993). Activation of the phospholipase C pathway by ATP is mediated exclusively through nucleotide type P2-purinoreceptors in C2C12 myotubes. *Br J Pharmacol* **110**, 747-752.

- Henning RH, Duin M, van Popta JP, Nelemans A, den Hertog A (1996). Different mechanisms of $\text{Ca}^{(2+)}$ -handling following nicotinic acetylcholine receptor stimulation, P2U-purinoceptor stimulation and $\text{K}^{(+)}$ -induced depolarization in C2C12 myotubes. *Br J Pharmacol* **117**, 1785-1791.
- Henning RH (1997). Purinoreceptors in neuromuscular transmission. *Pharmacol Therapeut* **74**, 115-128.
- Hermann-Frank A, Richter M, Sárközi S, Mohl U, Lehmann-Horn F (1996). 4-chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**, 31-40.
- Hisayama T, Takayanagi I (1986). Some properties and mechanisms of thymol-induced release of calcium from the calcium-store in guinea-pig taenia caecum. *Jap. J. Pharmacol.* **40**, 69-82.
- Holton P (1959). The liberation of adenosin triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *Journal of Physiology* **145**, 494-504.
- Holtzer H, Bishoff R (1970). Mitosis and myogenesis. In: The physiology and biochemistry of muscle as a food *Edited by E. Briskey et al. University of Wisconsin Press, Medison, WI, USA* **2**, 29-51.
- Hong DH, Huan J, Ou BR, Yeh JY, Saido TC, Cheeke PR, Forsberg NE (1995). Protein kinase C isoforms in muscle cells and their regulation by phorbol ester and calpain. *Biochim Biophys Acta* **1267**, 45-54.
- Hume RI, Thomas SA (1988). Multiple actions of adenosine 5'-triphosphate on chick skeletal muscle. *J Physiol* **406**, 503-524.
- Jiang Y-H, Klein MG, Schneider MF (1999). Numerical simulation of Ca^{2+} “sparks” in skeletal muscle. *Biophys. J.* **77**, 2333-2357.

- Kelly AM (1971). Sarcoplasmic reticulum and T tubules in differentiating rat skeletal muscle. *J Cell Biol* **49**, 335-344.
- Keresztes M, Haggblad J, Heilbronn E (1991). Basal and ATP-stimulated phosphoinositol metabolism in fusing rat skeletal muscle cells in culture. *Exp Cell Res* **196**, 362-364.
- Kirsch WG, Uttenweiler D, Fink RHA (2001). Spark- and ember-like elementary Ca^{2+} release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* **537**, 379-389.
- Klapperstück M, Büttner C, Schmalzing G, Markwardt F (2001). Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X_7 receptor. *J Physiol* **534**, 25-35.
- Klein MG, Cheng H, Santana LF, Jiang Y-H, Lederer WJ, Schneider MF (1996). Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature*. **379**, 455-458.
- Kostyuk PG, Belan PV, Tepikin AV (1991). Free calcium transients and oscillations in nerve cells. *Exp. Brain Res.* **83**, 459-64.
- von Kügelgen I, Starke K (1985). Noradrenaline and adenosine triphosphate as co-transmitters of neurogenic vasoconstriction in rabbit mesenteric artery. *J Physiol* **367**, 435-455.
- von Kügelgen I, Wetter A (2000). Molecular pharmacology of P2Y -receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**, 310-323.
- Martelli AM, Sang N, Borgatti P, Capitani S, Neri LM (1999). Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J Cell Biochem* **74**, 499-521.
- Martinson J, Muren A (1963). Excitatory and inhibitory effects of vagus stimulation on gastric motility in the cat. *Acta Physiology Scand.* **57**, 309-316.
- Marx SO, Ondrias K, Marks AR (1998). Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science*. **281**, 818-821.

