

Purinerg jelátvitel a sejtek differenciálódásában és malignus transzformációjában: a P2X₇ receptor kitüntetett szerepe

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Deli Tamás

Témavezető: Dr. Csernoch László

„Látni, amit mindenki lát,
és gondolni, amit még senki sem gondolt.”

(Szent-Györgyi Albert)

Tartalomjegyzék

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
II. BEVEZETÉS	6
II.1. A kísérleteinkben használt sejttípusok néhány jellemző tulajdonsága	6
II.1.1. Vázizomsejtek	6
II.1.1.1. A vázizom fontosabb morfológiai sajátosságai	6
II.1.1.2. Izomfejlődés (myogenesis) és izomregeneráció	8
II.1.1.3. A myogenesis sejttípusainak mikroszkópos morfológiája	9
II.1.2. Melanociták és melanoma sejtek – származás, funkció, mikroszkópos morfológia	10
II.2. Az intracelluláris kalcium sejtelettani jelentősége	11
II.2.1. A kalcium szerepe a differenciációban, proliferációban, apoptózisban és malignus transzformációban	11
II.2.2. Excitábilis és nem excitábilis sejtek Ca^{2+} -homeostasisa	12
II.3. A vizsgált fehérjemolekulák	15
II.3.1. Purinoreceptorok	15
II.3.1.1. A purinerg jelátvitel	15
II.3.1.2. Purinoreceptorok – osztályozás, struktúra, szignáltranszdukciós mechanizmus	16
II.3.1.3. Purinoreceptorok farmakológiája – agonisták és antagonisták, permeabilitás, deszenzitizáció	17
II.3.1.4. Purinoreceptorok – előfordulás és biológiai hatások	19
II.3.1.5. Purinoreceptorok a vázizomban, melanocytákban és melanoma malignum sejtekben	20
II.3.1.6. Purinoreceptorok – a P2X ₇ R speciális tulajdonságai és szerepe	21
II.3.2. Rianodin receptor (RyR)	23
II.3.3. Protein-kináz C (PKC)	24
III. CÉLKITŰZÉSEK	26
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
IV.1. Sejtek és sejtenyésztés	28
IV.1.1. C2C12 egér vázizom sejtvonal tenyésztése	28
IV.1.2. Primer egér szatellitasejt-tenyésztés készítése	29
IV.1.3. Primer humán melanociták tenyésztése és azonosítása	30
IV.1.4. Humán melanoma sejtvonalak tenyésztése	31
IV.2. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásainak követéséhez kapcsolódó módszerek	31
IV.2.1. Egyedi sejten történő fluoreszcens $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérés	31
IV.2.2. A Ca^{2+} -fluxus (FL) kiszámítása	33
IV.3. Immundetekciós módszerek	34
IV.3.1. Immuncitokémia és immunhisztokémia	34
IV.3.2. Western immunoblot	36
IV.4. Az siRNS technika	37

IV.5. Ionáram- és membránpotenciál-mérések.....	37
IV.6. A sejtprolifерáció és sejthalál vizsgálata.....	38
IV.6.1. MTT sejtprolifерációs teszt.....	38
IV.6.2. Áramlási citometriás apoptosis vizsgálat.....	38
IV.6.3. Nekrotikus sejtek arányának meghatározása - tripánkék exclusiós teszt.....	39
IV.7. Tumornövekedés és metastasisképzés <i>in vivo</i> állatmodellben.....	39
IV.8. Statisztikai analízis.....	40
IV.9. A használt vegyszerek és eszközök kereskedelmi forgalmazói.....	40
 V. EREDMÉNYEK.....	 42
V.1. A purinerg szignalizáció változásai C2C12 egér myoblast sejtvonal differenciálódása során.....	42
V.1.1. ATP és KCl-depolarizáció hatásának dózis- és korfüggése.....	42
V.1.2. ATP és KCl-depolarizáció hatása extracelluláris Ca^{2+} hiányában.....	44
V.1.3. Az ATP és KCl által kiváltott válaszok változásai PKC α - és PKC δ -overexpresszió indukálta differenciáció és proliferáció során.....	46
V.1.4. Purinerg receptorok expressziós mintázatának változásai SID és PKCID során.....	49
V.2. A purinerg szignalizáció változásai primer tenyésztett egér vázizomsejtek differenciálódása során.....	50
V.2.1. ATP hatásának dózis- és korfüggése.....	50
V.2.2. ATP hatása extracelluláris Ca^{2+} hiányában, illetve depolarizált sejteken.....	53
V.2.3. Az ATP-re adott bifázisos Ca^{2+} -válasz kialakításában részt vevő purinerg receptor altípusok azonosítása.....	58
V.2.4. A P2X ₇ receptor szerepének további vizsgálata az ATP által kiváltott ionáramokban.....	63
V.3. Melanoma malignum sejtek purinerg szignalizációjának speciális sajátosságai.....	65
V.3.1. A purinerg szignalizáció megjelenése a melanomagenesis során.....	65
V.3.2. Farmakológiaiilag normálisan működő P2X ₇ purinoreceptor overexpressziójának igazolása melanoma sejtekben.....	66
V.3.3. A melanoma P2X ₇ receptorának hatása az apoptosisra, necrosisra és metastasisképzésre.....	69
V.3.4. Rianodinreceptor-overexpresszió, -diszfunkció és RyR-P2X ₇ R interakció melanomában.....	71
 VI. MEGBESZÉLÉS.....	 75
VI.1. C2C12 sejtek purinerg szignalizációjának változásai a differenciálódás és proliferáció során.....	75
VI.1.1. Változások szérumban indukálta differenciálódás (SID) során.....	75
VI.1.2. Változások PKC α overexpresszió kiváltotta differenciálódás (PKCID) során.....	77
VI.1.3. Változások PKC δ overexpresszió kiváltotta proliferáció során.....	79
VI.2. Primer tenyésztett egér vázizomsejtek purinerg szignalizációjának változásai a differenciáció és proliferáció során.....	79

VI.2.1. A bifázisos Ca^{2+} -tranziens jelentősége.....	79
VI.2.2. A Ca^{2+} -tranziens korai, gyors fázisa.....	80
VI.2.3. A Ca^{2+} -tranziens késői, fenntartott fázisa.....	81
VI.2.4. A Ca^{2+} -tranziens egyes fázisait alkotó P2X és P2Y receptor altípusok azonosítása.....	82
VI.3. Purinerg szignalizáció melanoma malignumban.....	83
VI.3.1. P2X ₇ R melanocytákon és melanoma sejteken – elhelyezkedés, funkció.....	83
VI.3.2. RyR melanocytákon és melanoma sejteken – elhelyezkedés, funkció.....	84
VI.3.3. RyR-P2X ₇ R kölcsönhatás melanomában – hogyan?.....	86
VI.3.4. RyR-P2X ₇ R kölcsönhatás melanomában – miért?.....	88
VI.3.5. RyR és P2X ₇ R lehetséges in vivo agonistái és antagonistái.....	89
VI.3.6. RyR és P2X ₇ R farmakológiai agonistáinak és antagonistáinak lehetséges terápiás felhasználása.....	90
 VII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	 92
SUMMARY.....	94
 VIII. IRODALOMJEGYZÉK.....	 96
 IX. ÁBRAJEGYZÉK.....	 107
 X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	 109
 XI. KÖZLEMÉNYEK.....	 110
 XII. FÜGGELÉK.....	 113

I. Rövidítések jegyzéke

ADA: adenzin-deamináz	DNS: dezoxiribonukleinsav
ADP: adenzin-difoszfát	eA: ectoATPáz
AM: acetoxi-metilészter	EC: extracelluláris (tér)
AMP: adenzin-monofoszfát	EC₅₀: félhatásos dózis (effective concentration in 50%)
Ap4A: diadenzin-tetrafoszfát	ECL: erősített kemilumineszcencia (enhanced chemiluminescence)
ATP: adenzin-trifoszfát	EDTA: etilén-diamin-tetraacetát
ATPγS: adenzin-5'-O-(3-tiotrifoszfát)	EGFR: epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
BBG: briliánskék-G (brilliant blue G)	EGTA: etilén-glikol-bisz(2-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
BCA: bicinchoninic acid	ER: endoplasmaticus reticulum
BPE: marhahipofízis-kivonat (bovine pituitary extract)	Ex-ch: másodlagosan aktív kalcium/nátrium antiporter
BSA: marhaszérum albumin (bovine serum albumin)	FCS: foetalis borjúszérum (foetal calf serum)
BzATP: 3'-O-(4-benzoil)benzoil-ATP	FITC: fluoreszcein-izotiocianát
Ca_{Fura}: Fura-2-höz kötött Ca ²⁺ -mennyiség	FKBP: FK-506 kötő protein (FK-506 binding protein)
Ca_{parv}: parvalbuminhoz kötött Ca ²⁺ -mennyiség	FL: Ca ²⁺ -fluxus
Ca_{pumpa}: a pumpákhoz kötött Ca ²⁺ -mennyiség	FL_{csúcs}: a Ca ²⁺ -tranziens korai fázisa során mért fluxus
Ca_{szabad}: a szabad citoplazmatikus Ca ²⁺ -mennyiség	FL_{plató}: a Ca ²⁺ -tranziens késői, fenntartott fázisa során mért fluxus
Ca_{tot}: teljes intracelluláris Ca ²⁺ -mennyiség	FRET: fluoreszcencia rezonancia energia-transzfer
Ca_{transzp}: a Ca ²⁺ -eltávolító mechanizmusok által transzportált Ca ²⁺ mennyisége	G-prot: G-protein
Ca_{tropC}: troponin C-hez kötött Ca ²⁺ -mennyiség	H+L: könnyű és nehéz (heavy és light) lánc
[Ca²⁺]_e: extracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció	HeLa: Henrietta Lacks (az ő cervix carcinomájából származó sejtvonal elnevezése)
[Ca²⁺]_i: intracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció	HGF: hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
Δ[Ca²⁺]_i: az intracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció változása	hrEGF: humán rekombináns epidermalis növekedési faktor (human recombinant epidermal growth factor)
CaM: kalmodulin	HRPO: tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
CICR: kalcium indukálta kalciumfelszabadulás (calcium induced calcium release)	HS: lószérum (horse serum)
CMF: Ca ²⁺ /Mg ²⁺ mentes (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ free)	I_{xyz}: xyz által kiváltott áram
CPA: ciklopiázonsav	IC: intracelluláris (tér)
CRAC-Ch: kalciumfelszabadulás aktiválta kalcium csatorna (calcium release activated calcium channel)	IL-1β: interleukin-1 β
Crc: calreticulin	i.p.: intraperitoneális
Csq: calsequestrin	IP₃/R: inozitol-1,4,5-triszfoszfát / receptor
DAG: 1,2-diacyl-glicerol	
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	
DHPR: dihidropiridin receptor	
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	
DMSO: dimetil-szulfoxid	

Lbx1: lady bird homolog-1	PTI: Photon Technology International
lig: ligandum	PV_{max}: a Ca ²⁺ -transzport maximális sebessége
Lig-Ch: ligandfüggő ioncsatorna (channel)	qPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció (quantitative polymerase chain reaction)
M: mitokondrium	RISK: RNS indukálta „elnémító” komplex (RNA induced silencing complex)
m: monoklonális	RNS: ribonukleinsav
MAPK: mitogén aktiválta protein-kináz	RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute- 1640
MDSC: izomból származó őssejtek (muscle- derived stem cells)	RyR: rianodin receptor
2ME: 2-metoxi-ösztradiol	SCID: súlyos kombinált immundeficiencia (severe combined immune deficiency)
α,β-meATP: α,β-metilén-ATP	SDS-PAGE (SB): nátrium-dodecil-szulfát- poliakrilamid gélelektroforézis (mintájá- nak puffere) [sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (sample buffer)]
β,γ-meATP: β,γ-metilén-ATP	SEM: az átlag standard hibája (standard error of the mean)
2-MeS-AMP/ADP/ATP: 2-metiltio- AMP/ADP/ATP	SERCA: sarco-endoplasmaticus reticulum kalcium ATPáz
Metab-Rec: metabotrop receptor	SFM: szérumentes tápoldat (serum free medium)
MP: membránpotenciál	SID: szérum indukálta differenciáció
mRNS: messenger RNS	siRNS: kis/rövid interferáló RNS; „elnémító” RNS (small/short interfering RNS; silencing RNS)
MRS 2179: N ⁶ -metil-2'-deoxiadenozin-3',5'- biszulfát	SOCE: raktárak vezérelte kalciumbelépés (store operated calcium entry)
Msx1: muscle segment homeobox-1	SSP: felszínesen terjedő melanoma (superficially spreading melanoma)
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium-bromid	SR: sarcoplasmaticus reticulum
Myf5: myogenic factor-5	SRE: szérumra válaszoló rész (DNS-ben) (serum response element)
MyoD: myoblast determination protein	SRF: szérumra válaszoló faktor (serum response factor)
n.s.: nem szignifikáns	TGFβ: transzformáló növekedési faktor β (transforming growth factor β)
NANC: nem adrenerg, nem kolinerg	TNP-ATP: 2' (vagy 3')-O-trinitrofenil-ATP
NE: nemzetközi egység	TR: Texas vörös (Texas Red)
NF023: 3'-urea-8-(benzamido)naftalén-1,3,5- trisulfonsav	TROP: troponin-tropomiozin komplex
NMDG: N-metil-D-glukamin	TRP: tranziens receptorpotenciál
o-ATP: oxidált ATP	ttkg: testtömeg kilogramm
OD: optikai denzitás	VG-Ch: feszültségvezérelt ioncsatorna (voltage-gated channel)
OOI: Országos Onkológiai Intézet	
p: poliklonális	
P2X_{xyz}R: P2X _{xyz} receptor	
Pax-3: paired box protein-3	
PBS: foszfátpuffer (phosphate buffered saline)	
PIP₂: foszfatidil-inozitol-4,5-difoszfát	
PKC: protein-kináz-C	
PKCID: PKC indukálta differenciáció	
PL: foszfolambán	
PLC: foszfolipáz-C	
PMA: forbol-12-mirisztát-13-acetát	
PPADS: piridoxál-foszfát-6-azofenil-2',4'- disulfonsav	
PS: foszfatidil-szerin	

II. Bevezetés

II.1. A kísérleteinkben használt sejttípusok néhány jellemző tulajdonsága

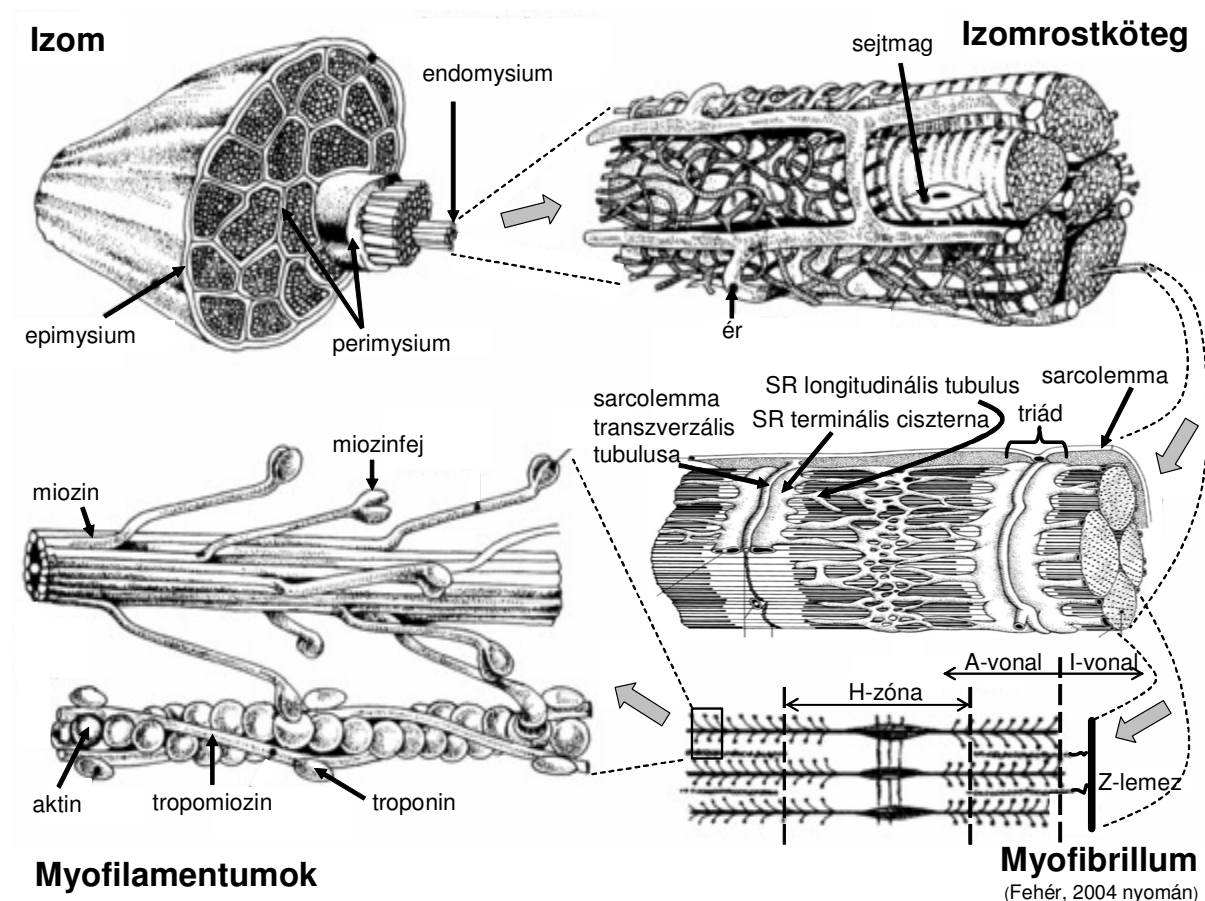
II.1.1. Vázizomsejtek

Számos különféle funkciójú sejttípusra jellemző az aktin- és miozinfilamentumok speciális kölcsönhatása révén megvalósuló összehúzódás képessége, vagyis a kontraktilitás. Bár kontraktilis sejtekről hallva a legtöbb embernek az izomsejtek jutnak eszébe, nem szabad elfelejtenünk, hogy ugyanilyen molekuláris elven működő összehúzódásra képesek egyéb mesodermális eredetű sejtek, úgymint az érfal felépítésében kulcsfontosságú endothelialis sejtek (Boyer és mtsai, 2006) és pericyták (Shepro és Morel, 1993), sőt, az ontogenezis során a külső csíralemez is létrehozza a maga kontraktilis sejtjeit: ezek a különféle ectodermális eredetű mirigyek szekrétumainak a mirigyből történő kiürítéséért felelős myoepithelialis sejtek.

A „klasszikus” kontraktilis sejteknek, az izmoknak három típusát különböztetjük meg: míg a simaizmok nem rendelkeznek sarcomerákba rendeződött kontraktilis apparátussal, a szív- és vázizom erősen organizált struktúrája a fénymikroszkópban megfigyelhető harántcsíktolt képet eredményezi. A simaizmok a zsigerek felépítésében vesznek részt, a szívizom a keringés folyamatos fenntartásának és szükség esetén gyors adaptációjának igényéhez alkalmazkodott, míg a csontrendszeren tapadó vázizomzat szerepe a jellemző testtartás és a helyváltoztatás biztosítása. Előbbi két szövet vegetatív és endokrin, míg utóbbi somatomotoros vezérlés alatt áll.

II.1.1.1. A vázizom fontosabb morfológiai sajátosságai

A makroszkóposan is látható vázizmot durva kötőszövetes tok, az epimysium határolja, melyen belül az izomrostok kötegei (fasciculusok) egy újabb kötőszövetes burokba, a perimysiumba zárva helyezkednek el. A számos prekursor sejt összeolvadásából létrejött többmagvú izomrostot a finom endomysium burkolja, mely vér- és nyirokereket, illetve idegeket tartalmaz (1. ábra). Az izomrost sejtmembránját, a sarcolemmát membrana basalis fedi. A sejt cytoplasmájának, melyet vázizom esetében sarcoplasmának vagy myoplasmának is neveznek, jelentős tömegét alkotják a myofibrillumok, melyek a vékony (aktin) és vastag (miozin) myofilamentumokból épülnek fel. A myofibrillumok periodikusan ismétlődő szakaszai a sarcomerák, ezek végét az ún. Z-lemezek jelzik, melyek az aktinszálak egyik végének rögzítésére szolgáló struktúrák. A sarcomer miozint tartalmazó részei alkotják az



I. ábra. A vázizom felépítésének hierarchiája. (SR: sarcoplazmaticus reticulum.)

A- (anizotróp) vonalat, a csak aktint tartalmazó részek pedig az I- (izotróp) vonalat. Előbbi közepén a csak miozinból álló H-zóna, míg utóbbi közepén a Z-csík található. Az aktinnal szoros kapcsolatban találjuk szabályozó fehérjeit, a rácsavarodott tropomiozint és a kalcium-szignált dekódoló troponint. Sajátosan a kifejelett vázizomra jellemző, hogy a nagy tömegű kontraktilis rendszer a perifériára sztorítja az izomrostoként akár több száz magot. Az excitációs-kontrakciós kapcsolat morfológiai feltételeit az ún. triád struktúra teremti meg. A vázizom speciálisan módosult endoplazmatikus retikuluma az SR¹, melynek a sarcomerekkel párhuzamos longitudinális (L) tubulusai terminális ciszternákká tágulnak a Z-lemezek fölött, ahol igen szoros fizikai közelségbe kerülnek a sarcolemmával folytonos, annak invaginációjával létrejövő transzverzális (T) tubulusokkal. Egy T tubulus és a két oldalról hozzáfekvő két terminális cisztérna alkotja a triádot, melynek – mint látni fogjuk – alapvető szerepe van az excitációs-kontrakciós kapcsolat folyamataiban.

¹ A dolgozatban szereplő rövidítések jelentésének többségét – a szöveg jobb áttekinthetősége érdekében – a szövegtörzsben nem adtam meg, ennek megfelelően viszont a dolgozat elején külön részben, *I. Rövidítések jegyzéke* cím alatt valamennyi megtalálható betűrendben felsorolva.

II.1.1.2. Izomfejlődés (myogenesis) és izomregeneráció

Az előzőekben felvázolt specializált struktúra kialakulása mind az intrauterin életben bekövetkező izomfejlődés és -differenciáció, mind a postnatalis sérüléseket követő izomregeneráció során jól szabályozott, többlépcsős fejlődési folyamat végeredményeként jön létre. (A téma részletes áttekintése megtalálható a Neuromuscular Disease Center internetes oldalán; Neuromuscular Disease Center, 2005.) A törzs és a végtagok izomsejtjeinek prekursorai a mesodermális eredetű somiták dermomyotomjainak, majd myotomjainak epaxialis és hypaxialis elhelyezkedésű differenciálatlan mesenchymasejtjei. Ezek delaminációját és a megfelelő helyre történő migrációját követően jönnek létre a törzs és a végtagok izomzatának kezdeményei (Buckingham és mtsai, 2003). Ezek a prekursor, még multipotens mesenchymalis sejtek vándorlásuk során és a végtagbimbókba érve intenzív proliferációba kezdenek, ezzel párhuzamosan pedig beindul a determinációnak nevezett folyamat, melynek végeredményeként létrejönnek az izom irányú differenciálódásra elkötelezett, de még a terminális differenciálódás előtt álló myoblastok. Ezen sejtek fúziójával két hullámban történik meg a terminálisan differenciálódott izomcsövek (myotubulusok) képződése: az első hullám eredményezi az ún. primer myotubulusokat (egérben ez az embryonális élet második hetének második felében történik), a második hullám során pedig (egérben a megtermékenyítés utáni harmadik hét első felében) az első körben a TGF β által szupprimált myoblastokból az innerváció megjelenésével párhuzamosan a primer izomcsövek körül kialakulnak a szekunder myotubulusok (Buckingham és mtsai, 2003). Az izomcsövek további myoblastokkal fuzionálva növekszenek, majd az izomspecifikus fehérjék, különösen a könnyű és nehéz filamentumok nagy tömegben beinduló szintézisének eredményeképpen a myoplasma térfogatának jelentős centrális részét a kontraktilis fehérjék töltik ki, a sejtmagok a sarcolemma alá szorulnak és megjelenik a vázizom fentebb bemutatott differenciált formája, az izomrost.

A delamináció-migráció-proliferáció-determináció-differenciáció-izomrostképződés eseménysor szoros genetikai szabályozás alatt áll (Muntoni és mtsai, 2002). A myogenesis során nukleáris transzkripciós faktorok, sejtfelszíni receptorok, illetve szekretált molekulák szekvenciális aktiválása és gátlása, átírásának fokozódása vagy csökkenése eredményezi a fentebb bemutatott folyamat zavartalan lezajlását. A legfontosabb résztvevő gének és termékeik az egyes fázisokban (a teljesség igénye nélkül): delamináció – Pax3 (nukleáris faktor), c-met (HGF-receptor tirozin-kináz); migráció – c-met, Lbx1 (nukleáris faktor); proliferáció – Pax3, c-met, Mox2 (homeobox transzkripciós faktor), Msx1 (transzkripciós faktor); determináció – Myf5, MyoD (transzkripciós faktorok); differenciáció – myogenin; izomrostképződés

– Lbx1, Mox2 (konkrét izomcsoportok kialakulásáért felelős transzkripció faktorok) (Muntoni és mtsai, 2002).

Az izomrostok kialakulása nem zárul le véglegesen az embryonális és magzati korban, hiszen a növekedés során és izomsérülést követően a postnatalis életkorban is képződik vázizomrost *de novo*. Bár jelen ismereteink szerint lehetséges izomrostok újdonszerveződése extramuscularis szövetekből származó, így például a vázizomban megtapadó csontvelői (Ferrari és mtsai, 1998), embryonális vascularis eredetű (De Angelis és mtsai, 1999), idegrendszeri (Clarke és mtsai, 2000) vagy éppen dermalis (Young és mtsai, 2001) ősz- (stem) sejtekből is, mégis az az általánosan elfogadott elképzelés, hogy felnőtt korban az izomrostképződés fő forrásául szolgáló sejtek magában a vázizomban, a rostok lamina basalis alatt helyezkednek el. Ezek *in vitro* tenyészetekben mutatott sajátosságai és sejtfelszíni, valamint intracelluláris markerei alapján számos különböző módon csoportosíthatók, alapvetően azonban két sejttypus különíthető el: az izom eredetű őssejtek (MDSC-k, muscle-derived stem cells) és a szatellitasejtek (Qu-Petersen és mtsai, 2002). (Egyes szerzők ezeket egymás alcsoportjaiként kezelik, mások a fogalmakat szinonimaként használják.)

Az MDSC-k a csontvelőben és a szervezet egyéb szöveteiben (lásd fent) megtalálható pluripotens őssejtek közé tartoznak és számos meso- és ectodermális szövetképesek differenciálódni. Az izomregenerációban vagy közvetlenül, vagy szatellitasejtek képzésén keresztül vehetnek részt. A szatellitasejtek tulajdonképpen az izomrost lamina basalis alatt nyugvó állapotba került myoblastok (Mauro, 1961), melyek az izom irányú differenciálódás felé sokkal elkötelezettebbek a MDSC-knél és ezen jellemző sajátosságuk szoros összefüggést mutat Pax7 pozitívításikkal, melyre az MDSC-k negatívak (Seale és mtsai, 2000). A szatellitasejtek származási helye az embryonális korban nem egyértelmű. Mesenchymalis eredetük igen valószínű, de a korai myoblastokhoz hasonló somitalis eredet mellett a sejtek pozitívítása az endothelsejtmarkerekre felveti az endothelialis-vascularis származást is. A postnatalis életben a felhasználódott szatellitasejtek pótlása részben a maradék szatellitasejtek osztódása, részben pedig az MDSC-k proliferációja és differenciációja révén valósulhat meg. Az izmot ért károsító behatás nyomán a nyugvó sejtek aktiválódnak, és a myoblast-myotubulus-izomrost fejlődési sort végigjárva pótolják az elveszett rostokat.

II.1.1.3. A myogenesis sejttypusainak mikroszkópos morfológiája

In vitro az izomfejlődés jól reprodukálható akár immortalizált myoblast sejtvonalak megfelelő tenyésztésével, akár speciális emésztéssel nyert szatellitasejt-tenyészet fenntartásá-

val és differenciáltatásával, mely módszereket mi is alkalmaztuk (lásd még a IV.1.1. és IV.1.2. alfejezeteket). Ilyenkor jól követhetőek a fejlődés különböző stádiumaiban levő sejtek morfológiai változásai (8./a ábra). A lamina basalis alól kiszabadított primer szatellitasejtekből kialakuló, vagy – sejtvonal esetében – az immortalizált myoblastok típusosan orsó alakú, fibroblastokhoz hasonló megjelenésű sejtek nagy sejtmaggal és jól látható nucleolusszal, de természetben gyakran látni őket mint halvány cytoplasmájú, nyúlványos, csillag alakúra kiterült, laza hálózatot formáló sejteket prominens nucleussal és nucleolusokkal, ami egyértelműen utal mesenchymalis eredetükre. A myoblastok fúziójával létrejövő elongált, cilindrikus sokmagvú képződmények az izomcsövek. A myotubulusok körül membrana basalis alakul ki. Sejtmagjaik centrális helyzetűek. Bár már ekkor megjelennek és kötegekbe rendeződnek a kontraktilis fehérjék, további sejtfúziók és myofibrillum-szintézis szükséges ahhoz, hogy létrejöjjenek a fénymikroszkópban harántcsíkolt képet mutató, sarcomerákba rendezett myofibrillumok által a perifériára szorított több tucat maggal rendelkező, *in vitro* is párhuzamos lefutású izomrostok, melyek az izomdifferenciálódás végeredményét jelentik.

II.1.2. Melanocyták és melanoma sejtek – származás, funkció, mikroszkópos morfológia

A melanocyták a dúclécből származó sejtek, melyek a dermisen keresztül vándorolnak az epidermis stratum basalejába. Kis, kerek, az epidermisz membrana basalisán ülő sejtek, melyek számos nyúlványt küldenek a stratum spinosum keratinocytái közé. Elsődleges feladatuk a melanintermelés, melyet tirozinból állítanak elő. A tirozint a sejtek kis vezikulumokban, ún. premelanosomákban tárolják, ahol megtörténik a tirozin melaninná történő átalakítása. Ettől kezdve a vezikulát melanosomának hívjuk. A melanosomák a sejttestben képződnek, ahonnan a dendritikus nyúlványba vándorolnak. A nyúlványok csúcsi részeiben összegyűlő melanosomák a nyúlványok csúcsi részeivel együtt lefűződnek a sejtekről, és a szomszédos keratinocyták egy fagocitózisra emlékeztető folyamat során bekebelezik azokat. Végül tehát a melaninszemcsék a keratinocytákban is megjelennek annak ellenére, hogy azok melanint nem termelnek, így a melanocyták a bőr pigmentáltságát, közvetve pedig az UV-sugárzással szembeni védelmét biztosítják. Az általunk használt, humán bőrből enzimatikusan izolált pigmentsejtek fénymikroszkópban igen hosszú nyúlványokkal rendelkező, legtöbbször bipoláris, de alkalmanként kettőnél több, dentritszerű nyúlványt is növesztő sejtekként jelentek meg, mely tulajdonságok feltehetőleg összefüggésben állnak neuroectodermalis eredetükkel (6. ábra). Barna melanin pigmentet szemmel láthatóan nem termeltek *in vitro* körülmények között, de HMB-45 ellenes, melanosoma-specifikus antitestekkel végzett immunfestések ta-

núsága szerint melanosomákkal rendelkeztek (6. ábra). Jellemzőnek mondható még a nagyobb konfluenciát elérő tenyészetekben a sejtek örvényes elrendeződése.

A melanocyták jóindulatú, lokalizált proliferációjának eredményeként jön létre a naevus (egyik köznapinévén az „anyajegy”), az ebben található módosult melanocyták a naevussejtek (naevocyták). Akár naevussejtek, akár melanocyták esetében bekövetkezhetnek olyan mutációk, melyek onkogének aktiválása és/vagy tumorszuppresszor gének inaktiválása révén malignus transzformációhoz, ez esetben melanomagenesishez vezet, és kialakul az egyik legrosszindulatúbb ismert tumorfajta, a melanoma malignum. Ennek megfelelően a malignus melanoma minden olyan szövetben jelen lehet primer tumorként, amelyben melanocyták előfordulnak, így a bőrön (elsősorban annak napnak kitett felületein) kívül a retina és az iris pigmentsejtjeiből is kiindulhat, csakúgy, mint a vaginából, anusból és a szájüregből. Áttéti daganatként pedig szinte bármely szervben találkozhatunk vele. Metastasisképzési hajlam alapján megkülönböztetjük az úgynevezett felszínesen terjedő melanomát (SSP, superficially spreading melanoma), mely csak későn ad áttétet és sokáig az epidermisre korlátozódik, illetve a nodularis, korán a mélyebb rétegekbe penetráló és korán metastatisáló formát. Pigmentáltság szerint melanotikus és amelanotikus formákat szokás elkülöníteni, melyek közül az utóbbit (a melanintermelés hiányát mint a dedifferenciálódás egy kézzelfogható jelét felfogva) általában rosszindulatúbbnak tekintjük. Az esetleges pigmentáltságtól eltekintve a melanoma sejtek mikroszkópos megjelenése nem különbözik jelentősen a malignus tumoroknál megszokott képtől (a grádusnak megfelelő fokú anaplasia jeleként különböző mértékű pleomorphismus, maghyperchromia, nagy és bizarr formájú magok jelenléte, megnövekedett számú és gyakran atípusos mitózis figyelhető meg; 30. ábra)

II.2. Az intracelluláris kalcium sejtélettani jelentősége

II.2.1. A kalcium szerepe a differenciációban, proliferációban, apoptosisban és malignus transzformációban

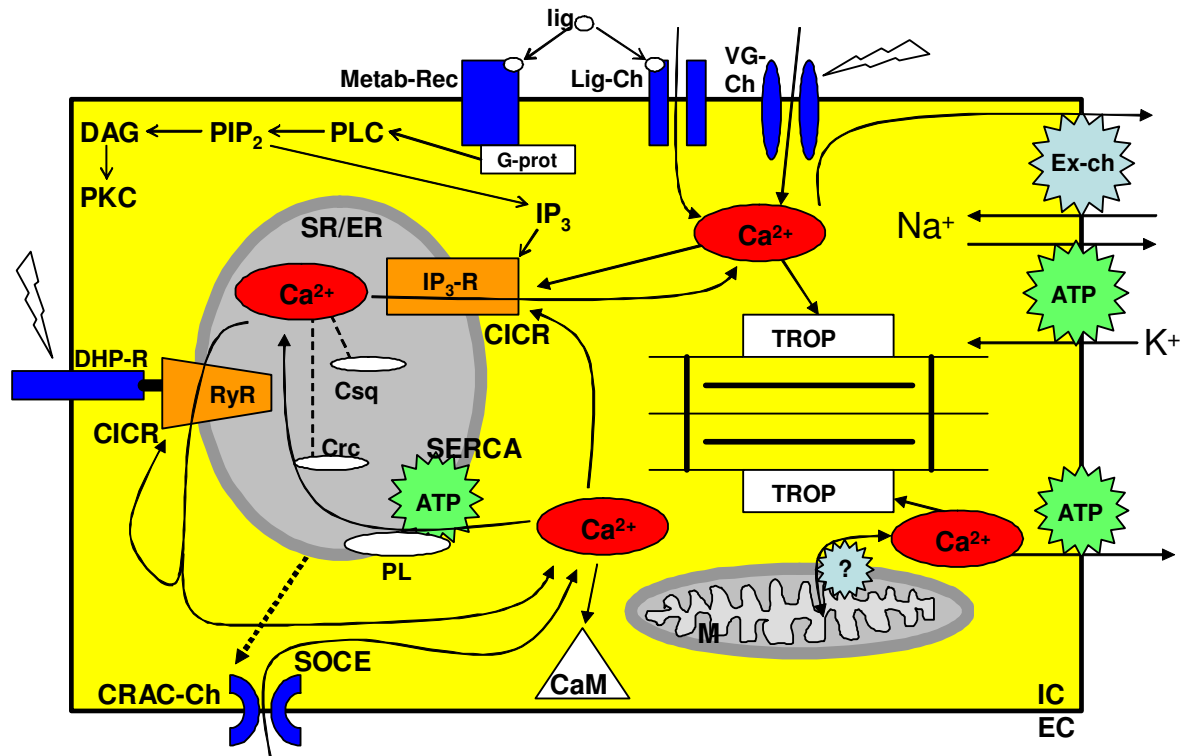
A magasabb rendű élőlények szervezetének felépítésében és funkciójában a kalcium jelentős szerepet játszik, akár a sejten kívüli térben, akár intracellulárisan fordul elő. Előbbire példa a csontok mátrixának felépítésében, az alvadási kaszkád aktiválásában vagy éppen a sejt felszíni ioncsatornák feszültség-szenzorai érzékenységeinek beállításában betöltött funkciója (sőt, a legújabb kutatások sejt felszíni, direkt, G-proteinhez kapcsolt kalciumreceptorok jelenlétére engednek következtetni; Breitwieser, 2006), míg a sejten belüli alapvető fontosságú szabályozó szerepe magában foglalja az elektromechanikai kapcsolat megvalósítását, vala-

mint számos folyamatban betöltött kulcsszerepét második jelátvivőként (second messenger). Utóbbi feladatkörében a Ca^{2+} mára általánosan elfogadottan a rövidtávú sejtfunciók regulálásán (pl. exocitózis) túl a sejt hosszútávú sorsát meghatározó folyamatok, mint a differenciáció (pluri- vagy multipotens sejtek speciális funkcióra való elköteleződése és az ennek megfelelő fenotípus kialakítása), a proliferáció (a sejtek szaporodása), az apoptózis (a programozott sejthalál) és a malignus transzformáció (egészséges sejtek rosszindulatú daganattá való átalakulása) egyik fontos szabályozója is. Ezt a szerepét azért töltheti be, mert a sejtek olyan Ca^{2+} -kötő fehérjékkel rendelkeznek, melyek megváltoztatják a sejtműködést. Ezek a molekulák vagy nem foszforilációs változások útján hatnak (pl. a Ca^{2+} szenzor synaptotagmin a vezikulák exocitózisában; Littleton és Bellen, 1995), vagy aktiválni képesek protein-kinázokat és -foszfatázokat (kalmodulin, mely a Ca^{2+} -kalmodulin függő protein-kinázt, illetve a calcineurint tudja aktiválni; Wang és Waisman, 1979; Siekierka és Sigal, 1992), illetve egyesek maguk kináz (protein-kináz C; Rasmussen és mtsai, 1984) aktivitásúak, és aktivitásuk a Ca^{2+} -kötő helyeik telítettségének függvényében változik. A primer célmolekulák aktivációs állapotának megváltoztatása után beindul egy foszforilációs/defoszforilációs kaszkád, mely végeredményben a sejt bármely jelátviteli útját módosíthatja és eképpen a sejt alapvető életfolyamatait szabályozhatja. Ily módon – a jelátviteli utak e helyen a téma kiterjedtsége miatt lehetetlen részletes tárgyalásának hiányában is – könnyen belátható, hogy a sejt intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjának ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) megváltozása fokozhatja a proliferációt, gátolhatja a differenciálódást és az apoptosist, mely változások együttesen vagy külön-külön a malignus transzformáció irányába sodorják a sejteket.

II.2.2. Excitábilis és nem excitábilis sejtek Ca^{2+} -homeostasisa

Az eddigiekből következik, hogy minden élő sejt fennmaradásának feltétele az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szoros szabályozása és az átmenetileg szükséges változások mellett a hosszú távon állandó Ca^{2+} -szint biztosítása. A Ca^{2+} -homeostasist excitábilis (depolarizációra érzékeny – ide soroljuk az izom- és idegsejteket) és nem excitábilis sejtekben is számos molekula együttműködése tartja fenn (2. ábra).

A cytoplasmában megjelenő Ca^{2+} származhat az extracelluláris térből és az intracelluláris raktárakból. Az **extracelluláris térből** belépő Ca^{2+} feszültség-, ligand- vagy raktárvezérelt csatornákon keresztül juthat be a sejtbe. A *feszültségfüggő* Ca^{2+} -csatornák (T-, L-típus) depolarizációra nyitnak, majd inaktív állapoton keresztül érik el a zárt állapotot. A T-típusú csatorna negatívabb membránpotenciálnál (-60mV) nyit és gyorsan inaktiválódó



2. ábra. A sejtek Ca^{2+} -homeostasisa. Magyarázatot lásd a szövegben. (EC: extracelluláris tér, lig: ligandum, Metab-Rec: metabotrop receptor, Lig-Ch: ligandfüggő ioncsatorna, VG-Ch: feszültségvezérelt ioncsatorna, G-prot: G-protein, TROP: troponin-tropomiozin komplex, SR/ER: sarcoplasmaticus/endoplasmaticus reticulum, M: mitokondrium, SERCA: sarco-endoplasmaticus reticulum kalcium ATPáz, PL: foszfolambán, DHP-R: dihidropiridin receptor, RyR: rianodin receptor, CICR: kalcium indukálta kalciumfelszabadulás, Csq: calsequestrin, Crc: calreticulin, PIP_2 : foszfátidil-inozitol-4,5-difoszfát, DAG: diacil-glicerol, IP_3 : inozitol-1,4,5-triszfoszfát, PLC: foszfolipáz-C, PKC: protein kináz C, Ex-ch: másodlagosan aktív kalcium/nátrium antiporter, CaM: kalmodulin, CRAC-Ch: kalciumfelszabadulás aktiválta kalcium csatorna, SOCE: raktárak vezérelte kalciumbelépés.)

transziens áram keletkezik, míg az L-típusú csatorna pozitívabb feszültségtartományánál (-35mV) kezd aktiválódni és lassan inaktíválódik. Ezek jelenléte excitábilis sejteken jellemző. Speciális szerepet tölt be vázizomban a DHPR, mely L-típusú Ca^{2+} -csatorna funkciója mellett mechanikus kapcsolatban áll az SR membrán RyR-ával, és azon keresztül a raktározott Ca^{2+} felszabadulását hozza létre (Schneider és Chandler, 1973; Rios és Brum, 1987). A *ligandvezérelt* csatornák számos típusa közül vizsgálataink szempontjából említésre méltó a vázizomban megtalálható nikotin típusú acetil-kolin receptor, mely Na^+ mellett Ca^{2+} -ra is permeabilis, illetve a P2X-purinoreceptor, mely izom- és melanoma malignum sejteken is megtalálható és főleg Ca^{2+} -ra permeabilis (bár a koncentrációviszonyok miatt általában rajta is kevesebb Ca^{2+} lép be, mint Na^+). A *raktárak által vezérelt* CRAC csatornák az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürülésével párhuzamosan nyílnak meg a sejtfelszíni membránban, létrehozva egy tartós Ca^{2+} beáramlást, a SOCE-t (store operated calcium entry, raktárak által működtetett

kalciumbelépés). Ennek – az élő sejtek körében igen elterjedt – csatornának a pontos azonosítása még várat magára, miképpen az is, hogyan szabályozza a csatorna működését a raktár telítettségi állapota. Feltételezések azonban vannak, leginkább a TRP receptorcsalád valamely tagja jön szóba, mint CRAC csatorna, továbbá az IP₃R, mint a szabályozást megvalósító, a raktáron/raktárban fellelhető molekula (Parekh és Putney, 2005). A jelenség funkciója feltehetően a tartósan magas [Ca²⁺]_i-t igénylő folyamatok, például génexpressziós változások számára a kívánatos megemelkedett cytoplasmaticus Ca²⁺-szintnek a raktárak kapacitásán túli biztosítása.