- McLaren GJ, Mutschler E, Baumert HG, Sneddon P, Kennedy C (1994). Investigation of the actions of PPADS, a novel P2X-purinoceptor antagonist, in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br.J.Pharmacol.* **111**, 913-917.
- Menzies J, Paul A, Kennedy C (2003). P2X₇ subunit-like immunoreactivity in the nucleus of visceral smooth muscle cells of the guinea pig. *Auton Neurosci* **106**, 103-109.
- Meyer MP, Groschel-Stewart U, Robson T, Burnstock G (1999). Expression of two ATP-gated ion channels, P2X₅ and P2X₆, in developing chick skeletal muscle. *Dev Dyn* **216**, 442-449.
- Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron GM, Schaehtle C, Kazaneitz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF (1993). Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* **268**, 6090-6096.
- Muntz L (1990). Cellular and biochemical aspects of muscle differentiation. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**, 215-225.
- Murray NR, Baumgardner GP, Burns DJ, Fields AP (1993). Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation. *J Biol Chem* **268**, 15847-15853.
- Nawa G, Urano T, Tokino T, Ochi T, Miyoshi Y (1998). Cloning and characterization of the murine P2XM receptor gene. *J Hum Genet* **43**, 262-267.
- North RA (1996). P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. In: *P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms. Edited by Wile J. ans Sons Chichester England* 91-109.
- North RA, Surprenant A (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 563-580.

- North RA (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**, 1013-1067.
- Ohno S, Akita Y, Hata A, Osada S, Kubo K, Kohno Y, Akimoto K, Mizuno K, Saido T, Kuroki T, Suzuki K (1991). Structural and functional diversities of a family of signal transduction protein kinases. Protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv Enzyme Regul* **31**, 287-303.
- Osada S, Mizuno K, Saido TC, Suzuki K, Kuroki T, Ohno S (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* **12**, 3930-3938.
- Perez-Reyes E (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**, 117-61.
- Pillai S, Bikle DD (1992). Adenosine triphosphate stimulates phosphoinositide metabolism, mobilizes intracellular calcium, and inhibits terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Clin Invest* **90**, 42-51.
- Protasi F (2002) Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci* **7** 650-658.
- Rios E, Brum G (1987) Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* **325**, 717-20.
- Rios E, Stern MD, Gonzáles A, Pizarro G, Shirokova N (1999). Calcium release flux underlying Ca^{2+} sparks of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **114**, 31-48.
- Ruppelt A, Liang BT, Soto F (1999). Cloning, functional characterization and developmental expression of a P2X receptor from chick embryo. *Prog Brain Res* **120**, 81-90.
- Ruppelt A, Ma W, Borchardt K, Silberberg SD & Soto F (2001). Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X₅ receptor. *J Neurochem* **77**, 1256-1265.

- Ryten M, Hoebertz A, Burnstock G (2001). Sequential expression of three receptor subtypes for extracellular ATP in developing rat skeletal muscle. *Dev Dyn* **221**, 331-341.
- Ryten M, Dunn PM, Neary JT, Burnstock G (2002). ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X₅ receptor on satellite cells. *J Cell Biol* **158**, 345-55.
- Schuhmeier RP, Dietze B, Ursu D, Lehmann-Horn F, Melzer W (2003). Voltage-activated calcium signals in myotubes loaded with high concentrations of EGTA. *Biophys J* **84**, 1065-1078.
- Shtifman A, Ward CW, Wang J, Valdivia HH, Schneider MF (2000). Effects of imperatoxin A on local sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in frog skeletal muscle. *Biophys. J.* **79**, 814-827.
- Silinsky EM (1975). On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol* **247**, 145-162.
- Sipos I, Harasztosi C, Melzer W (1997). L-type calcium current activation in cultured human myotubes. *J Muscle Res Cell Motil* **18**, 353-367.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J Biol Chem* **276**, 125-132.
- Soto F, Garcia-Guzman M, Stühmer W (1997). Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J Membr Biol* **160**, 91-100.
- Soto S, Krause U, Borchardt K, Ruppelt A (2003). Cloning, tissue distribution and functional characterization of the chicken P2X₁ receptor. *FEBS Lett* **533**, 54-58.
- Stern MD, Pizarro G, Ríos E (1997). Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **110**, 415-440.