Az **intracelluláris raktárakból** (ER, illetve izomban SR) Ca²⁺ felszabadulását vagy a feszültségváltozást érzékelő *DHPR* hozza létre közvetlen mechanikus kapcsolattal (kizárólag vázizomban, lásd fent), vagy a fentebb részletezett módok valamelyikén az extracelluláris térből belépő, vagy maga a raktárakból felszabaduló Ca²⁺ eredményezi ún. kalcium indukálta kalciumfelszabadulás (*CICR*) révén (Endo, 1977; Fabiato, 1984). Előbbi módon a RyR, míg *CICR*-rel a RyR vagy az IP₃R közvetítésével szabadulhat fel a raktározott Ca²⁺. Az IP₃R - harmadik lehetőségként - a PLC út aktiválódása során keletkező IP₃ megkötése után szintén kinyílik, ami ugyancsak az SR/ER-ből történő Ca²⁺-felszabaduláshoz vezet. Utóbbi módon hoznak létre Ca²⁺-tranzienszt például a vizsgálatainkban szereplő P2Y receptorok.

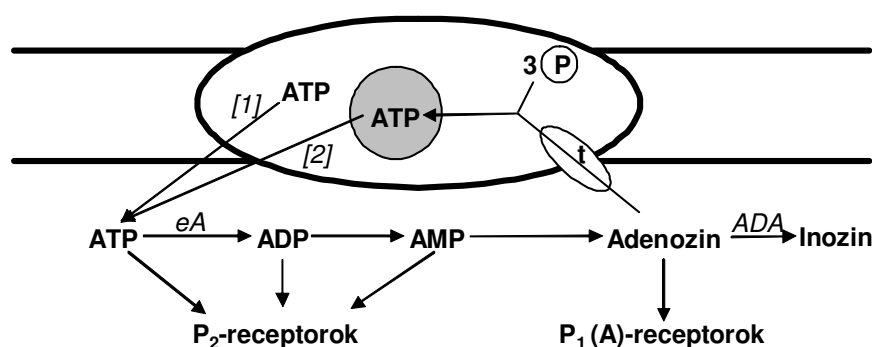
Bármely irányból is áramlik a Ca²⁺ a cytoplasmába, ott specifikus és kevésbé specifikus kötőhelyekhez kapcsolódik (például kalmodulin, troponin C, synaptotagmin, PKC, parvalbumin, pumpák) és különféle sejtélettani eseményeket indít be, majd az átmeneti növekedés után az intracelluláris Ca²⁺-szint helyreáll. Az **extracelluláris térbe** vagy a másodlagosan aktív Na⁺/Ca²⁺ antiport mechanizmus, vagy a Ca²⁺-ATPáz juttatja vissza a Ca²⁺-ot. Az **intracelluláris raktárba** a sarco-endoplasmaticus reticulum Ca²⁺-ATPáz (SERCA) pumpálja vissza, mely pumpát szívizomban a defoszforilált foszfolambán gátolja. Az SR-ben aztán a Ca²⁺ calsequestrinhez, calreticulinhoz és egyéb puffermolekulákhoz kötődve várja az őt újra felszabadító jelet (Rossi és Dirksen, 2006). Megjegyzendő még, hogy a mitokondriumok is funkcionálnak Ca²⁺-raktárként, ezirányú működésük azonban az ER/SR-nél kevésbé jól jellemzett (Kaczmarek, 2000).

II.3. A vizsgált fehérjemolekulák

II.3.1. Purinoreceptorok

II.3.1.1. A purinerg jelátvitel

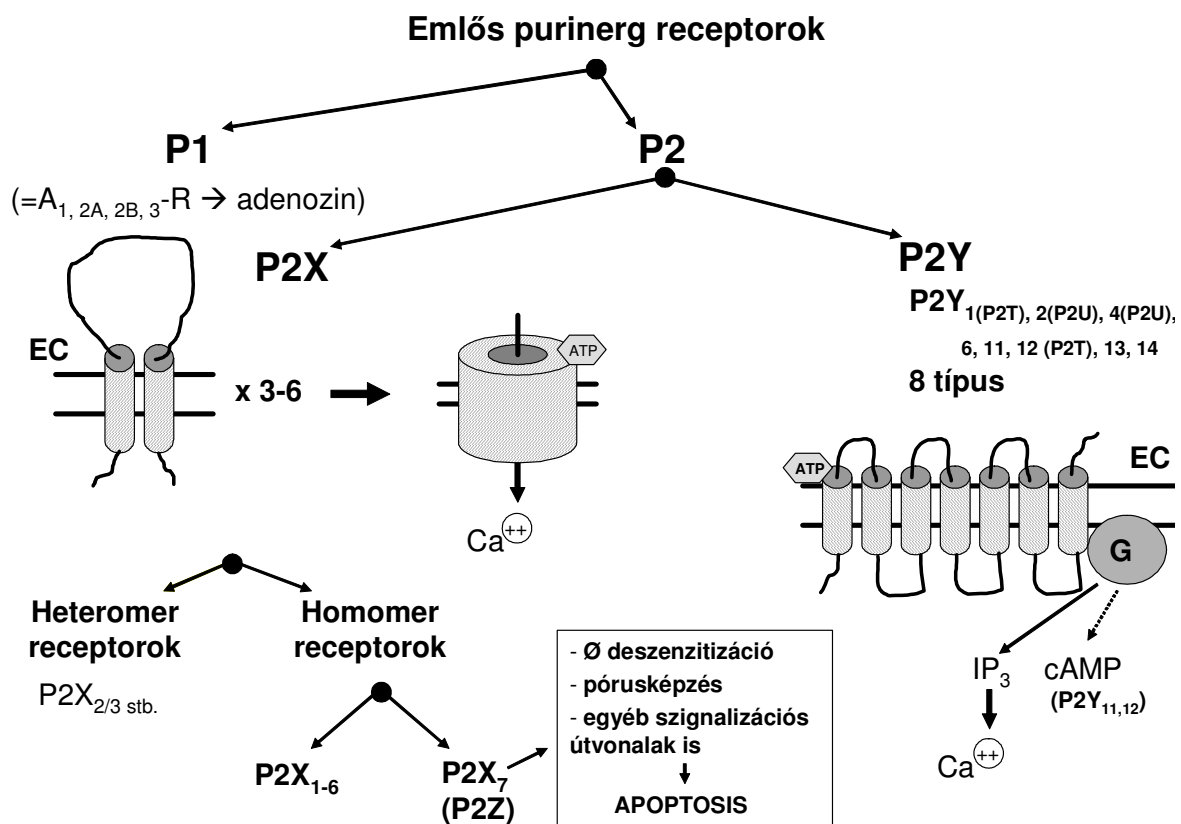
Az adenzinvegyületek az evolúció során három fontos feladat betöltésére „szakosodtak” az élő szervezetben: az ATP makroerg kötése révén energiaraktárként funkcionál, az adenin a nukleinsavak felépítésében is nélkülözhetetlen, és az adenzinvegyületek jelátviteli molekulaként is fontos szerepet játszanak. Az extracelluláris adenzinvegyületek hatásairól először 1929-ben Drury és Szent-Györgyi Albert számolt be (Drury és Szent-Györgyi, 1929), majd három évtizeddel később, 1959-ben Holton vetette fel, hogy az ATP neurotranszmitter lehet, miután nyúlban szenzoros idegek stimulációját követően ATP-felszabadulást mutatott ki (Holton, 1959). Az 1960-as években utaltak először arra, hogy a gastrointestinalis és urogenitalis rendszereket ellátó idegek között olyan non-adrenerg, non-kolinerg (NANC) idegeket is találunk, melyeknek neurotranszmittere az ATP (Martinson és Muren, 1963; Burnstock és mtsai, 1970). A további vizsgálatok során igazolódott, hogy az ATP kotranszmitter szerepe sokrétű. Kimutatták szimpatikus, paraszimpatikus idegvégződésben, a neuromuscularis junctióban és egyéb idegvégződésekben is. Az ATP vagy kotranszmitterként excitózissal, vagy sejtlaesio során jut az extracelluláris térbe (3. ábra). Ott vagy receptorhoz való kötődés előtt, vagy az után ectoATPáz bontja ADP-n, majd AMP-n keresztül adenzinra. Ezek a vegyületek is hathatnak különféle receptorokra. Az adenzin vagy inozinra bomlik le az adenzin-deamináz (ADA) enzim működése révén, vagy egy transzporter segítségével visszavételre kerül az idegvégékészülékbe, ahol újra ATP-be épül be. Érdekes megjegyezni, hogy az extracelluláris mátrixszal is kapcsolatba lépő, sarcolemmaris elhelyezkedésű α -sarcoglycan molekula ectoATPáz aktivitással is rendelkezik (Betto és mtsai, 1999). A molekula mutációja myopathiát, ún. sarcoglycanopathiát eredményez, melyben a csökkent extracelluláris ATP-bontás is szerepet játszhat.



3. ábra. Az ATP felszabadulása és extracelluláris metabolizmusa. Magyarázatot lásd a szövegben. (P: foszfátcsoport, t: adenzin-transzporter, eA: ecto-ATPáz, ADA: adenzin-deamináz, [1]: ATP felszabadulása sejt sérülést követően, [2]: ATP felszabadulása excitózissal.)

II.3.1.2. Purinoreceptorok – osztályozás, struktúra, szignáltranszdukciós mechanizmus

A purin- és pirimidinvegyületek hatásaikat sejtfelszíni receptorokra hatva fejtik ki (4. ábra). A purinoreceptorok két nagy csoportja a P1-purinoreceptorok vagy adenosin-receptorok (altípusok: A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 ; Fredholm és mtsai, 2001), melyek adenilát-ciklázsal kapcsolatosak és kompetitív antagonistáik a methylxanthinok, illetve a P2-purinoreceptorok, melyek különféle purin és pirimidin nukleotidokkal (ATP, ADP, UTP stb.) aktiválhatók. A P2 receptoroknak két csoportját különböztetjük meg: az ionotrop P2X és a metabotrop P2Y receptorokat (Burnstock és Kennedy, 1985).



4. ábra. Az emlős purinerg receptorok osztályozása és vázlatos szerkezete.

A P2X receptorok a $P2X_{1-7}$ alegységek homo- vagy heteromultimerizációjával jönnek létre (North, 2002), a homomer ionotrop P2X receptoroknak így tehát hét típusát ismerjük. Az alegységek 384-595 aminosavból állnak, melyek két transzmembrán domaint, intracelluláris C- és N-terminálist és egy nagy extracelluláris hurkot képeznek. Az ioncsatorna képzésében 3-6 alegység vesz részt. Amikor az extracelluláris oldal megfelelő helyéhez ATP kötődik, kationcsatorna nyílik meg, mely a $[Ca^{2+}]_i$ -t részben közvetlenül a külső térből növeli meg,

részen a belépő Ca^{2+} ionok CICR-t indukálnak. Emellett a P2X receptorok nyitása depolarizálja a sejtet, ami, ha a sejt rendelkezik a megfelelő feszültségfüggő ioncsatornákkal, további Ca^{2+} -belépés és (belső raktárból történő) -felszabadulás forrása. Jelentősen különböző sajátságai és jelátviteli módja (lásd alább) miatt a P2X₇ receptort kezdetben külön alcsoportba sorolták és P2Z névvel illették, ám ez az elnevezés ma már nem használatos.

A P2Y receptorok 7 transzmembrán domainnel rendelkező, 308-377 aminosav hosszúságú, G-proteinhez kapcsolt metabotrop receptorok (Ralevic és Burnstock, 1998). Az emlősökben eddig nyolcféle P2Y receptort klónoztak (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄; Burnstock, 2006a,b; Nishiyama és mtsai, 2004), melyek közül a trombocytákon korán felismert jelentős szerepük miatt a P2Y₁ és a P2Y₁₂ receptort P2T receptor néven (továbbá ADP-vel való aktiválhatóságuk miatt mint P2Y_{ADP} receptorokat; Hechler és mtsai, 2005), míg az UTP-vel való aktiválhatóság miatt a P2Y₂ és P2Y₄ receptorokat együttesen P2U receptorként is szokták említeni. A P2Y receptorok legkorábban megismert négy típusa (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆) G_q-proteinen keresztül a PLC-t aktiválja és így IP₃-felszabadítás révén hozza létre a cytoplasma [Ca^{2+}]-jának növekedését. Az újabban megismert négy altípus esetében emellett az adenil-cikláz aktiválása G_s-protein (P2Y₁₁; Ralevic és Burnstock, 1998) vagy gátlása G_i-protein (P2Y₁₂; Hollopeter és mtsai, 2001; P2Y₁₃, P2Y₁₄; Marteau és mtsai, 2003) közvetítésével is szerepel a jeltovábbítás mechanizmusaként. A P2Y receptorok között egyre elfogadottabb külön csoportként kezelni a „pirimidinoceptorok”-at, melyek affinitása az uracilszármazékok iránt nagyobb, mint az adeninszármazékok iránt. Az ide tartozó négy receptor az UTP-vel hatékonyan aktiválható P2Y₂ és P2Y₄, a nagy UDP-affinitású P2Y₆, valamint az UDP-glükózra érzékeny P2Y₁₄ (Brunschweiler és Muller, 2006).

II.3.1.3. Purinoreceptorok farmakológiája – agonisták és antagonisták, permeabilitás, deszenzitizáció

A purinoreceptorok mindegyike különféle adenin és uracil nukleotidokkal és ezek mesterségesen előállított származékaival is aktiválható, így általában annak megállapítása, hogy egy adott receptor valamely purin- vagy pirimidinvegyület receptora, nem zárja ki a receptor egyéb nukleotidokkal történő aktiválását sem, pusztán azt jelenti, hogy a megnevezett nukleotidnak a legkisebb a receptort aktiváló EC₅₀-je. Ennek figyelembe vételével értékelendő az 1. táblázat, mely a legfontosabb és legjellemzőbb purinoreceptor-agonistákat és -antagonistákat tünti fel. (Minden receptor részletes farmakológiai profilja megtalálható például Ralevic és Burnstock közleményében; Ralevic és Burnstock, 1998.)

P2X altípusok	P2X ₁	P2X ₂	P2X ₃	P2X ₄	P2X ₅	P2X ₆	P2X ₇	
Agonisták	ATP, ATP _γ S, 2MeSATP							
	α,β-meATP β,γ-meATP		α,β-meATP β,γ-meATP				BzATP	
Antagonisták	Suramin (kivéve P2X ₆), PPADS, Reactive blue 2							
	TNP-ATP NF023		TNP-ATP				Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , BBG, 17β- ösztadiol	
P2Y altípusok	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃	P2Y ₁₄
Agonisták	ATP (kivéve P2Y ₁₂)							
	ADP	UTP	UTP	UDP	2-MeS- ATP	ADP 2-MeS- ADP	ADP 2MeSADP	UDP- glükóz
Antagonisták	Suramin (kivéve P2Y ₄), PPADS, Reactive blue 2							
	MRS 2179					ATP ticlopidin clopidogrel	Ap ₄ A 2MeSAMP	

1. táblázat. A purinerg receptorok agonistái és antagonistái. (MRS 2179: N⁶-metil-2'-deoxiadenozin-3',5'-biszfoszfát; NF023: 3'-urea-8-(benzamido)naftalén-1,3,5-triszulfonsav; PPADS: piridoxál-foszfát-6-azofenil-2',4'-diszulfonsav; suramin: 8-(3-benzamido-4-metilbenzamido)-naftalén-1,3,5-triszulfonsav; ATP_γS: adenzin-5'-O-(3-tiotrifoszfát); α,β-meATP: α,β-metilén-ATP; β,γ-meATP: β,γ-metilén-ATP; 2MeSAMP: 2-metiltio-AMP; 2-MeS-ADP: 2-metiltio-ADP; 2-MeS-ATP: 2-metiltio-ATP; BzATP: 3'-O-(4-benzoil)benzoil-ATP; BBG: Brilliant blue G; Ap₄A: diadenozin-tetrafoszfát; TNP-ATP: 2' (vagy 3')-O-trinitrofenil-ATP.)

Az ionotrop purinoreceptorok megnyílása egyrészt membránpolarizáció kiváltásával közvetve, másrészt Ca²⁺-permeabilitása miatt közvetlenül is képes megemelni a [Ca²⁺]_i-t. A P2X receptorok Na⁺-ra vonatkoztatott relatív Ca²⁺-permeabilitása (P_{Ca}/P_{Na}) a receptor típusától, a sejtípustól és a fajtól függően 1 és 10 között mozog, , átlagosan 2-4, de extrém esetekben ennél jóval nagyobb is lehet (pl. patkány peritoneális makrofágok P2X₇ receptorainál 71-es értéket mértek) (Egan és mtsai, 2006). Mindazonáltal a receptoraktivációt követő inward áramnak csak mintegy 5-10%-a Ca²⁺-áram (Egan és mtsai, 2006), nyilvánvalóan az ionok elektrokémiai gradienseinek különbözősége miatt. Érdekes megfigyelés, hogy a kationszelektívnek tartott P2X receptorok egyike, a P2X₅ receptor Cl⁻ ionra is permeabilis (Thomas és Hume, 1990). A humán receptor esetében P_{Cl}/P_{Na}=0,52, és ezért az igen nagy permeabilitásért a pórus közelében elhelyezkedő 52-es lizin aminos csoportjának pozitív töltését gondolják felelősnek (Bo és mtsai, 2003). Már itt érdemes megemlíteni, hogy egyes P2X receptorok, kiváltképpen a P2X₇ receptor esetében megfigyelhető, hogy az agonista tartós

vagy ismételt adagolása során a receptor permeabilitási sajátságai megváltoznak, és egy nagyobb pórus nyílik meg, mely már nagyobb méretű kationokra, pl. NMDG⁺-re is átjárhatóvá válik (North, 2002).

A P2 purinoreceptorok (a P2X₇ receptor kivételével) az agonista ismételt vagy tartós adagolására egyre kisebb inward áramot és/vagy [Ca²⁺]_i-növekedést hoznak létre, azaz deszenzitizálódnak. Ez egyrészt a receptor internalizációjával és degradációjával, másrészt foszforilációs állapotának megváltozásával és funkcionális inaktivációjával, harmadrészt pedig (a P2Y receptorok esetében) a PIP₂ készletek kimerülésével és a belső Ca²⁺-raktárak kiürülésével magyarázható. Deszenzitizációjuk alapján a purinoreceptorok négy csoportba oszthatók. Az *első csoport*ba a metabotrop P2Y receptorok tartoznak, melyek igen lassan deszenzitizálódnak, az agonistának ehhez 10 perc nagyságrendű időtartamig kell folyamatosan jelen lenni. A *második csoport* a lassan deszenzitizálódó ionotrop purinoreceptorok csoportja, melyek közé a P2X₂, P2X₄, P2X₅ és a P2X₆ receptor tartozik. Az agonista 60 s-ig tartó adagolása során a rajuk átfolyó áram fokozatosan 0-ra, vagy közel 0-ra csökken le. A *harmadik csoport*ba a gyorsan deszenzitizálódó P2X₁ és P2X₃ receptorok tartoznak, melyek teljes deszenzitizálódása kevesebb, mint 1 s alatt teljessé válik, az áram csökkenésének időállandója mintegy 300 ms. Végül a *negyedik csoportot* a P2X₇ receptor alkotja, mely deszenzitizációt nem mutat, sőt, a receptor azonosításának egyik megbízható jelének tartják, hogy ismételt agonistaadagolásokra a receptoron keresztül folyó áram nagysága akár igen jelentős mértékben (többszörösére) növekedhet, azaz a receptor szenzitizálódik (North, 2002; Ralevic és Burnstock, 1998).

II.3.1.4. Purinoreceptorok – előfordulás és biológiai hatások

A purinoreceptorok az élő sejtek körében igen elterjedtek, alig-alig lehet olyan egészséges vagy kóros, például malignusan transzformált sejtípust találni, melyen még nem mutatták ki a receptorcsalád valamely tagjának jelenlétét. (Ebből a szempontból kivételnek számítanak az ebben a dolgozatban vizsgált melanocyták, melyekkel kapcsolatban az irodalomban ez irányú vizsgálatokat nem találtunk.) A legtöbb esetben egy sejten egynél több purinoreceptor-típus is megtalálható, azonban az egyes altípusok közötti kölcsönhatás jellege és jelentősége, illetve a purinoreceptor-mintázat megváltozásának szerepe a sejt életében egyelőre nem pontosan ismert. A purinerg jelátvitel tanulmányozásának aktualitását és gyakorlati fontosságát jól illusztrálja két példa. Egyrészt a P2X₇ receptor mára elfogadottnak tekinthető szerepe az apoptózisban és tumorigenesisben teret nyitott a molekula tumormarkerként való használatát

célzó kutatásoknak, és például prosztatarák esetében a kezdeti klinikai vizsgálatok igen meggyőző eredményt hoztak (Slater és mtsai, 2004). Másrészt 2005-ben a világ második legnagyobb mennyiségben eladott gyógyszere a Plavix® (clopidogrel) volt, éves forgalma 5,9 milliárd USD-ra rúgott (IMS Health, 2006). A clopidogrel és a szintén a napi belgyógyászati rutinban alkalmazott ticlopidin (Ticlid®) egy mindössze 5 évvel ezelőtt azonosított purinoreceptor, a vérlemezkék felszínén megtalálható P2Y₁₂ receptor antagonistájaként gátolja a thrombocytaaggregációt (Hollopeter és mtsai, 2001), így kiválóan alkalmas atherosclerosisos betegek stroke és akut myocardialis infarctus prevenciójára.