- Struk A, Lehmann-Horn F, Melzer W (1998). Voltage-dependent calcium release in human malignant hyperthermia muscle fibers. *Biophys J* **75**, 2402-2410.
- Sun J, Xu L, Eu JP, Stamler JS, Meissner G (2001). Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J. Biol. Chem.* **276**, 15625-15630.
- Surprenant A (1996). Functional properties of native and cloned P2X receptors. In: *P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms. Edited by Wile J. and Sons Chichester, England* 208-222.
- Szappanos H, Cseri J, Deli T, Kovács L, Csernoch L (2004). Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *J Biochem Biophys Meth* (In press).
- Takishima K, Setaka M, Shimizu H (1979). On the overshoot of calcium accumulation in fragmented sarcoplasmic reticulum induced by thymol. *J. Biochem. (Tokyo)* **86**, 347-353.
- Tripathy A, Resch W, Xu L, Valdivia HH, Meissner G (1998). Imperatoxin A induces subconductance states in Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors) of cardiac and skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **111**, 679-690.
- Tsugorka A, Ríos E, Blatter LA (1995). Imaging elementary of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* **269**, 1723-1726.
- Urano T, Nishimori H, Han H-J, Furuhashi T, Kimura Y, Nakamura Y, Tokino T (1997). Cloning of P2XM, a novel human P2X receptor gene regulated by p53. *Cancer Res* **57**, 3281-3287.
- Wells DG, Zawisa MJ, Hume RI (1995). Changes in responsiveness to extracellular ATP in chick skeletal muscle during development and upon denervation. *Dev Biol* **172**, 585-590.

- Yasin R, Van Beers G, Nurse KCE, Al-Ani S, Landon DN, Thomson EJ (1977). A quantitative technique for growing human adult skeletal muscle in culture starting from mononucleated cells. *J. Neurol. Sci.* **32**, 1068-1071.
- Zappelli F, Willems D, Osada S, Ohno S, Wetsel WC, Molinaro M, Cossu G, Bouche M (1996). The inhibition of differentiation caused by TGF β in fetal myoblasts is dependent upon selective expression of PKC θ : a possible molecular basis for myoblast diversification during limb histogenesis. *Dev Biol* **180**, 156-164.
- Zhou J, Brum G, González A, Launikonis B, Stern MD, Ríos E (2003). Ca²⁺ sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J. Gen. Physiol.* **122**, 95-114.
- ZhuGe R, Fogarty KE, Tuft RA, Lifshitz LM, Sayar K, Walsh JV Jr. (2000). Dynamics of signaling between Ca²⁺ sparks and Ca²⁺- activated K⁺ channels studied with a novel image-based method for direct intracellular measurement of ryanodine receptor Ca²⁺ current. *J. Gen. Physiol.* **116**, 845-864.
- Zucchi R, Ronca-Testoni S (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol. Rev.* **49**, 1-51.

Közlemények

A tézisek alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

1. Cseri J., **H. Szappanos**, G. P. Szigeti, Z. Csernátony, L. Kovács, L. Csernoch (2002): A purinergic signal transduction pathway in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Pflügers Archiv.* **443**, 731-738. **IF: 1,695**
2. Szentesi P., **H. Szappanos**, Cs. Szegedi, M. Gönczi, I. Jóna, J. Cseri, L. Kovács, L. Csernoch (2004): Enhanced sarcoplasmic calcium release and altered elementary calcium release events in the presence of thymol in mammalian skeletal muscle. *Biophysical Journal* **86**, 1436-1453 **IF: 4,643**
3. **H. Szappanos**, J. Cseri, T. Deli, L. Kovács and L. Csernoch (2004): Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **59**, 89-101 **IF: 1,383**
4. **H. Szappanos**, G. P. Szigeti, J. Cseri, L. Kovács, L. Csernoch (2004): Calcium fluxes and altered proliferation of cultured skeletal muscle cells from mice in the presence of extracellular ATP. *American Journal of Physiology* (közlésre beküldve)

A tézisek alapjául szolgáló idézhető absztraktok:

1. **H. Szappanos**, P. Szentesi, L. Csernoch, L. Kovács, J. Cseri (2002): Calcium transients and purinergic activation on mouse skeletal muscle cells in primary culture. *Acta Physiologica Hungarica* **89**, 35

2. **H. Szappanos**, M. Gönczi, J. Cseri, L. Kovács, L. Csernoch (2003): Elementary calcium release events (ECRE) in the presence of thymol on mammalian skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. **24**, 359.

Egyéb *in extenso* közlemények és idézhető absztraktok:

1. A. Szűcs, **H. Szappanos**, A. Tóth, Zs. Farkas, Gy. Panyi, L. Csernoch, I. Sziklai (2004): Differential expression of purinergic receptor subtypes in the outer hair cells of the guinea pig. *Hearing Research* (közlésre elfogadva) **IF: 1,969**
2. P. Szentesi, J. Cseri, **H. Szappanos**, L. Kovács, L. Csernoch. (2002): ATP and depolarization induced calcium transients at different stages of development in the C2C12 skeletal muscle cell line. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **23**, 28.
3. L. Csernoch, **H. Szappanos**, J. Cseri, M. Gönczi, J. Sabatier, X. Altafaj, M. DeWaard, M. Ronjat (2004): Elementary calcium release events (ECRE) in the presence of the scorpion toxin maurocalcine. *Biophysical Journal*.