A P2 receptorok által közvetített celluláris hatások rövid és hosszú távúak lehetnek. A gyors hatások közé az ATP legkorábban felismert kotranszmitter és neuromodulátor funkciói mellett a neuroendocrin és exocrin szekréció széles körű szabályozásában, a már fentebb említett thrombocytaaggregációban, a nociceptív ingerek mechanoelektromos transzdukciójában betöltött szerep, valamint az endothel sejtek által mediáltan vascularis vasodilatációt kiváltó képesség sorolható. A lassú (trofikus) purinerg hatások, ha lehet, még szerteágazóbbak. A receptorok sejtproliferációban, differenciációban és apoptózisban betöltött szerepe révén az extracelluláris purin- és pirimidinnukleotidok a bőr és a parenchymás szervek sejteinek normál „turn-over”-ében, a malignus daganatok kialakulásában, a gyulladások létrejöttében és fennmaradásában, a sebgyógyulásban és a csontreszorpcióban töltenek be fontos funkciót, továbbá részesei az atherosclerosisnak, restenosisnak és így az ischaemiának, az agyi remodelling elősegítése révén neuroprotektív hatásúak, az immunsejtek működését befolyásolva pedig immunmodulátorok. Mindezen hatások bővebb ismertetése a megfelelő irodalmi hivatkozásokkal megtalálható G. Burnstock „Purinergic signalling” c. áttekintő jellegű cikkében (Burnstock, 2006a).

II.3.1.5. Purinoreceptorok a vázizomban, melanocytákban és melanoma malignum sejtekben

Az irodalomban számos vázizomsejteken lévő purinoreceptor jelenlétét és funkcióját találhatjuk meg, sőt, felvetették csak vázizomra specifikus altípusok létezését is. Humán vázizmon P2X_M (Urano és mtsai, 1997), csirkeembrió vázizmán pedig P2X₈ (Bo és mtsai, 2000) receptorokat írtak le, noha az utóbbiról hamarosan kiderült, hogy nagyrészt homológ a P2X₅ izoformával (Ruppelt és mtsai, 2001). Utóbbi receptorral kapcsolatban felmerült, hogy fontos szerepet játszhat patkány szatellitasejtek differenciációjában azáltal, hogy a p38 MAPK-t foszforilálva gátolja a proliferációt és elősegíti a differenciálódást (Ryten és mtsai, 2002). A

P2X₂, P2X₅ és P2X₆ receptorok szorosan szabályozott, szekvenciális megjelenését figyelték meg patkányembrióban (Ryten és mtsai, 2001). Az egyedfejlődés során tehát megkérdőjelezhetetlennek látszik az ionotrop purinoreceptorok szerepe, azonban úgy tűnik, a differenciált emlős vázizomrostokról ezek a molekulák hiányoznak, denerváció azonban újra be tudja indítani az expressziójukat (Wells és mtsai, 1995). Ehhez hasonló a helyzet a metabotrop P2Y receptorok esetében is, melyeket kimutattak C2C12 egér myotubulusokban (Henning és mtsai, 1993) és embryonalis vázizomban (Cheung és mtsai, 2003) is. Azt találták, hogy a P2Y₁, P2Y₂ és P2Y₄ receptorok csak átmenetileg expresszálódtak a prenatális időszakban, majd posztnatálisan down-regulálódtak. A P2 receptorok vázizomban betöltött szerepét aláhúzza az a friss közlemény is, mely dystrophiás egér izomban a purinoreceptor-funkció módosulását és a megváltozott Ca²⁺-belépést a muscularis dystrophia fontos pathogenetikai tényezőjeként tárgyalja (Yeung és mtsai, 2006).

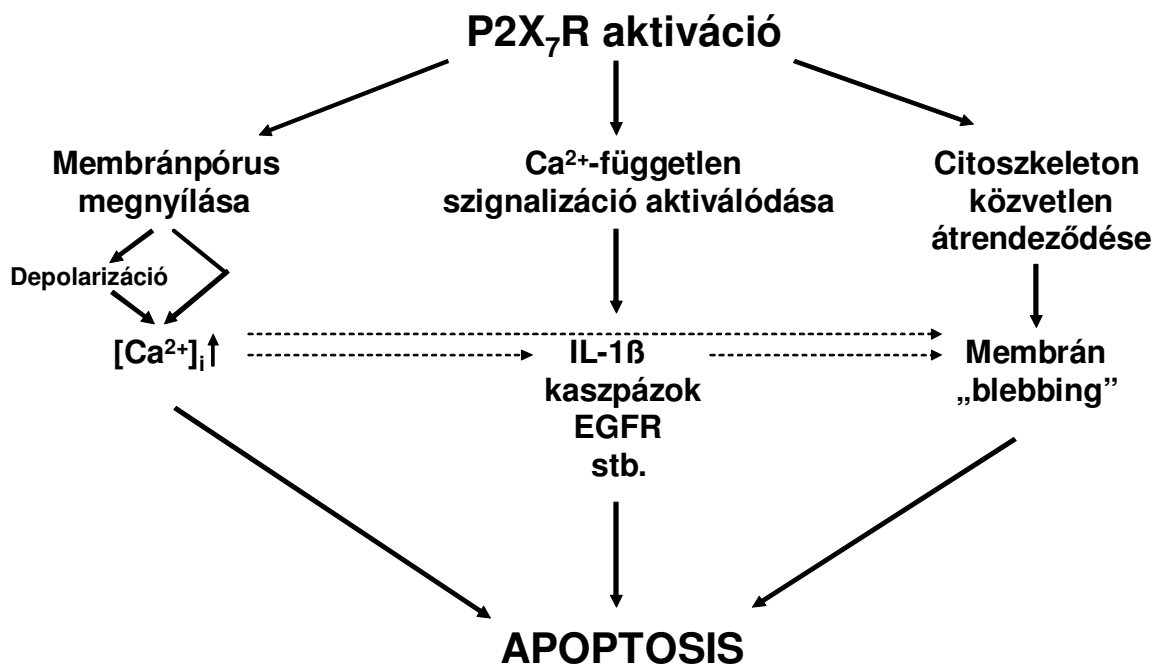
A melanocyták azon kevés sejttípus közé tartoznak, melyeken az extracelluláris ATP hatását és a purinerg receptorok expresszióját ezideig nem vizsgálták. Ezzel szemben az igen rosszindulatú malignus melanomával kapcsolatban már 1998-ban felmerült az adenzinvegyületek szerepe mint a sejt motilitását reguláló tényező (Woodhouse és mtsai, 1998), de az A₃ adenzinreceptor vizsgálatán és esetleges terápiás célpontként való használhatóságának felvetésén (Fishman és mtsai, 2001) túlmenő, a P2 receptorokat is érintő vizsgálatok sokáig nem történtek. A melanoma P2 receptorait először Slater és kollégái tanulmányozták (Slater és mtsai, 2003), akik a P2X₇ receptor fokozott expresszióját figyelték meg melanomában. A legfrissebb eredmények pedig ezen receptor további jellemzése mellett (White és mtsai, 2005a) a metabotrop P2Y₁, P2Y₂ és P2Y₆ receptorok jelenlétét igazolták az A375 melanoma sejtvonalon (White és mtsai, 2005b).

II.3.1.6. Purinoreceptorok – a P2X₇R speciális tulajdonságai és szerepe

A P2X₇ receptor a nagy figyelmet azáltal érdemelte ki, hogy közel egy évtizede – akkor még mint P2Z receptort – apoptotikus hatású receptorként azonosították (Chiozzi és mtsai, 1996). Bár a sejtek kalciumháztartásában betöltött egyéb funkciói is ismertek (Zhang és mtsai, 2005), a legtöbb közlemény a programozott sejthalál kiváltásának különböző aspektusaira fókuszál. A P2X₇ receptor aktiválására bekövetkező sejtválaszok három nagy csoportba oszthatók és ezek mindegyike közvetlenül összefüggésbe hozható apoptosis indukciójával (5. ábra). Miként a többi P2X receptor, a P2X₇R is Ca²⁺-ra permeábilis ioncsatorna, mely ismételt aktiválásra nagy pórust nyit ki, amelyen akár 900 Da-os molekulák (pl. NMDG) is

képesek behatolni a sejtbe. Régóta vita tárgya az irodalomban, hogy maga a P2X₇ receptor nyílik meg egyre nagyobb fokban, vagy egy másik pórusképző fehérjét aktivál a membránban (North, 2002). Az utóbbi nézetet osztók véleménye megoszlik abban a tekintetben, hogy a P2X₇ receptor közvetlenül, mechanikai kapcsolat révén nyitja-e ki a pórust, vagy pedig másodlagos jelátvivők, mint a Ca²⁺ (Faria és mtsai, 2004) vagy az IL-1β (Narcisse és mtsai, 2005) mediálják ezt a hatást. Az is felmerült, hogy nifedipinnel gátolható L- és N-típusú feszültségvezérelt Ca²⁺ csatornák nyílnak meg a P2X₇ stimulációja után (Zhang és mtsai, 2005).

A P2X₇ receptor aktivációja után a [Ca²⁺]_i megemelkedése mellett (ezzel összefüggésben vagy ettől függetlenül, különféle útvonalakon) számos apoptózisban részt vevő enzim is aktiválódik, mint például a kaspáz-1 (Kahlenberg és mtsai, 2004), a kaspáz -3 (Bulanova és mtsai, 2005), a kaspáz-9 (Wang és mtsai, 2004), IL-1β és rajta keresztül számos enzim (Narcisse és mtsai, 2005). Emellett leírták már rendkívül nagy számú kináz és foszfataz aktiválódását és kölcsönhatását a P2X₇ receptorral (pl. Verhoef és mtsai, 2003; Kim és mtsai, 2001), vagy akár olyan komplex interakciókat, melyek az EGFR-t, a β₂ adrenerg receptort és a P2X₇ receptort foglalták közös rendszerbe (Wang és mtsai, 2005). Ezen sejtválaszok összessége egy nehezen átlátható jelátviteli kaszkád beindulását tárja elénk a P2X₇R aktiváció után, melynek végeredménye zavartalan esetben apoptózis, megváltozása esetén azonban a következmény előre aligha megjósolható.



5. ábra. A P2X₇R aktivációját követő intracelluláris események vázlatos összefoglalása.

A P2X₇ receptor aktivációját követő harmadik sejtválasztípus az úgynevezett membrán „blebbing”, melyen a sejt morfológiai változásait és hólyagképződését értik, amit sejthalál követ. A citoszkeleton gyors átrendeződésének hátterében egyrészt az áll, hogy a P2X₇ receptor egy hosszú intracelluláris C-terminális „farokkal” rendelkezik, mely számos citoskeletális és egyéb intracelluláris struktúrával áll közvetlen kapcsolatban (α 3-laminin, β 2-integrin, β -aktin, α -aktinin, hősokkproteinek stb.; Kim et al., 2001), és ezen kapcsolatok átrendeződése a receptor-agonista kölcsönhatás után jellegzetes morfológiai változásokat eredményez. Másfelől az előző bekezdésben említett jelátviteli utak és a $[Ca^{2+}]_i$ megemelkedése – közvetlenül a citoszkeletonra hatva vagy közvetve jelátviteli utakon keresztül – is olyan citoskeletális változásokhoz vezethetnek, melyek „blebbing”-et eredményezhetnek (Verhoef et al., 2003).

A P2X₇R farmakológiai azonosítása specifikus agonistája, antagonistái és sajátos szenzitizációs képessége alapján (lásd II.3.1.3. *alfejezet*) lehetséges.

II.3.2. Rianodin receptor (RyR)

A RyR mintegy 5000 aminosavból álló, 500-600 kDa-os alegységek homotetramer-jeként létrejövő ioncsatorna. A receptornak három típusa ismert, a vázizomra jellemző RyR1, a szívizomban kimutatott RyR2 és az először az agyból izolált RyR3. Az említett emlős típusokat nem emlősökben rendre α , cardialis és β típusoknak nevezik (Sutko és mtsai, 1997). Emellett az egyes altípusokat más, nem excitábilis szövetekből is izolálták (például a RyR2-t HeLa tumorsejtekből; Bennett és mtsai, 1995), illetve egy sejtípuson belül is kimutatható többféle RyR jelenléte (például vascularis simaizomsejtek mindhárom altípust expresszálják; Neylon és mtsai, 1995). A RyR az SR membránjában helyezkedik el, a molekula legnagyobb tömegű része a cytoplasma felé tekint, és vázizomban fizikai kontaktusba kerül a sarcolemma DHPR-ával (2. ábra). A receptor számtalan szabályozó proteinnel áll kapcsolatban, melyek az SR lumene (pl. calsequestrin), az SR membránja (pl. triadin, junctin), a cytoplasma (pl. FKBP12.6, sorcin, kalmodulin), vagy a sarcolemma (pl. DHPR α 1 alegysége) irányából kerülnek kapcsolatba a RyR-rel, mely az eddig ismert egyik legnagyobb receptormolekula, bonyolult receptorkomplexet építve így fel (Mackrill, 1999). A RyR-t vázizomban a DHPR depolarizáció kiváltotta konformációváltozásának közvetlen áttevődése aktiválhatja, továbbá megfelelő cytoplasmaticus kötőhelyeihez kapcsolódva például a Ca^{2+} ion (CICR), koffein, digoxin vagy nM-os koncentrációban a névadó rianodin. Ugyanakkor a rianodin μ M-os koncentrációban a receptort gátolja, és ugyanígy gátló hatású a jelentősen megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$.

is. A receptor aktivációja a csatorna megnyílását eredményezi és az SR/ER-ben raktározott Ca^{2+} cytoplasmába történő felszabadulásához vezet.

A RyR klasszikus SR-membrán lokalizációja mellett az elmúlt években egyre több sejt-típusban mutattak ki RyR-okat – egyelőre mindenképpen atípusosnak tekintett – cytoplasmamembrán lokalizációban. Az osteoclastok külső membránjában RyR2 receptorokat találtak, melyek szerepet játszhatnak a külső kalciumszint érzékelésében és így a csontreszorpció szabályozásában (Zaidi és mtsai, 2004). Emellett simaizomsejteken (Zou és mtsai, 1999) és szívizomsejteken (Kondo és mtsai, 2000) is kimutattak cytoplasmamembrán Ca^{2+} -csatornákat, melyek RyR-hez hasonló sajátságokkal rendelkeztek. Ennek megfelelően az új alcsoportnak a sarcolemmaris RyR (RyR_{SL}) elnevezést javasolták.

II.3.3. Protein-kináz C (PKC)

A protein-kináz C izoenzimek szerin/treonin-kinázok, melyek szerkezetük és különböző kofaktorokat megkötő képességük alapján három csoportba sorolhatók be (Liu és Heckman, 1998). A Ca^{2+} -dependens vagy konvencionális PKC (*cPKC*) izoenzimek (α , β I, β II és γ) Ca^{2+} -mal, a PLC útvonal beindulását követően létrejövő DAG-gal (vagy az azt helyettesíteni képes PMA-val) és PS-sel aktiválható; a novel PLC (*nPKC*) izoenzimek (δ , ϵ , η , μ és θ) nem rendelkeznek Ca^{2+} -kötő domainnel, viszont DAG-gal, PS-sel és telítetlen zsírsavakkal aktiválhatók; az atípusos PKC (*aPKC*) izoenzimek (ζ , λ és ι) pedig konstitutív aktivitással is rendelkeznek. Az érett PKC protein szerin/treonin-kinázok által három helyen foszforilált, a részleges foszforiláltság az enzim funkcióinak, illetve szubcelluláris lokalizációjának megváltozásával jár. A PKC δ emellett tirozin-kinázok által is foszforilálható, de ennek pontos jelentősége még nem ismert. A PKC izoenzimeket a szfingozin inaktiválja.

A PKC izoenzimek minden sejt-típusban megtalálhatók, azonban az egyes sejt-típusok között jelentős különbségek vannak az expresszált PKC izoformák mintázatában, továbbá a sejtben jelen levő PKC enzimek szubcelluláris lokalizációjában is (Liu és Heckman, 1998). A PKC enzimek a sejtmembrán alatti régiótól citoskeletális, vezikuláris, mitokondriális, Golgi-apparátusbeli vagy éppen nukleáris membrán lokalizációkon keresztül nucleolaris kihorgonyozottságig gyakorlatilag minden sejtalkotóhoz kapcsoltnak elhelyezkedhetnek. A szubcelluláris lokalizáció megváltozása összefüggést mutat a malignus transzformációval, így például a PKC α -ban belövetkező mutáció, mely az izoenzim perinukleáris felhalmozódásához és a plazmamembránhoz történő transzportjának elmaradásához vezet, ivazív carcinomák kialakulását eredményezi (Alvaro és mtsai, 1997).

A különböző PKC izoformákról régóta ismert, hogy a proliferáció és differenciáció szabályozásában általában (Weinstein, 1987; Murray és mtsai, 1993; Mischak és mtsai, 1993; Papp és mtsai, 2004) és konkrétan a vázizom-proliferáció és -differenciáció során is (Boczan és mtsai, 2000; Boczan és mtsai, 2001; Bíró és mtsai, 2004; Farzaneh és mtsai, 1989; Capiati és mtsai, 1999) kulcsszerepet töltenek be. Az is ismert azonban, hogy a különböző PKC izoformák ugyanazon folyamatra akár ellentétes hatást is kifejthetnek (Mischak és mtsai, 1993; Papp és mtsai, 2004), amivel jó összhangban vannak az intézetünkben származó közlemények, melyek arról számolnak be, hogy a cPKC α overexpressziója C2C12 sejtekben elősegíti, míg az nPKC δ overexpressziója gátolja a differenciációt (Bíró és mtsai, 2004; Czifra és mtsai, 2006).

III. Célkitűzések

Ph.D. munkám keretében vizsgálni kívántam az extracelluláris ATP-nek a sejtfelszíni P2 purinoreceptorokon keresztül a sejtek hosszú távú sorsát meghatározó folyamatokban, a proliferációban, differenciálódásban és apoptózisban betöltött szerepét. A felvetett kérdést két irányból közelítettük meg: egészséges sejtek fiziológiásnak tekinthető proliferációját és differenciálódását, illetve a proliferáció, differenciáció és apoptózis pathológiás útra térését jelentő malignus transzformáció tanulmányozását terveztük. E két megközelítésmódon belül is két-két modellrendszert használva szeretnénk volna körüljárni a témát: az egészséges viszonyok megismeréséhez immortalizált myoblast sejtvonal, illetve egérből izolált primer tenyésztett vázizomsejtek tanulmányozását terveztük, a purinerg jelátvitel jellemzését daganatokban pedig melanoma sejtek és melanocyták *in vitro* összehasonlításával, valamint melanoma sejtek *in vivo* állatkísérletekben történő megfigyelésével szeretnénk volna megvalósítani. Kísérleteink során különös figyelmet kívántunk fordítani a depolarizáció kiváltotta folyamatok és az ezekben általában részt vevő molekulák (például a rianodin receptor), valamint a purinerg szignalizáció (különös tekintettel a P2X₇ receptor) esetleges kölcsönhatásainak megismerésére és ezen kölcsönhatás proliferációban, differenciációban és apoptózisban betöltött szerepének ez ideig kevésbé ismert szerepének feltárására.

Kísérletsorozatunkkal a következő kérdéscsoportokra kerestük a választ:

1. Milyen változások következnek be az extracelluláris ATP-re, illetve a depolarizációra adott sejtválaszban **immortalizált myoblastok** myotubulusokká/izomrostokká történő differenciálódása során? Kölcsönhat-e a két jelátviteli út, s ha igen, hogyan? Különböznek-e a differenciálódás során tapasztalt változások a két jelátviteli útban, ha a differenciálódást különböző stimulusokkal indítjuk be? Ha igen, változik-e mind a depolarizáció, mind az extracelluláris ATP által kiváltott sejtválasz érési folyamata? Milyen purinoreceptorok állnak a purinerg válaszban tapasztalt változások hátterében? Betölt-e valamilyen funkciót ezekben a sejtekben a P2X₇ receptor?

2. Milyen változások következnek be egérből izolált **primer szatellitasejtek** myotubulusokká/izomrostokká történő differenciálódása során a purinerg szignalizációban? Milyen jellemzői vannak ezen sejtek extracelluláris ATP-re adott válaszainak és befolyásolja-e ezeket a válaszokat a tartós depolarizáció? Jelentős szerephez jut-e a primer vázizomsejtek purinerg válaszában a P2X₇ receptor?

3. Mutatnak-e válaszkésztséget extracellulárisan adagolt ATP-re a **melanocyták, illetve melanoma sejtek**, van-e különbség a válaszkésztségükben? Milyen purinoreceptorok állnak

az esetleges különbségek háttérében, szerephez jut-e a P2X₇ receptor? Milyen funkciót tölt be a közelmúltban melanoma sejtekben kimutatott rianodin receptor a sejtek Ca²⁺-homeostasisában, befolyásolja-e a purinerg jelátvitelt?

4. Miként hat a melanoma malignumban esetlegesen megtalálható purinoreceptorok farmakológiai befolyásolása a sejtek *in vitro* proliferációjára, differenciációjára és apoptosistrátájára? Módosítható-e a melanoma malignum betegség lefolyása **kísérleti állatokban** a purinoreceptorok agonistáinak/antagonistáinak *in vivo* alkalmazásával?

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. Sejtek és sejtenyésztés

IV.1.1. C2C12 egér vázizom sejtvonal tenyésztése

A felnőtt C3H egerek lábából származó C2C12 sejtvonalat (Cell Line Data Base, 2006) myoblast stádiumban $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 15% FCS²-t és 10% DMSO-t tartalmazó DMEM tenyésztő médiumban tároltuk. Felolvasztás után a sejteket 75 cm^2 -es szövettenyésztő edényekbe osztottuk szét 1×10^5 sejt/ml sűrűségben és 15%-os FCS-t, valamint antibiotikumokat és antimikotikumot (50 NE/ml penicillint, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomicint és 1,25 $\mu\text{g/ml}$ Fungizone-t) tartalmazó DMEM tápoldatban 5% CO_2 -tartalom mellett, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra termosztált környezetben tenyésztettük őket. A tenyészetek passzálása 60-70%-os konfluencia elérésénél, 2-3 naponta történt. A különböző vizsgálatok igényeinek megfelelően a sejtek differenciálódását tárgylemezre, Petri-csészére vagy 96 lyukú tenyésztő edénybe kirakott tenyészetekben indukáltuk oly módon, hogy a fentivel megegyező körülmények között 5% FCS-t és 5% HS-t (valamint a fenti antibiotikumokat és antifungális szert) tartalmazó DMEM tápoldatra cseréltük a tenyésztő médiumukat. A vizsgálatokat 2, 5, 7 és 9 napos tenyészeteken végeztük, tapasztalataink szerint ugyanis az adott tenyésztési körülmények között – 2-3 naponkénti tápoldatcsere mellett – ilyen korú tenyészetekben jól elkülöníthetőek és vizsgálhatóak az egymagvú myoblastok (2. nap), a 2-5 magvú fiatal primer myotubulusok (5. nap), a 6-10 magvú szekunder myotubulusok (7. nap), illetve a több, mint 10 magvú érett myotubulusok centrális elhelyezkedésű, valamint a fejlett izomrostok perifériára szorított magokkal (9. nap) (8./a ábra).

A C2C12 sejtek PKC α -t és PKC δ -t stabilan overexpresszáló klónjait korábban kollaborációs partnereink, Bíró Tamás és munkatársai állították elő (Papp és mtsai, 2004). A PKC-t overexpresszáló izomsejteket az előző bekezdésben leírtaknak megfelelően 15% FCS-t tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük azzal a különbséggel, hogy tápoldatukba 500 $\mu\text{g/ml}$ G418-at (Geneticin) is tettünk a transzfektált sejtek szelekciója érdekében. A kísérleteket legalább három különböző klónon elvégeztük mindkét izoenzim esetében, továbbá az overexpresszió tényét Western blot vizsgálatok segítségével is igazoltuk (ezek eredményét itt nem mutatjuk be).

² A dolgozatban használt vegyszerek és eszközök forgalmazóinak neve és székhelye – a szöveg jobb áttekinthetősége érdekében – az *Anyagok és módszerek* rész külön fejezetében, IV.9. A használt vegyszerek és eszközök kereskedelmi forgalmazói cím alatt van felsorolva.

IV.1.2. Primer egér szatellitasejt-tenyészet készítése

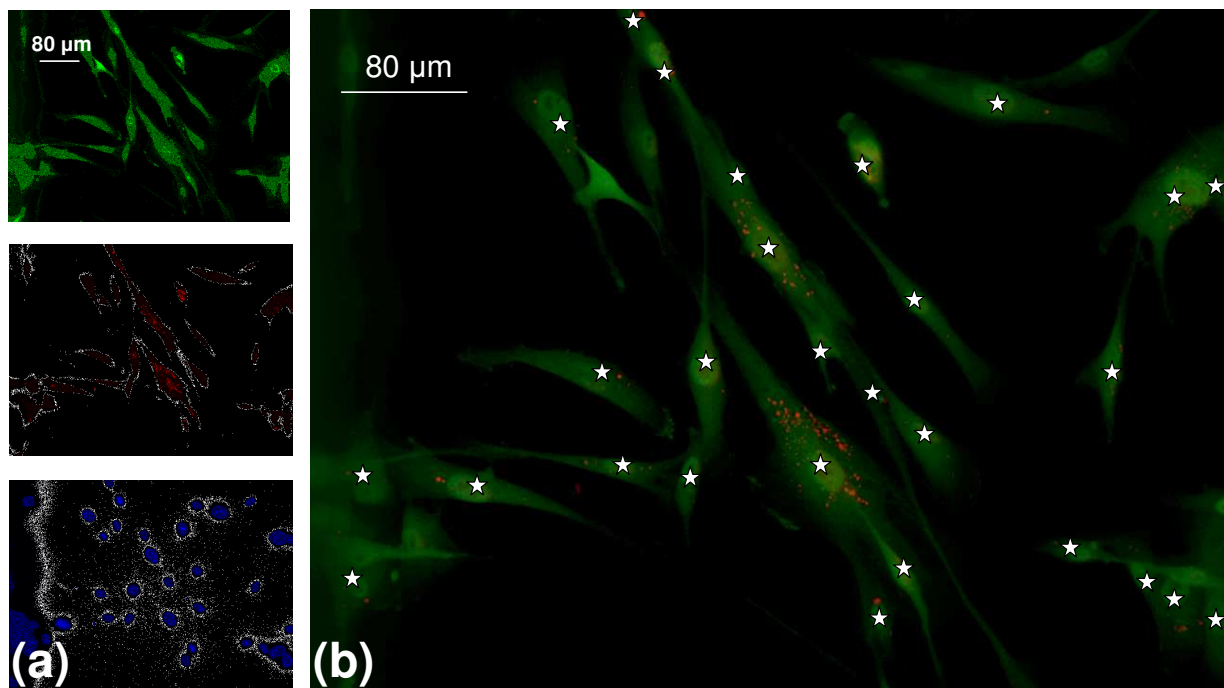
Egér vázizom tenyészetekhez a rostokat 2-8 napos újszülött egerek mellső és hátsó végtagjának proximális részéből preparáltuk. A kimetszett izomszövetet fiziológiás sóoldatba helyeztük (Hanks-oldat: 136,75 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,34 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,81 mM MgSO₄, 1,26 mM CaCl₂, 5,56 mM glükóz, 4,17 mM NaHCO₃, 10 mg/l fenolvörös, 50 µg/ml gentamicin, pH: 7,7, ozmolaritás: 300 mosm/l), ollóval 1-2 mm-es darabokra vágtuk, majd oldatcserével vértelenítettük. Darabolást követően az izom emésztését Ca²⁺- és Mg²⁺-mentes, 1 mg/ml tripszint és 0,75 mg/ml kollagenáz II-t 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 NE/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1 mg/ml BSA, pH: 7,4, ozmolaritás: 300 mosm) végeztük, 37 °C-os rázófürdőben (1 Hz), 15 percig. Ezt követően a felülúszót HS-t tartalmazó neutralizáló oldattal elegyítettük, mely tripszininhibitor hatásánál fogva leállította az enzimreakciót. Kétrétegű (50, illetve 20 µm pórusátmérőjű) nylonmembránon történő szűrés után 10 percig 1000/perc fordulatszámmal centrifugáltuk az oldatot, majd az üledéket 10% FCS-t, 50 NE/ml penicillint, 50 µg/ml streptomocint és 1,25 µg/ml Fungizone-t tartalmazó Ham F-12 tápoldatban szuszpendáltuk. 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; Menzel-Gläser) szélesztettük. A tenyésztés első két napján a sejteket ebben a tápoldatban tartottuk, mely alacsony Ca²⁺- és magas szérumtartalmánál fogva kedvez a sejtek osztódásának (Yasin és mtsai, 1977). A tenyésztés 3. napján áttértünk differenciálódást elősegítő tenyésztő médiumra, azaz 2%-os FCS-t, 2% HS-t, valamint antibiotikumokat és antimikotikumot (50 NE/ml penicillint, 50 µg/ml streptomocint és 1,25 µg/ml Fungizone-t) tartalmazó DMEM tápoldatra. Ezen sejtek tenyésztése is 5% CO₂-tartalom mellett, 37 °C-ra termosztált környezetben történt.

Az izomsejtek és a primer tenyészetekben kis mennyiségben mindig megtalálható fibroblastok elkülönítését a kísérletek során az igen nagy és számos magot tartalmazó izomcsövek és -rostok, valamint a kis, orsó alakú és csak egy magot tartalmazó fibroblastok közötti szembeszökő morfológiai különbség tette lehetővé. Mindemellett a tévedés biztos kizárására az immuncitokémiai vizsgálatok során az éppen vizsgált fehérje elleni antitesten kívül az izomspecifikus dezmin elleni antitesttel kettős immunfestést alkalmaztunk és csak a dezminre is pozitív sejteket vizsgáltuk (lásd még alább a IV.3.1. alfejezetet, illetve a 21. ábra P2Y₁R-ra vonatkozó képének jobb alsó sarkába beillesztett fotót).

IV.1.3. Primer humán melanociták tenyésztése és azonosítása

Az egészséges humán melanocytákat Kormos Bernadett Ph.D. hallgató izolálta a Szege-di Tudományegyetem Bőrgyógyászati Klinika Limfocita Laboratóriumában plasztikai sebészeti beavatkozásokon átesett betegekből, írásos beleegyezést követően, diszpázos-tripszines emésztéssel (Haak-Frendscho és mtsai, 2000). A sejtek a 3. passzázsuk után jutottak el hozzánk. A tenyésztésükhöz használt médium 100 ml AIM-V Lymphocyte Mediumot, 100 ml Keratinocyte-SFM-t, 400 µl BPE-t, 1 µl hrEGF-t, 58,44 mg L-glutamátot, 5 ml FCS-t, antibiotikumot (50 NE/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin) valamint antifungális szert (1,25 µg/ml Fungizone) tartalmazott. A 37 °C-ra beállított, 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban tenyésztett sejteken a tápoldatot kétnaponta cseréltük és 80-100%-os konfluenciánál, 3-6 naponta passzáztuk őket. Kísérleteket legfeljebb hatszor passzált sejteken végeztünk.

Kísérleteink kezdetén megvizsgáltuk, milyen arányban fordulnak elő ezekben a primer tenyészetekben „szennyeződésként” fibroblastok. A melanosoma-specifikus HMB-45 ellenes, illetve a neuroectodermális eredetű sejteket jelölő S100 ellenes antitestekkel történt kettős festések (lásd még a IV.3.1. alfejezetet) megmutatták, hogy a tenyészetek sejtjeinek mintegy 80%-a kettősen festődik, a legalább az egyik antitesttel pozitív sejtek aránya pedig több, mint 95% volt (6. ábra). Ezen vizsgálatokból azt a konklúziót is le tudtuk vonni, hogy mikroszkopos morfológiájuk alapján jól elkülöníthetőek a HMB-45 és/vagy S100 pozitív nagy, több



6. ábra. Melanocyták azonosítása immuncitokémiai festéssel. (a) Tenyésztett melanocyták immunfluoreszcenciája S100 (fent, zöld) és HMB-45 (középen, piros) ellenes primer antitestek alkalmazása után. Magfestés: DAPI (lent, kék). (b) Az a panel felvételeinek egymásra vetítésével kapott kép. Csillagok jelzik a HMB-45-re és S100-ra is pozitív sejteket.

nyúlvánnyal rendelkező, lapos melanocyták a kisebb, orsó alakú fibroblastoktól, azon kísérleteink során tehát, ahol az egyes sejtek pontos azonosítása jelentőséggel bír (pl. $[Ca^{2+}]_i$ -mérés egyedi sejten), ennek figyelembe vételével dolgoztunk (a melanocyták morfológiájának további részleteit lásd még a *II.1.2. alfejezetben*).

IV.1.4. Humán melanoma sejtvonalak tenyésztése

Munkánk során három humán eredetű melanoma malignum sejtvonallal dolgoztunk, melyeket kollaborációs partnerünktől, Tímár Józseftől kaptunk az Országos Onkológiai Intézet (OOI) Tumorprogressziós Osztályáról (Budapest): az A2058 sejtvonalból származtatott *HT168-M1* sejtvonal és az OOI-n létrehozott *HT199* sejtvonal SCID egerekben tumorképző tulajdonságú és metastaticusnak bizonyult különféle metastasis modellekben. Bár a *WM35* sejtvonalra az utóbbi állítás nem igaz, ezek a sejtek szintén tumorigének SCID egerekben.

A sejtenyészeteket 10% FCS-t és 2 mM L-glutamátot, valamint 50 NE/ml penicillint, 50 µg/ml streptomocint és 1,25 µg/ml Fungizone-t tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban, 37 °C-ra beállított, 5% CO₂-t tartalmazó termosztátban tartottuk fenn. A tenyészeteket 80-100%-os konfluenciánál passzáltuk és minden kísérletet 3-4 napos tenyészeteken végeztünk.

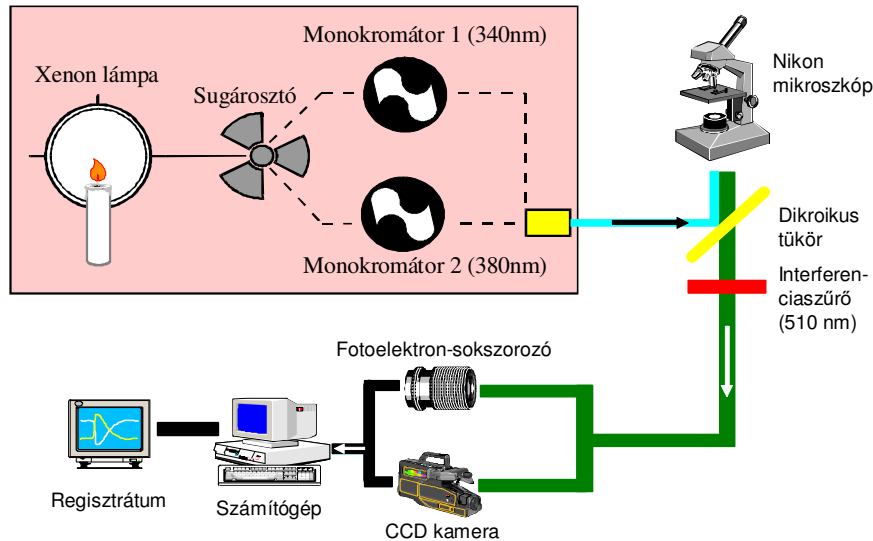
IV.2. $[Ca^{2+}]_i$ változásainak követéséhez kapcsolódó módszerek

IV.2.1. Egyedi sejten történő fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ mérés

A mérés alapelve, hogy a Ca^{2+} -ot kötött és nem kötött Fura-2 fluoreszcens festék abszorpciós spektruma eltér. Ha tehát két megfelelő hullámhosszon váltakozva gerjesztjük a festéket tartalmazó mintát, a kétféle gerjesztést követően emittált fénysugarak intenzitásainak hányadosából a minta (a sejt) Ca^{2+} koncentrációja nM pontossággal kiszámolható, az arány időbeli változásának követéséből pedig az idő függvényében bekövetkező $[Ca^{2+}]_i$ -változás meghatározható (Grynkiewicz és mtsai, 1985).

A sejtek festékkel történő feltöltéséhez 15 µl 2 mM Fura-2-AM-et (a festék acetoximetilészter formája), 10 µl 4%-os Pluronic® F-127-et (enyhe detergens a festék bejutásának megkönnyítésére) és 4 µl 150 nM-os neostigmin oldatot (Stigmosan; a nem izom sejtek esetében esetleg, a vázizomsejtek esetében nagy valószínűséggel jelen lévő extracelluláris acetilkolin-észteráz gátlásával a Fura-2-AM extracelluláris hasítását előzi meg) használtunk, 2 ml tápoldatban. A töltést 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában, izomsejtek esetében 90, melanocyták és melanoma sejtek esetében 60 percen át végeztük.

A PTI DeltaScan mérőrendszer működése és a $[Ca^{2+}]_i$ meghatározása: A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) DeltaScanTM kettős monokromátoros berendezése biztosította (7. ábra). Fényforrásként a rendszer xenonlámpája szolgál, melynek fényét egy forgótükrös sugárosztó két nyalábra osztja. A keletkező sugarak külön-külön monokromátoron haladnak



7. ábra. A PTI DeltaScanTM mérőrendszer felépítése.

át, melynek eredménye a méréseinkhez szükséges 340, illetve 380 nm hullámhosszúságú fénynyaláb. A monokromátorokból optikai szálak vezetik a fényt egy csatoló egységen, valamint egy dikroikus tükrön keresztül a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett sejtekre. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en – interferenciaszűrő közbeiktatásával – egy fotoelektron-sokszorozó segítségével detektáltuk. A jeleket 10 Hz gyakorisággal regisztráltuk. A háttérfluoreszcenciát a tárgylemezek sejtmentes helyein mértük, ezt a program automatikusan levonta a mért fluoreszcenciaértékekből. A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$) az irodalomból ismert egyenlet (Grynkiewicz és mtsai, 1985) alapján számítottuk ki az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációkat:

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

ahol K_D a festék disszociációs állandója, $R_{\max}$ az a fluoreszcenciahányados, ahol a festék Ca^{2+} -mal telített, $R_{\min}$ az a fluoreszcenciahányados, ahol a festék egyáltalán nem köt Ca^{2+} -ot, R a mért fluoreszcenciaértékek hányadosa, β a rendszerre jellemző állandó. A mérőrendszer kalibrálása során nyert adatainkat felhasználva a $K_D=118$ nM, $R_{\min}=0,2045$, $R_{\max}=8,315$ és $\beta=10$ értékeket használtuk a számításokhoz. A tranziens $[Ca^{2+}]_i$ -változások paramétereit

(amplitúdó, látencia, a tranziens kialakulásának maximális sebessége, a leszálló szár meredeksége, a csúcs eléréséhez szükséges idő, félértékszélesség) a munkacsoportunk által kifejlesztett számítógépes program (PTIana) segítségével határoztuk meg.

A mérés technikai kivitelezése: A festékkel feltöltődött sejteket tartalmazó tárgylemezt perfúziós kádban rögzítettük, a kádat normál Hepes-Tyrode-sóoldattal (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 11,8 mM Hepes-NaOH, 1 g/l glükóz, pH=7,4) töltöttük fel, majd egy Nikon invert mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük. A mérés során végig normál Hepes-Tyrode-t áramoltattunk át a kádon balról jobbra perisztaltikus pumpa segítségével (Econo-pumpTM System), jobb oldalon alkalmazva az elszívást („külső perfúzió”, 3 ml/min). Ezért egy adott tárgylemez sejtjeinek szisztematikus vizsgálatánál a mérést a jobb oldali sejteken kezdtük és balra haladtunk, így a korábbi mérésekkor alkalmazott agonistákat és antagonistákat nem mostuk rá a később mérendő sejtekre. Egy 250 µm belső átmérőjű perfúziós kapillárist (Perfusion Pencil[®]) az éppen mért sejt közvetlen közelébe állítottunk, ezen adagoltuk a vizsgált oldatot („lokális perfúzió”, Valve BankTM 8 II System, 4 µl/sec), majd az adott mérés befejeztével lokálisan is normál Hepes-Tyrode-oldatot áramoltattunk a szer kimosására. Amikor az extracelluláris Ca²⁺ hiányának hatását kívántuk tanulmányozni, Ca²⁺ mentes Tyrode-oldattal (CaCl₂ nélkül, 5 mM EGTA-val) mostuk a lokális perfúziós kapillárison keresztül a sejtet 1-2 percig, majd a vizsgált anyagot ugyanebben a Ca²⁺-mentes oldatban jutattuk a sejtre.

IV.2.2. A Ca²⁺-fluxus (FL) kiszámítása

Kalciumfluxusként a myoplasmába a külső térből be- és az intracelluláris raktárakból ki- lépő összes Ca²⁺ ion fluxusát definiáltuk. Az FL-t a

$$FL = d(Ca_{tot} + Ca_{transp}) / dt \quad (2)$$

képlet szerint határoztuk meg, ahol Ca_{tot} a myoplasmán belüli teljes kalciummennyiség, Ca_{transp} pedig a kalciumeltávolító mechanizmusok által transzportált Ca²⁺-mennyiség. Ca_{tot} becsült értékét az előző alfejezetben ismertetett módon meghatározott szabad (Ca_{szabad}), valamint az intracelluláris kötőhelyekhez kötött Ca²⁺ mennyiségének összegeként kaptuk meg, és a modellben a Ca²⁺-nak a festékhez (Ca_{Fura}), a troponin C-hez (Ca_{tropC}), a parvalbuminhoz (Ca_{parv}) és a pumpához (Ca_{pumpa}) való kötődésével számoltunk:

$$Ca_{tot} = Ca_{szabad} + (Ca_{Fura} + Ca_{tropC} + Ca_{parv} + Ca_{pumpa}), \quad (3)$$

számításainkban az irodalomból (Schuhmeier és mtsai, 2003) ismert és konstansnak feltételezett értékeket felhasználva. $Ca_{transzp}$ a pillanatnyilag a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok (pumpák) által szállított kalciummenyiség, melyet arányosnak tekintettünk a pumpák relatív szaturációjával ($[Ca-pumpa]/[pumpa]$), ahol az arányossági tényező nyilvánvalóan a Ca^{2+} -eltávolítás maximális sebessége (PV_{max}):

$$Ca_{transzp} = PV_{max} \cdot ([Ca-pumpa] / [pumpa]) \quad (4)$$

A PV_{max} értékét minden vizsgált sejtre külön meghatároztuk a következő módon. KCl-depolarizációt követő Ca^{2+} -tranzienst lezáró szárára legalább 3 s-mal a csúcstól követően exponenciálisan illesztettünk, s mivel ekkor a feszültségfüggő csatornák bizonyosan zártak vagy inaktívak, a görbe ezen szakasza a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok (-pumpák) működését tükrözi. Az így meghatározott PV_{max} értéket használtuk az adott sejten regisztrált bármely későbbi időpillanatban az FL kiszámítására.