Ezek összesített impaktfaktora: 9,69

**Az értekezés alapjául szolgáló, nyomtatásban megjelent
közlemények különlenyomatai**

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	1
I.1. Az izomsejtek általános tulajdonságai	1
I.1.1. A vázizom sajátosságai	1
I.1.2. A vázizom fejlődése: miogenezis	5
I.1.2.1. Myoblastok	6
I.1.2.2. Myotubulusok	6
I.1.2.3. Izomrostok	7
I.2. A purinerg jelátvitel	7
I.2.1. A purinoreceptorok osztályozása	9
I.2.2. A P2X purinoreceptorok funkcionális tulajdonságai	12
I.2.2.1. Agonista tulajdonságok	12
I.2.2.2. Antagonista tulajdonságok	12
I.2.2.3. Ion permeabilitás	14
I.2.2.4. A purinerg anyagok hatásai	14
I.2.2.5. Az ATP hatása vázizmokon	15
I.3. A proteinkináz C rendszer jellemzői és szerepe vázizomsejteken	16
II. Célkitűzések	17
III. Módszerek és eszközök	18
III.1. Vázizomsejtek tenyésztése	18
III.2. Fluoreszcenciás $[Ca^{2+}]$ mérés	19
III.3. A kalcium fluxus számítása	21
III.4. Ionáramok és membránpotenciálok mérése	22
III.5. A sejtosztódás és a differenciálódás vizsgálata	23
III.6. Immuncitokémia	24
III.7. Az elemi események nyomonkövetése	25
III.8. Vegyszerek és statisztikai analízis	28
IV. Eredmények	29
IV.1. Humán tenyésztett vázizomsejtek	29
IV.1.1 Az ATP hatásának vizsgálata	29
IV.1.2. Az ATP által kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ változás nagysága módosul az izomsejtek differenciálódásának függvényében	31
IV.1.3. Az ATP dózis-hatás összefüggése	34
IV.1.4. ATP analógok vizsgálata	35
IV.2. Egér tenyésztett vázizomsejtek	37
IV.2.1. Az ATP által kiváltott kalcium fluxus	37
IV.2.2. Az ATP által kiváltott fluxus jellemző tulajdonságai változnak a fejlődés során	39
IV.2.3. Az ATP ismételt adagolásának hatása	42
IV.2.4. ATP hatása az inward áramokra és a membránpotenciálra	46

IV.2.5. Az ATP által kiváltott fluxus függ a sejtek feszültségfüggő folyamataitól	50
IV.2.6. Mind a P2X, mind a P2Y receptorok aktiválódása szerepet játszik az ATP által kiváltott kalcium fluxus kialakításában	52
IV.2.7. Az ATP gátolja a sejtosztódást, de serkenti a tenyésztett vázizomsejtek differenciálódását primer tenyészetekben	56
IV.2.8. Az ATP befolyásolja a PKC izoenzim mintázatot	58
IV.3. A kalciumfelszabadulás elemi eseményei	61
IV.4. Az emlős vázizmokon megfigyelhető elemi események jellemzése és farmakológiai befolyásolhatósága	62
V. Megbeszélés	67
V.1. Az ATP szerepe harántcsíkolt izomsejtek működésében	67
V.1.1. Az ATP hatásai humán tenyésztett vázizomsejteken	68
V.1.2. Egér tenyésztett vázizomsejtek	69
V.1.3. A fluxust létrehozó kalciumionok eredete	70
V.1.4. Az ATP által kiváltott kalcium fluxus időbelisége	72
V.1.5. Purinoreceptor altípusok tenyésztett vázizomsejteken	73
V.1.6. PKC izoformák jelenléte proliferáló és differenciálódó myotubulusokon	75
V.2. Elemi kalciumfelszabadulási események permeabilizált rostokon	76
V.2.1. Kalciumfelszabadulási események timol jelenlétében	76
VI. Összefoglalás	80
Köszönetnyilvánítás	82
Irodalomjegyzék	83
Közlemények	95
Az értekezés alapjául szolgáló, nyomtatásban megjelent közlemények különlenyomatai	97