IV.3. Immundetekciós módszerek

IV.3.1. Immuncitokémia és immunhisztokémia

A 2. táblázatban felsorolt fehérjék sejten belüli jelenlétét, elhelyezkedését, illetve némely fehérjéparok kolokalizációját immuncitokémiai módszerrel határoztuk meg. A 24 lyukú tenyésztőedényben, 13 mm átmérőjű fedőlemezen tenyésztett sejtek kalcium- és magnéziummentes (CMF) PBS-sel (136,75 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 , 300 mosm, pH: 7,2) történő lemosása után ötperces acetonos fixálás következett, majd PBS-ben hígított 0,1%-os Triton-X-100-zal permeabilizáltuk a sejtmembránt 10 percen keresztül. Ezt követően PBS-ben történt háromszori mosás után 30 perces blokkolás történt 1%-os BSA-val. A következő lépésben a kimutatandó fehérjének megfelelő, 1%-os BSA oldatban hígított elsődleges antitesttel (2. táblázat) egy órán át szobahőn, majd három PBS-ben történt mosást követően a fluoreszcens festékekkel konjugált másodlagos antitesttel szintén egy órán keresztül sötétben, szobahőn inkubáltuk a sejteket. Végül háromszori PBS-es mosás után a magokat DAPI-val (Vectashield Mounting Medium with DAPI) vagy propidium-jodiddal tettük láthatóvá. Kettős festések esetén a kétféle primer antitestet egyszerre tettük a sejtekre, csakúgy, mint a kétféle szekunder antitestet. Ezen kísérletekben az alkalmazott négyféle antitest mindegyike más-más állatból származott (2. táblázat). Az általunk használt másodlagos antitestek mindegyike 1:1 arányban jelöli a primer antitesteket. A negatív kontrollok készítésekor kihagytuk az elsődleges antitesteket és csak a másodlagos antitesteket adtuk a sejtekhez.

2. táblázat. Az immuncito- és -hisztokémiai vizsgálatokban használt antitestek.

Elsődleges antitestek						
	Kimutatandó fehérje	Antitest	Termelő állatfaj	Koncentráció/katalógusszám	Hígítás	Gyártó cég
1.	HMB-45	m ¹ , anti-HMB-45 IgG1	egér	M0634	1:50	Dako
2.	S100	p ² , anti-S100 IgG	nyúl	N1573	1:500	Dako
3.	2-es típusú rianodin receptor	m, anti-RyR IgG1	egér	MA3-925	1:1000	Affinity BioReagents
4.	SERCA pumpa	p, anti-SERCA2 IgG	kecske	0,2 mg/ml	1:200	Santa Cruz
5.	P2X ₁ receptor	p, anti-P2X ₁ IgG	nyúl	0,6 mg/ml	1:50	Alomone
6.	P2X ₂ receptor	p, anti-P2X ₂ IgG	nyúl	0,3 mg/ml	1:50	Alomone
7.	P2X ₃ receptor	p, anti-P2X ₃ IgG	nyúl	0,75 mg/ml	1:50	Alomone
8.	P2X ₄ receptor	p, anti-P2X ₄ IgG	nyúl	0,3 mg/ml	1:50	Alomone
9.	P2X ₅ receptor	p, anti-P2X ₅ IgG	nyúl	0,8 mg/ml	1:50	Alomone
10.	P2X ₇ receptor	p, anti-P2X ₇ IgG	nyúl	0,3 mg/ml	1:50	Alomone
11.	P2Y ₁ receptor	p, anti-P2Y ₁ IgG	nyúl	0,6 mg/ml	1:50	Alomone
12.	P2Y ₂ receptor	p, anti-P2Y ₂ IgG	nyúl	0,8 mg/ml	1:50	Alomone
13.	P2Y ₄ receptor	p, anti-P2Y ₄ IgG	nyúl	0,6 mg/ml	1:50	Alomone
14.	dezmin	m, anti-dezmin IgG1	egér	M0760	1:100	Dako
Másodlagos antitestek						
	Kimutatott fehérje	Konjugált fluorofór	Termelő állatfaj	Koncentráció/katalógusszám	Hígítás	Gyártó cég
A	nyúl IgG (H+L) ³	TR ⁴	kecske	1,5 mg/ml	1:500	Vector
B	egér IgG (H+L)	TR	ló	1,5 mg/ml	1:500	Vector
C	kecske IgG (H+L)	TR	nyúl	1,5 mg/ml	1:300	Vector
D	nyúl IgG (H+L)	FITC ⁵	kecske	1,5 mg/ml	1:200	Vector
E	egér IgG (H+L)	FITC	ló	1,5 mg/ml	1:200	Vector
Alkalmazott antitest-párosítások						
Egyszeres festések		3B, 3E, 5D, 6D, 7D, 8D, 9D, 10D, 11D, 12D, 13D,				
Kettős festések		1B-2D, 3E-4C, (5D, 6D, 7D, 8D, 9D, 10D, 11D, 12D, 13D)-14B				

¹m: monoklonális, ²p: poliklonális, ³H+L: nehéz és könnyű (heavy és light) lánc, ⁴TR: texas red, ⁵FITC: fluoreszcein-izotiocianát

A megfestett sejtek vizsgálatát vagy a Zeiss LSM 510 META konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal, vagy a Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. A fotókat a SPOT RT digitális kamerával a SPOT Advanced v. 3.5 szoftver felhasználásával készítettük. Az összehasonlításra szánt felvételek minden esetben azonos kamerabeállítások mellett és expozíciós idővel készültek. Utóerősítés csak a vizsgálatok bizonyos aspektusainak kiemelése céljából történt (például a sejtek morfológiájának jobb láthatósága érdekében), minden esetben legfeljebb az egész kép intenzitásának és élességének homogén javításával. Nem alkalmaztuk a túlerősítés és a kontraszt növelése során a képek elcsúszását okozó relatív intenzitások képezték a kísérlet lényegét.

A fagyasztott naevus- és melanomaszövet-metszetek immunhisztokémiai vizsgálatánál a fenti eljáráshoz hasonlóan jártunk el. A metodika az alábbi pontokon különbözött: *fixálás*: metanol, 10 perc; *permeabilizálás*: nem történt; *mosás*: PBS, 3x5 perc; *blokkolás*: 1% BSA és 10-szeres hígítású kecskeszérum, szobahőn, 2 h; *primer antitest*: 60 perc, 37°C; *mosás*: PBS, 6x10 perc; *másodlagos antitest*: biotin-konjugált egér IgG ellenes antitest, 1:100, 40 perc, szobahőn; *mosás*: PBS, 3x5 perc; *jelölés*: streptavidin-FITC, 1:100, 40 perc, szobahőn.

IV.3.2. Western immunoblot

A jéghideg PBS-ben átmosott sejteket homogenizációs pufferben (20 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-amino-etil)-benzil-sulfonil-fluorid, 20 mM leupeptin, pH: 7,4) arattuk fel és jégen, Cole-Parmer® Ultrasonic Homogenizer-4710-zel szonikáltuk (a minták ultrahangos homogenizálása). A minták proteintartalmát módosított BCA próbával határoztuk meg (Smith és mtsai, 1985), BCA™ Protein Assay Kit segítségével. A teljes sejtlyizátumot SDS-PAGE SB pufferben (100 mM Tris, pH. 6,8, 2% SDS, 5% β-merkaptotanol, 15% glicerol, brómfenolkék) kevertük el, majd 10 percig 100 °C-on főztük. A mintákat SDS-PAGE-nek vetettük alá a Laemmli (1970) által leírt eljárás szerint. A 8%-os gélekre sávonként 20-30 µg proteint vittünk fel, majd a futást követően nitrocellulóz membránra transzferáltuk a mintákat. PBS-ben oldott 5%-os tejporoldattal történő blokkolást követően a 2. táblázatban szereplő primer antitestek közül a purinoreceptorok, illetve a dezmin ellenes antitestek 1:200-as, a blokkoló oldatban készült hígításait alkalmaztuk. A HRPO-konjugált nyúl és egér IgG ellenes másodlagos antitest alkalmazását követően az immunreaktív sávokat ECL Western blotting detection kittel (erősített kemilumineszcenciás Western blot detektáló készlet) mutattuk ki fényérzékeny filmen. A jelintenzitás kvantifikálása LAS3000 Dark Box (sötét doboz)-ban került sor, az optikai denzitás (OD) értékeket az Image-Pro Plus 4.5 képanalizáló szoftver segítségével mértük meg és a kontroll minta értékére normalizáltuk. Annak igazolására, hogy az egyes sávokra felvitt azonos mennyiségű protein azonos mértékben is blottolódott át a nitrocellulóz membránra, rutinszerűen ellenőriztük a membránok citokróm c jelölődését. A nitrocellulóz membránokat 200 ml 2% SDS-t és 0,1% β-merkaptotanol tartalmazó 50 mM Tris-HCl pufferbe helyeztük (pH: 7,5) 1 h-ra 65 °C-on, majd egérben termelt anti-citokróm c elsődleges, illetve egér IgG elleni HRPO-konjugált másodlagos antitesttel a fent leírt módon ellenőriztük, valóban egyenlő-e a vizsgált sávok citokróm c jeleinek intenzitása.

IV.4. Az siRNS technika

A módszer lényege, hogy a sejtbe juttatott kettős szálú, 20-25 bázispárból álló siRNS (small/short interfering RNS – kis/rövid interferáló RNS; silencing RNS – „elnémító” RNS) megfelelő szálja a cytoplasmaticus RISC komplex (RNA induced silencing complex – RNS indukálta „elnémító” komplex) részeként a specifikus komplementer szakaszt tartalmazó mRNS hasítását és lebomlását idézi elő, így megfelelően megválasztva alkalmas egy adott gén transzlációjának szelektív gátlására (Harari, 2005).

Technika: a IV.1.2. alfejezetben leírt módon primer kultúrában fenntartott izomsejteket háromnapos korukban a jetSI-ENDO kationos transzfektáló reagens segítségével transzfektáltuk az 5' végükön fluoreszcinnel konjugált, a

P2X₄R (5' CCAGCAUUUGCGAUUCAGA dTdT 3' sense szál,
5' UCUGAAUCGCAA AUGCUGG 3' antisense szál), a

P2X₅R (5' ACAGGCAACAAACA UUUCC dTdT 3' sense szál,
5' GGAAAUGUUUGUUGCCUGU 3' antisense szál), a

P2X₇R (5' UCAUGGGUAUCGAGAUCUA dTdT 3' sense szál,
5' UAGAUCUCGAUACCCAUGA 3' antisense szál), és a

P2Y₁R (5' GUAGCUGCCUGAGUUGGAA dTdT 3' sense szál,
5' UUCAACUCAGGCAGCUAC 3' antisense szál)

ellen tervezett siRNS-ekkel, követve a gyártó utasításait. A transzfekció szérumtartalmú, antibiotikummentes DMEM tápoldatban történt. 24 órás inkubációs periódus után a tenyésztő médiumot szérumtartalmú, antibiotikummentes normál DMEM tápoldatra cseréltük. A méréseket a transzfekció után 48 órával, összesen tehát 4-5 napos sejteken végeztük. Kontrollként olyan jetSI-ENDO-val kezelt sejteket használtunk, melyek pontosan a fenti protokollon mentek keresztül, de a kísérlet során kihagytuk a siRNS-t. A célgének maradék transzlációjának mértékét, tulajdonképpen tehát a szuppresszió fokát Western blottal ellenőriztük.

IV.5. Ionáram- és membránpotenciál-mérések

Az extracelluláris ATP által indukált transzmembrán ionáramok és membránpotenciál-változások megfigyelését patch-clamp technika segítségével, teljes sejtes (whole-cell) elrendezésben végeztük szobahőn. Méréseink során Axopatch 200A erősítőt használtunk. A patch-mikropipettákat izzítás után vékony boroszilikát üvegapillárisokból készítettük, elektromos ellenállásuk a mesterséges belső oldattal (110 mM K-aszpartát, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂,

5 mM EGTA, 5 mM HEPES, 2 mM MgATP, 7,3-ra pH-zva KOH-dal) feltöltve 3-4 MΩ volt. A sejtek elektromos ingerlését, a mintavételezést és az eredmények kiértékelését a pCLAMP 6.0.4. szoftver segítségével valósítottuk meg. Az elektromos jelek mintavételezése 1 kHz-es gyakorisággal történt.

A sejtek passzív elektromos paramétereinek (kapacitásának) meghatározásához 40 ms hosszú, 5 mV amplitúdójú, -80 mV-os holding (tartó) potenciálról induló depolarizáló impulzust használtunk. A vizsgált sejtek lineáris kapacitása 70-700 pF volt (a differenciáltabb sejtek esetében kaptunk nagyobb értékeket). Az ionáramokat a mérőrendszer voltage-clamp („feszültség-rögzítés”), a membránpotenciált current-clamp („áram-rögzítés”) módjában detektáltuk. Előbbi esetben a holding potenciált -80 mV-on rögzítve az extracelluláris ATP és BzATP hatására kialakuló áramokat (I_{ATP} és I_{BzATP}) mint a holding áramban bekövetkező változásokat mértük, míg current-clamp módban az agonisták kiváltotta membránpotenciál-változásokat, a depolarizáció mértékét határoztuk meg. Az eredmények bemutatásakor az esetek többségében az egységnyi kapacitásra eső áramot, azaz az áramsűrűséget adtuk meg, így ugyanis az általunk használt igen különböző méretű felszínnel (egymagvú myoblast → 10-nél is több magvú secunder myotubulus) és így kapacitással rendelkező sejteken nyert adatok könnyebben összehasonlíthatóvá váltak.

Az alkalmazott oldatok cseréjét állandó sebességű perfúziós rendszerrel oldottuk meg. Kísérleteink során a külső oldatba 10 μM tetrodotoxint tettünk, hogy a gyors feszültségfüggő Na^+ -csatornákon keresztüli inward (befelé irányuló) Na^+ -áramokat gátoljuk.

IV.6. A sejtprolifерáció és sejthalál vizsgálata

IV.6.1. MTT sejtproliferációs teszt

Az élősejt-számot az élő sejtek azon tulajdonsága alapján határoztuk meg, mely képessé teszi őket, hogy az MTT tetrazolium sót formazánná alakítsák át. Az 5000 sejt/lyuk denzitásban 96 lyukú tenyésztő edényben fenntartott sejtekhez a tenyésztés 6. napján 0,5 mg/ml MTT-t adtunk. 2 h 37 °C-on történő inkubálás után az élősejt-számmal arányos formazánkristály-koncentrációt kolorimetriás módszerrel, BioRad Model 550 Microplate Readerben, 570 nm-en mérve az abszorpciót, a gyártó utasításainak megfelelően határoztuk meg.

IV.6.2. Áramlási citometriás apoptosisvizsgálat

A 6 lyukú tenyésztőedényben kitapadt melanoma sejtek tápoldatát szérummentes tápoldatra cseréltük és 1 μM metoxi-ösztradiollal egészítettük ki, hogy apoptosist indukáljunk

(Dobos és mtsai, 2004). Az ATP hatásának vizsgálatára a tenyészetek egy részéhez a metoxi-ösztadiol mellett 180 μ M ATP-t is adtunk, melyet naponta kétszer pótolunk a tápoldatban. 48 h elteltével a sejteket 0,02%-os EDTA-val szuszpenzióba vittük, majd centrifugálást és PBS-es mosást követően 70%-os etanolban fixáltuk. 2 órán át inkubáltuk őket propidium-jodiddal és RNázzal (CyStain® PI Absolute P), majd CyFlow® áramlási citométerrel meghatároztuk a DNS-tartalmukat. Az apoptotikus sejteknek megfelelő sub-G₀/G₁ frakció nagyságát a FlowMax® szoftver segítségével határoztuk meg.

Azokban a kísérletekben, ahol a ZnSO₄ hatásait vizsgáltuk az apoptosissra, nem indukáltunk apoptosist metoxi-ösztadiollal és a tápoldat szérumot is tartalmazott, egyébként hasonlóan jártunk el.

IV.6.3. Nekrotikus sejtek arányának meghatározása - tripánkék exclusiós teszt

A tripánkék exclusiós teszt alapja, hogy az élő sejtek intakt sejtmembránján a festék nem jut át, míg a nekrotikus sejtek cytoplasmáját kékre festi. A vizsgált sejteket centrifugálás után PBS-ben szuszpendáltuk, majd a szuszpenziót 1:1 arányban összekevertük 0,4%-os tripánkékoldattal. 3 perc szobahőn történő inkubáció után Bürker-kamrában megszámlálva a kék és nem kék sejteket határoztuk meg a nekrotikussejt-arányt.

IV.7. Tumornövekedés és metastasisképzés *in vivo* állatmodellben

Az élő állatokon végzett kísérletek a budapesti OOI-ben, az OOI Állatetikai Bizottságának jóváhagyásával történtek. Egy sejtréteget alkotó, kitapadt HT168-M1 melanoma sejteket 0,02%-os EDTA-kezeléssel szuszpenzióba vittünk, majd centrifugálás és mosás után Medium 199-ben reszuszpendáltuk őket. Három csoportra osztott, csoportonként 6-8 SCID egérbe 50 μ l térfogatban 5×10^4 élő tumorsejtet injektáltunk intrasplenicusan. Az inokulációt követő 7. naptól kezdve az első csoport 100, a második 500 μ g/ttkg/nap dózisban ZnSO₄-ot kapott PBS-ben oldva 12 napon át *per os*, míg a harmadik csoport ugyanolyan mennyiségű üres PBS-t kapott. Az állatokat a kísérlet 28. napján, amikor a kontroll csoportban levők testsúlyvesztése meghaladta a 20%-ot, Na-pentobarbitál (Nembutal®) i.p. injekciójával túlaltattuk, majd meghatároztuk a májmetastasisok számát, illetve a primer tumor méretének indikátoraként az eltávolított lép tömegét.

IV.8. Statisztikai analízis

A statisztikai analízis során átlagértékeket és azok standard hibáit határoztuk meg, a szövegben és ábrákon ezek mindig $\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$ -ként (standard error of the mean, az átlag standard hibája) vannak feltüntetve. Kísérleti adatok csoportjainak összehasonlításához Student-féle t-próbát használtunk (SigmaPlot® 8.0), szignifikáns különbséget $p < 0,05$ esetén állapítottunk meg. Dózis-hatás görbék készítéséhez az adatpontokra Hill-függvényt illesztünk és ez alapján határoztuk meg a félhatásos dózist (EC_{50}), illetve a kooperativitási koefficiens (n), amihez szintén a SigmaPlot® 8.0 szoftvert használtuk.

IV.9. A használt vegyszerek és eszközök kereskedelmi forgalmazói

4-(2-aminoetil)-benzil-sulfonil-fluorid	<i>Sigma</i> ²⁸	CaCl ₂	<i>Sigma</i> ²⁸
AIM-V Lymphocyte Medium	<i>Gibco</i> ¹⁷	Cole-Parmer® Ultrasonic Homogenizer-4710	<i>Cole-Parmer</i> ¹⁰
anti-citokróom c IgG antitest	<i>Santa Cruz</i> ²⁷	CPA	<i>Sigma</i> ²⁸
anti-dezmin IgG1 antitest	<i>Dako</i> ¹¹	CyFlow® áramlási citométer	<i>Partec</i> ²²
anti-HMB-45 IgG1 antitest	<i>Dako</i> ¹¹	CyStain® PI Absolute P	<i>Partec</i> ²²
anti-P2X ₁ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	DeltaScan®	<i>PTI</i> ²⁴
anti-P2X ₂ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	DMEM	<i>Sigma</i> ²⁸
anti-P2X ₃ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	DMSO	<i>Sigma</i> ²⁸
anti-P2X ₄ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	ECL Western blotting detection kit	<i>Amersham</i> ⁴
anti-P2X ₅ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	Econo-pump	<i>Bio-Rad</i> ⁹
anti-P2X ₇ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	EDTA	<i>Sigma</i> ²⁸
anti-P2Y ₁ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	EGTA	<i>Sigma</i> ²⁸
anti-P2Y ₂ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	FCS	<i>Sigma</i> ²⁸
anti-P2Y ₄ IgG antitest	<i>Alomone</i> ³	fenolvörös	<i>Sigma</i> ²⁸
anti-RyR IgG1 antitest	<i>Affinity Bio-Reagents</i> ¹	fényérzékeny film	<i>AGFA</i> ²
anti-S100 IgG	<i>Dako</i> ¹¹	FITC-konjugált egér IgG (H+L) ellenes antitest	<i>Vector</i> ³⁰
anti-SERCA2 IgG antitest	<i>Santa Cruz</i> ²⁷	FITC-konjugált nyúl IgG (H+L) ellenes antitest	<i>Vector</i> ³⁰
ATP	<i>Sigma</i> ²⁸	FlowMax® szoftver	<i>Partec</i> ²²
Axopatch 200A erősítő	<i>Axon</i> ⁶	Fungizone	<i>Biogal</i> ⁷
briliánskék-G	<i>Sigma</i> ²⁸	Fura-2-AM	<i>Mol.Probes</i> ²⁰
BCA™ Protein Assay Kit	<i>Pierce</i> ²⁵	Geneticin	<i>Invitrogen</i> ¹⁸
Bio-Rad Model 550 Microplate Reader	<i>Bio-Rad</i> ⁹	gentamicin	<i>Biogal</i> ⁷
biotin-konjugált egér IgG ellenes antitest	<i>Amersham</i> ⁴	glükóz	<i>Sigma</i> ²⁸
boroszilikát üvegapilláris	<i>Bio-Logic</i> ⁸	HAM F-12 Sigma hrEGF	<i>Gibco</i> ¹⁷
BPE	<i>Gibco</i> ¹⁷	HRPO-konjugált egér IgG ellenes antitest	<i>Bio-Rad</i> ⁹
BSA	<i>Sigma</i> ²⁸	HRPO-konjugált nyúl IgG ellenes antitest	<i>Bio-Rad</i> ⁹
BzATP	<i>Sigma</i> ²⁸		

HS	<i>Sigma</i> ²⁸	propidium-jodid	<i>Sigma</i> ²⁸
Image-Pro Plus 4.5. szoftver	<i>Media Cyb.</i> ¹⁹	SigmaPlot® 8.0 szoftver	<i>Systat</i> ²⁹
jetSI®-ENDO	<i>Eurogentec</i> ¹⁵	siRNS (P2 receptorok ellen)	<i>Eurogentec</i> ¹⁵
KCl	<i>Sigma</i> ²⁸	SPOT Advanced v. 3.5.	
Keratinocyte-SFM	<i>Gibco</i> ¹⁷	szoftver	<i>Diagn.Instr.</i> ¹²
KH ₂ PO ₄	<i>Sigma</i> ²⁸	SPOT RT digitális kamera	<i>Diagn.Instr.</i> ¹²
kollagenáz II	<i>Sigma</i> ²⁸	Stigmosan	<i>Pharma-</i> <i>Magist</i> ²³
LAS3000 Dark Box	<i>Fuji</i> ¹⁶	streptavidin-FITC	<i>Amersham</i> ⁴
leupeptin	<i>Sigma</i> ²⁸	streptomycin	<i>Biogal</i> ⁷
L-glutamát	<i>Sigma</i> ²⁸	szacharóz	<i>Sigma</i> ²⁸
2ME	<i>Sigma</i> ²⁸	tripánkék oldat 0,4%	<i>Sigma</i> ²⁸
Medium 199	<i>Sigma</i> ²⁸	tripszin	<i>Difco</i> ¹³
Menzel-Gläser fedőlemez	<i>Erie</i> ¹⁴	Tris-HCl	<i>Sigma</i> ²⁸
2-MeS-ADP	<i>Sigma</i> ²⁸	TR-konjugált egér IgG	
MgSO ₄	<i>Sigma</i> ²⁸	(H+L) ellenes antitest	<i>Vector</i> ³⁰
MTT	<i>Sigma</i> ²⁸	TR-konjugált kecske IgG	
Na ₂ HPO ₄	<i>Sigma</i> ²⁸	(H+L) ellenes antitest	<i>Vector</i> ³⁰
NaCl	<i>Sigma</i> ²⁸	TR-konjugált nyúl IgG	
NaHCO ₃	<i>Sigma</i> ²⁸	(H+L) ellenes antitest	<i>Vector</i> ³⁰
Nembutal	<i>Sanofi</i> ²⁶	UTP	<i>Sigma</i> ²⁸
Nikon Eclipse E600		Valve Bank™ 8 II System	<i>AutoMate</i> ⁵
fluoreszcens mikroszkóp	<i>Nikon</i> ²¹	Vectashield Mounting	
nitrocellulóz membrán	<i>Bio-Rad</i> ⁹	Medium with DAPI	<i>Vector</i> ³⁰
o-ATP	<i>Sigma</i> ²⁸	Zeiss LSM 510 META	
pCLAMP 6.0.4. szoftver	<i>Axon</i> ⁶	konfokális lézer pásztázó	
penicillin	<i>Biogal</i> ⁷	mikroszkóp	<i>Zeiss</i> ³
Perfusion Pencil®	<i>AutoMate</i> ⁵	ZnSO ₄	<i>Sigma</i> ²⁸
Pluronic® F-127	<i>Sigma</i> ²⁸		

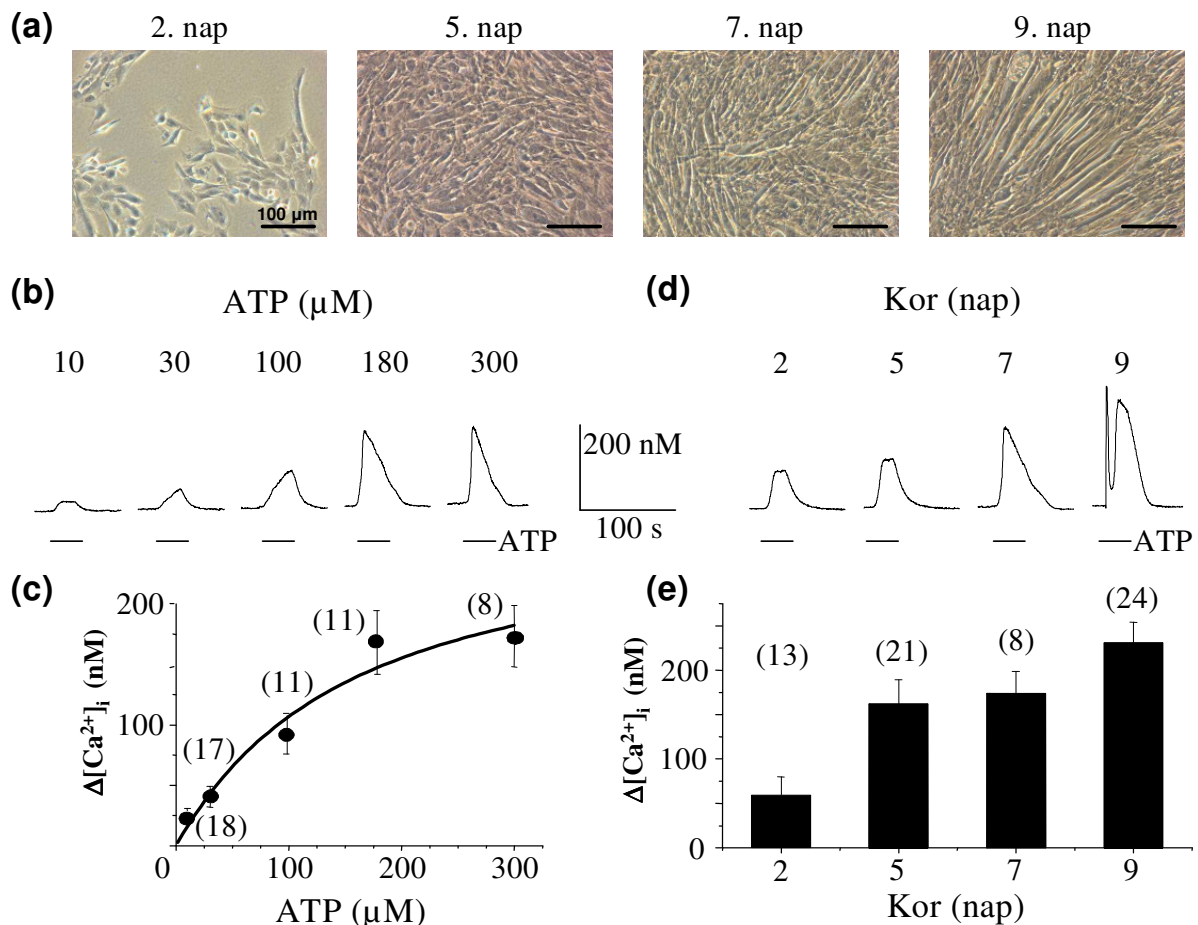
¹Affinity BioReagents, Golden, CO, USA; ²AGFA, Brüsszel, Belgium; ³Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael; ⁴Amersham, Little Chalfont, Nagy-Britannia; ⁵AutoMate Scientific, San Francisco, CA, USA; ⁶Axon Instruments, Foster City, CA, USA; ⁷Biogal-TEVA, Debrecen, Magyarország; ⁸Bio-Logic, Claix, Franciaország; ⁹Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; ¹⁰Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA; ¹¹Dako North America, Carpinteria, CA, USA; ¹²Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA; ¹³Difco, Detroit, MI, USA; ¹⁴Erie Scientific, Budapest, Magyarország; ¹⁵Eurogentec S.A., Seraing, Belgium; ¹⁶Fuji, Tokió, Japán; ¹⁷Gibco-Invitrogen, Paisley, Nagy-Britannia; ¹⁸Invitrogen, Paisley, Nagy-Britannia; ¹⁹Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA; ²⁰Molecular Probes-Invitrogen, Paisley, Nagy-Britannia; ²¹Nikon, Tokió, Japán; ²²Partec, Münster, Németország; ²³Pharmamagist, Budapest, Magyarország; ²⁴Photon Technology International (PTI), Birmingham, NJ, USA; ²⁵Pierce, Rockford, IL, USA; ²⁶Sanofi Phylaxia, Budapest, Magyarország; ²⁷Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; ²⁸Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; ²⁹Systat Software, Point Richmond, CA, USA; ³⁰Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; ³¹Zeiss AG, Oberkochen, Németország

V. Eredmények

V.1. A purinerg szignalizáció változásai C2C12 egér myoblast sejtvonal differenciálódása során

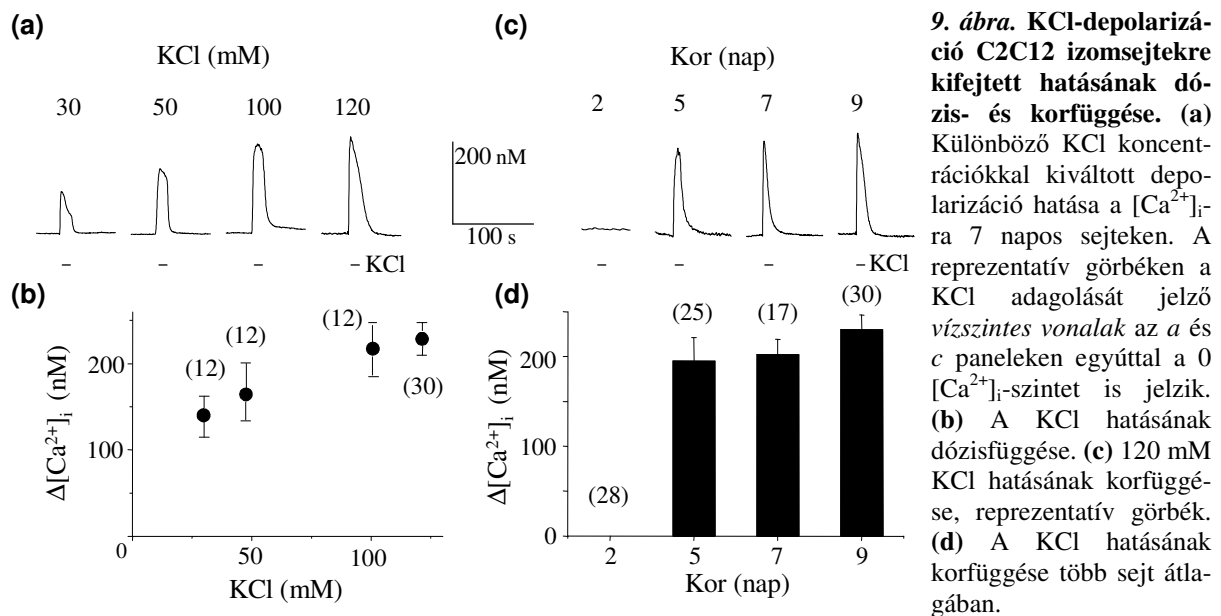
V.1.1. ATP és KCl-depolarizáció hatásának dózis- és korfüggése

Mivel a különféle sejtek purinoreceptor-mintázata és belső Ca^{2+} -raktárainak fejlettsége rendkívül változatos (Ralevic és Burnstock, 1998), a C2C12 sejtvonal vizsgálatát az ATP dózis-hatás görbéjének meghatározásával kezdtük (8./b és c ábra), hogy a további kísérletek előtt megtudjuk, milyen ATP-koncentráció vált ki maximális választ. A kapott pontokra Hill-függvényt illesztettünk (8./c ábra), az így meghatározott félhatásos dózis $\text{EC}_{50}=143 \mu\text{M}$ -nak, a Hill-koefficiens $n=1,05$ -nek adódott.



8. ábra. Extracellulárisan alkalmazott ATP C2C12 izomsejtekre kifejtett hatásának dózis- és korfüggése. **(a)** C2C12 egér myoblastok (2. nap) sokmagvú myotubulusokká/izomrostokká (9. nap) történő differenciálódásának morfológiai stádiumai. **(b)** Különböző ATP-koncentrációk hatása a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra 7 napos sejteken. A reprezentatív görbékben az ATP adagolását jelző vízszintes vonalak a 0 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szintet is jelzik. **(c)** Az ATP hatásának dózisfüggése. A Hill-egyenlettel illesztett görbe alapján az $\text{EC}_{50}=143 \mu\text{M}$, a Hill-koefficiens (n) 1,05. **(d)** 180 μM ATP hatásának korfüggése, reprezentatív görbék. **(e)** Az ATP hatásának korfüggése több sejt átlagában.

Második lépésként a dózis-hatás görbe alapján maximális választ kiváltó 180 μM ATP hatásának korfüggését vizsgáltuk meg. Amint az a 8./e ábrából is világosan látható, a sejtek Ca^{2+} -tranziensei a differenciálódás előrehaladásával párhuzamosan monoton növekedést mutattak: míg 2 napos myoblastok tranzienseinek amplitúdója 111 ± 25 nM ($n=13$) volt, addig 9 napos, differenciált myotubulusok esetében 231 ± 35 nM-os ($n=24$) tranzienseket regisztráltunk. A 8./d ábra reprezentatív regisztrátumai további két dologra is rámutatnak: egyrészt a differenciálódás során a sejtek nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szintjében (ami mintegy 50 nM-nak adódott) jelentős változás nem történt, ugyanakkor a tranziensek morfológiája jellegzetes változáson ment keresztül, amennyiben a legfejlettebb, 9 napos myotubulusok esetében bifázisos tranziensek jelentek meg. A 3. táblázat tanúsága szerint egy gyorsan kialakuló és lecsengő, nagy amplitúdójú komponenst némi késéssel egy lassabb és kisebb fázis követ.



Mivel a gyors fázis megjelenése arra engedett következtetni, hogy az ATP által kiváltott szignál feldolgozásában feszültségfüggő folyamatok is részt vehetnek, következő lépésként a KCl-depolarizáció hatását tettük vizsgálat tárgyává. Ez esetben is dózis-hatás görbét szerkesztettünk (9./a és b ábra), majd a maximálisan hatékonynak talált 120 mM-os KCl-koncentrációval folytattuk a kísérleteket. A korfüggés vizsgálatakor azt találtuk, hogy a legfiatalabb sejtek még egyáltalán nem reagáltak a depolarizáló impulzusra, valamikor a 2. és 5. nap között viszont megjelent a válaszkészségük, amely 5 napos korukra már mintegy 200 nM-os amplitúdóval a közel maximális nagyságot érte el, és a fejlődés későbbi stádiumai során alig mutatott további növekedést (9./c,d ábra). A depolarizáció és az extracellulárisan alkal-

3. táblázat. Differenciált C2C12 myotubulusok KCl-depolarizáció és ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseinek kinetikai paramétereit. A csillag (*) a KCl-depolarizáció kiváltotta tranziensek megfelelő paramétereitől való szignifikáns eltérést jelzi.

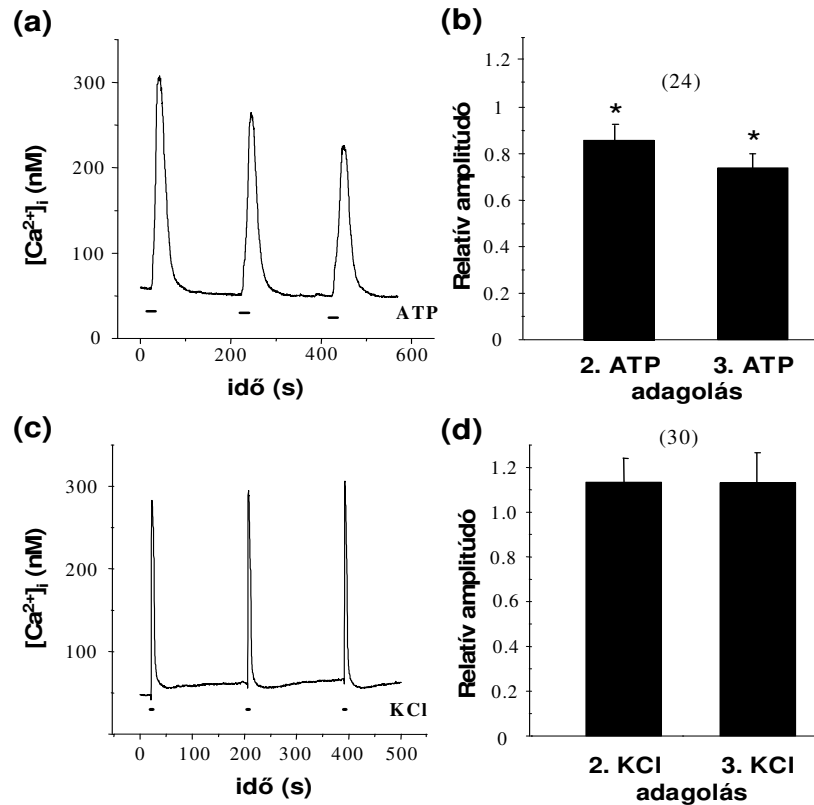
	KCl-depolarizáció	ATP-stimulus, 1. fázis	ATP-stimulus, 2. fázis
Ca^{2+} -tranziens amplitúdója (nM)	285 ± 76	228 ± 54	$124 \pm 32^*$
látencia (s)	$3,8 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,4$	$6,8 \pm 1,4^*$
tranziens kialakulásának maximális sebessége (nM/s)	289 ± 77	300 ± 72	$28 \pm 10^*$
leszálló szár időállandója (s)	$2,6 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,1^*$	$10,0 \pm 1,3^*$

mazott ATP kiváltotta tranziensek kinetikai paramétereinek a 3. táblázatban bemutatott összevetése egyértelműen arra enged következtetni, hogy a bifázisos purinerg válasz első komponense feszültségfüggő folyamatok aktiválódása révén jön létre. (Az ATP indukálta válasz első fázisa leszálló szárának időállandója azért lehet szignifikánsan kisebb ugyanezen paraméter KCl-depolarizációt követő tranzienseken meghatározott értékénél, mert utóbbi esetben a K^+ -kilépés révén megvalósuló repolarizációt az extracelluláris tér megnövelt K^+ -tartalma gátolja. Emellett technikailag is problematikus az ATP-válasz első fázisa időállandójának pontos meghatározása, ugyanis a leszálló szárra csak nehezen illeszthető exponenciális függvény, mivel a második felszálló szár a nyugalmi helyzet újbóli elérése előtt már elkezdődik.)

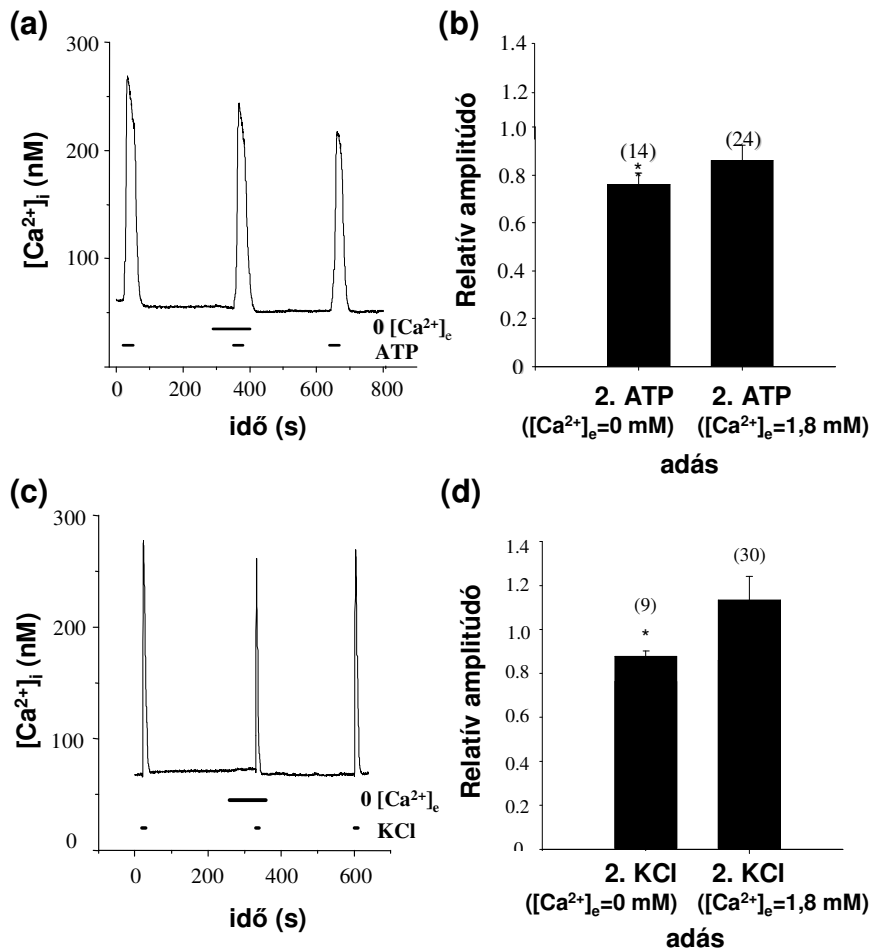
V.1.2. ATP és KCl-depolarizáció hatása extracelluláris Ca^{2+} hiányában

Különböző módon ugyan, de mind az ATP, mind a depolarizáció megnövelheti a sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ját a belső raktárakból ki-, illetve a külső térből belépő Ca^{2+} segítségével (lásd például Ralevic és Burnstock, 1998; Cognard és mtsai, 1993). Vizsgálataink folytatásában azt kívántuk meghatározni, hogy milyen arányban vesz részt a kiváltott Ca^{2+} -tranziensben az extracelluláris térből történő kalciumbelépés az egyes stimulusok esetében. Ennek megfelelően kísérleteinket extracelluláris Ca^{2+} hiányában is elvégeztük, azonban – az eredmények félreértelmezését megelőzendő – a vizsgálatok kezdete előtt megvizsgáltuk, van-e és ha igen, milyen mértékű deszenzitizáció ismételt agonistaalkalmazásokat követően. A 10./a és c ábrán feltüntetett protokollokat végrehajtva azt tapasztaltuk, hogy ismételt ATP-adagolás esetében szignifikáns deszenzitizáció lépett fel (a 2. tranziens mintegy 85, a 3. mintegy 70%-a az első tranziensnek, 10./b ábra), míg ismételt depolarizáló impulzusokat követően a válaszkészség

nem csökkent, sőt, kisfokú növekedést is tapasztaltunk a tranziensek amplitúdóiban, azonban ez statisztikailag nem volt szignifikáns (10./d ábra).



10. ábra. Ismételt ATP- és KCl-adagolás hatása 7 napos C2C12 sejtek Ca^{2+} -tranzienzeire. A reprezentatív görbék a $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező tranziens változásokat mutatják 180 μ M ATP 30 s-ig (a) és 120 mM KCl 10 s-ig (c) történt extracelluláris, 180 s-onként ismételt alkalmazása után. Az oszlopdiagramok a 2. és 3. ATP- (b) és a KCl- (d) adagolás kiváltotta Ca^{2+} -tranzিয়েns amplitúdóit hasonlítják az adott sejten kiváltott 1. tranziens 1,0-nek tekintett amplitúdójához, több sejt átlagában. A csillag (*) az azonos nagyságú relatív amplitúdót jelentő 1,0-es értéktől való szignifikáns eltérést jelzi.

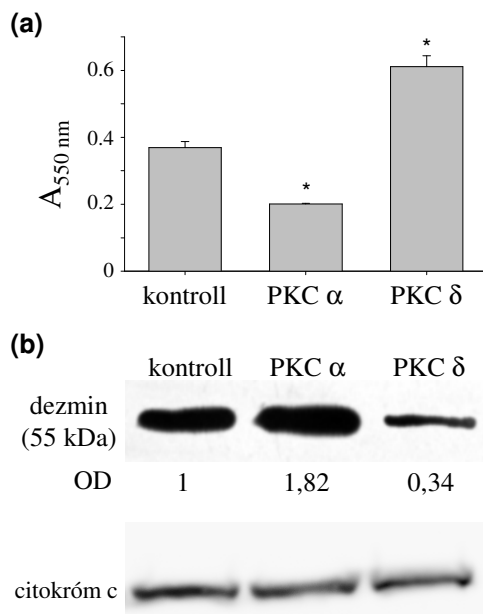


11. ábra. Ca^{2+} -mentes extracelluláris környezet hatása 7 napos C1C12 sejtek ATP és KCl kiváltotta Ca^{2+} -tranzienzeire. A reprezentatív görbék az eredetileg 1,8 mM-os $[Ca^{2+}]_e$ 0 mM-osra csökkentését követő 180 μ M ATP- (a) és 120 mM KCl- (c) alkalmazás hatásait mutatják be. Az oszlopdiagramok a nem csökkentett Ca^{2+} -tartalmú és a Ca^{2+} -mentesített extracelluláris oldatban ATP (b) és KCl (d) adagolásával kiváltott Ca^{2+} -tranzিয়েns amplitúdóit hasonlítják össze az adott sejten 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ mellett kiváltott 1. tranziens 1,0-nek tekintett amplitúdójával, több sejt átlagában. A csillag (*) az azonos nagyságú relatív amplitúdót jelentő 1,0-es értéktől való szignifikáns eltérést jelzi.

Ezeket az eredményeket figyelembe véve egy első tranziensre, mint kontrollra normalizált második tranziensek amplitúdóit hasonlítottuk össze extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében és hiányában (11. ábra). Utóbbi esetben mind az ATP (11./b ábra), mind a KCl-depolarizáció (11./d ábra) által kiváltott tranziensek szignifikánsan kisebbek voltak: míg ATP esetében a külső Ca^{2+} elvétele a relatív amplitúdót $86 \pm 6\%$ -ról $76 \pm 4\%$ -ra csökkentette, addig ugyanez a változás depolarizáció esetében $113 \pm 10\%$ -ról $87 \pm 2\%$ -ra való csökkenést jelentett. Ez egyfelől azt jelzi, hogy a közel maximálisan differenciált (7 napos) C2C12 sejteken mindkét stimulálási mód olyan útvonalakat is aktivál, melyek az extracelluláris Ca^{2+} belépéséhez vezetnek. Másrészt viszont az a tény, hogy a külső Ca^{2+} eltávolítása a tranziensamplitúdókat csak mintegy 10-20%-kal csökkentette azt is jelzi, hogy a cytoplasmában az ATP- vagy KCl-alkalmazás után megjelenő Ca^{2+} nagy része a belső raktárakból származik és a sejtek válaszó-lási képessége nem függ jelentősen a külső tér Ca^{2+} -tartalmától.

V.1.3. Az ATP és KCl által kiváltott válaszok változásai PKC α - és PKC δ -overexpresszió indukálta differenciálódás és proliferáció során

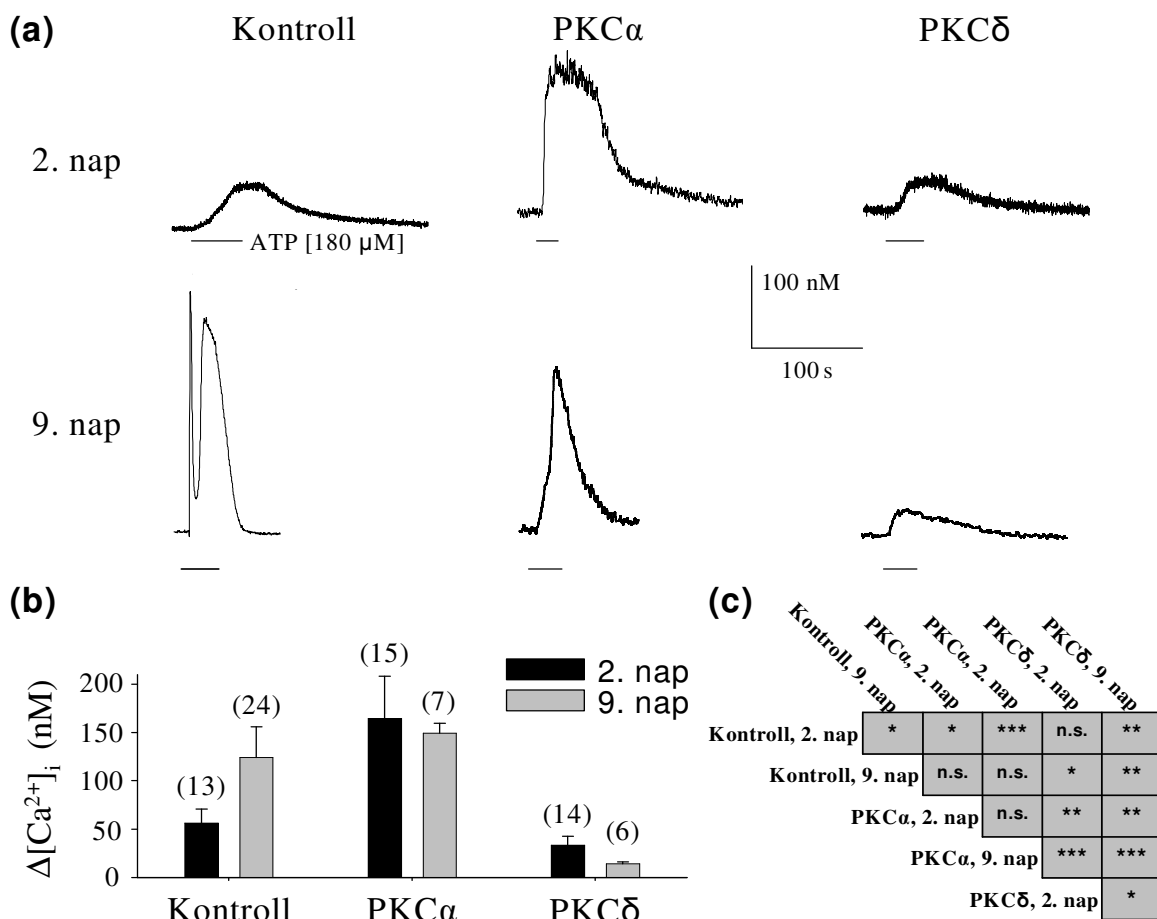
Az izomprekursor szatellitasejtek differenciálódásának komplex folyamatát *in vivo* szövetsérülés indítja be, *in vitro* pedig a tápoldat szérumtartalmának és -összetételének megfelelő megváltoztatásával (lásd IV.1.1. és IV.1.2. alfejezet, illetve Freshney, 1992) indukálhatjuk (a továbbiakban SID, szérum indukálta differenciálódás). Ismeretes azonban, hogy a SID fent említett módszere mellett egyes PKC izoenzimek túltermelése és túlműködése a szérumtartalom megváltoztatása nélkül is hasonló eredményre vezet (a továbbiakban PKCID, PKC indukálta differenciálódás), míg más izoformák a sejtosztódás felgyorsulását eredményezik (Bíró



12. ábra. PKC α és PKC δ izoenzimek overexpressziójának hatása a C2C12 sejtek proliferációjára és differenciációjára. (a) Az élősejtszámmal arányos, MTT proliferációs teszttel meghatározott, 550 nm-en mért abszorbanciák kontroll, PKC α -t és PKC δ -t overexpresszáló 6 napos C2C12 sejtenyészetekben, több kísérlet átlagában. A csillag (*) a kontrolltól való szignifikáns különbséget jelzi. (b) Western immunoblottal kimutatott dezminexpresszió ugyanezen sejttypusokban. Az ábra feltünteti a kontrollra normált relatív optikai denzitásokat (OD), illetve a felvitt minták proteintartalmának ekvivalenciáját igazoló citokróm c jelölődését is.

és mtsai, 2004; Czifra és mtsai, 2006). Annak reményében, hogy jobban megérthetjük, milyen összefüggés van a differenciálódás előrehaladása és a purinerg, valamint a feszültségfüggő sejtválaszban bekövetkező változások között, a továbbiakban e két szignalizációs utat PKC izoenzimek overexpressziójával indukált proliferáció és differenciáció során vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a SID-del. Megerősítendő az e témában korábban közölt eredményeket, mi is megvizsgáltuk az α és δ PKC-izoformák overexpressziójának hatását a C2C12 myoblastok proliferációjára és differenciációjára MTT proliferációs teszttel (12./a ábra), illetve az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin expresszióváltozásának Western blottal történő meghatározásával (12./b ábra). Eredményeink megerősítették, hogy a PKC α fokozta a differenciálódást és gátolta a proliferációt, a PKC δ pedig, ennek mintegy inverze-ként, a differenciálódást gátolta és a proliferációt fokozta.

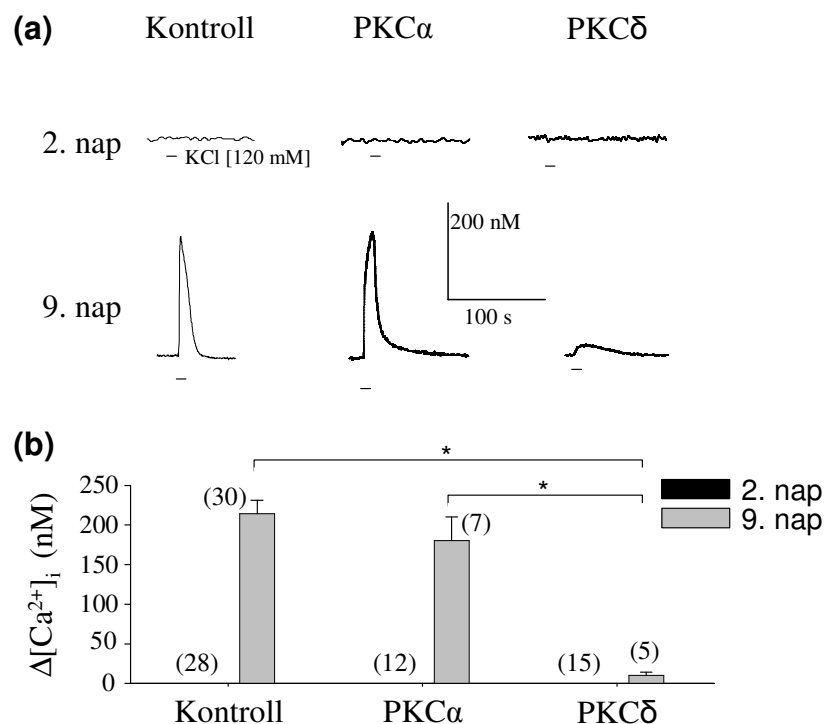
A fenti két PKC izoenzim valamelyikét overexpresszáló 2 napos sejteket és kontroll myoblastokat 180 μ M ATP-vel stimulálva azt találtuk, hogy a kontroll és a hiperproliferatív



13. ábra. PKC α és PKC δ izoenzimek overexpressziójának hatása fiatal (2 napos) és idős (9 napos) C2C12 izomsejtek ATP kiváltotta Ca^{2+} -tranzienseire. (a) 180 μ M ATP 2 és 9 napos sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jára kifejtett hatását bemutató reprezentatív görbék. Az ATP hozzáadását jelző szakaszok egyúttal a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 40 nM-os szintjét is jelzik. (b) Az ábra a részében bemutatotthoz hasonló számos kísérlet eredményeinek átlagát feltüntető hisztogram. (c) A vizsgált csoportok páronkénti statisztikai különbségének vizsgálata. Az egyes párok közötti szignifikáns különbséget csillagok (*) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$), míg a statisztikai különbség hiányát az n.s. (nem szignifikáns) rövidítés jelzi.

PKC δ -t overexpresszáló sejtek a már ismert (lásd még 8. ábra) kis választ produkáltak, a fokozott differenciálódást mutató PKC α -t overexpresszáló sejtek azonban már a fejlődés ezen korai stádiumában is igen nagy Ca²⁺-tranzienseket hoztak létre (13./b,c ábra), melyek morfológiájukban rendkívül hasonlítottak az idős kontroll myotubulusok tranzienseinek második fázisára (13./a ábra). Ugyanezen sejt típusokon 9 napos korukban elvégezett hasonló kísérletek azt mutatták, hogy a kontroll sejtek végigmentek a 8. ábrán már bemutatott fejlődési úton, azonban a PKC izoenzimeket overexpresszáló sejtek ATP-re mutatott válaszkészsége az első napokat követően tovább már nem változott, azaz a hiperproliferatívra tett sejtek megmaradtak a purinerg stimulusra adott „infantil” válasznál, míg a fokozott differenciálódásra készítették szemmel láthatóan már a 2. napra elérték a purinerg stimulusra adott válasz általuk elérhető maximális nagyságát (13. ábra). Érdekes volt megfigyelni, hogy a PKC δ során a Ca²⁺-tranziensek nem váltak bifázissá, ami viszont a SID-en végigment kontroll sejtekben igen tipikus jelenség volt. Ez a két differenciálódási mód különbségére mutatott rá és felvetette annak lehetőségét, hogy a PKC δ során a feszültségfüggő struktúrák fejlődése elmarad.

Ezen hipotézis tesztelésére megvizsgáltuk differenciálatlan és differenciált PKC α -t és PKC δ -t overexpresszáló sejtek válaszait KCl-depolarizációra (14. ábra). Nem túl meglepő módon azt találtuk, hogy a PKC δ -overexpresszáló klónok feszültségfüggő válaszai is megrekedtek egy alacsony szinten, mely differenciálódásuk elmaradásának volt betudható. Annál váratlanabb volt azonban az a megfigyelésünk, hogy a PKC α -t overexpresszáló, korán diffe-



14. ábra. PKC α és PKC δ izoenzimek overexpressziójának hatása fiatal (2 napos) és idős (9 napos) C2C12 izomsejtek KCl-depolarizáció kiváltotta Ca²⁺-tranzienseire. (a) 120 mM KCl által kiváltott depolarizáció 2 és 9 napos sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -jára kifejtett hatását bemutató reprezentatív görbék. A KCl hozzáadását jelző szakaszok egyúttal a $[Ca^{2+}]_i$ 40 nM-os szintjét is jelzik. (b) Az ábra a részében bemutatotthoz hasonló számos kísérlet eredményeinek átlagát feltüntető hisztogram. A csillagok (*) a jelzett csoportok közötti, statisztikailag szignifikáns különbséget mutatják.

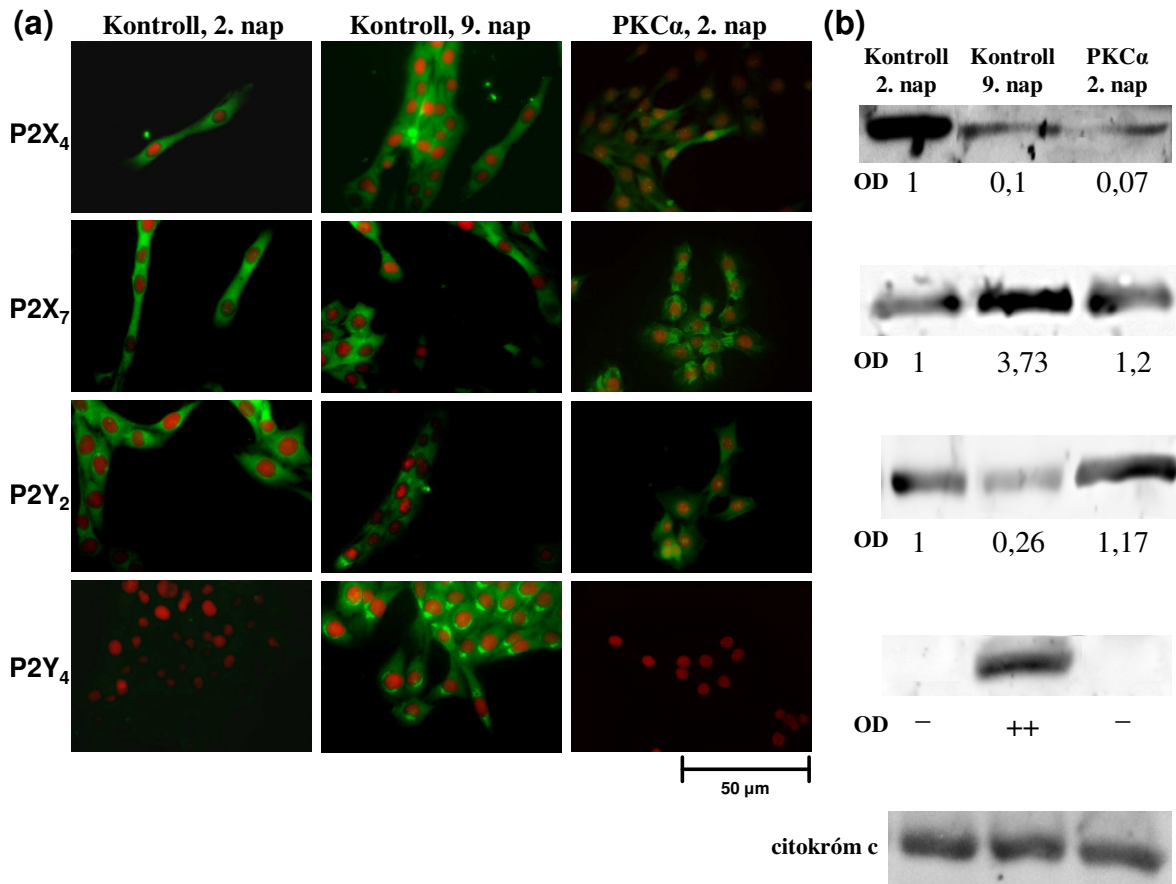
renciálódó sejtek abban a stádiumban (2 napos), amikor a purinerg válaszkészségük már maximálisan jelen volt, még nem fejlesztették ugyan ki magukban a depolarizációra való reagálás képességét, viszont érett, 9 napos sejt-ként már ugyanolyan gyors és nagy Ca^{2+} -tranzienseket mutattak KCl-stimulust követően, mint a kontroll SID-en átesett sejtek. Ez egyértelműen kizárta azt a – a bifázisos válasz hiányára lehetséges magyarázatként megfogalmazott – feltételezést, miszerint a PKCID kizárólag az ATP-szenzitivitás fejlődését segíti elő.

V.1.4. Purinerg receptorok expressziós mintázatának változásai SID és PKCID során

Eddigi kísérleteink megmutatták, hogy mindkét differenciálódástípus során jelentős fejlődés megy végbe a purinerg szignalizációban, a talált eltérésekért pedig nem a feszültségfüggő folyamatok fejlődésének különbségei a felelősek. Kézenfekvőnek tűnt annak feltételezése, hogy a purinerg jelet továbbító P2 receptorok expressziós mintázata különbözik a kétféle differenciálódás során. Ezért hat purinoreceptor ($\text{P2X}_{1,2,4,7}\text{R}$ és $\text{P2Y}_{2,4}\text{R}$) kimutatását kíséreltük meg immuncitokémiai festéssel (15./a ábra) és Western blottal (15./b ábra). SID és PKCID folyamatán végigment, differenciált sejtek receptormintázatát hasonlítottuk össze 2 napos kontroll, differenciálatlan myoblastok receptormintázatával. A P2X_1 és P2X_2 receptorokat egyetlen esetben sem tudtuk kimutatni, így ezek nem szerepelnek az ábrán, a többi receptor esetében viszont jelentős különbségekre derült fény.

A kontroll myoblastokon P2X_4 , P2X_7 és P2Y_2 receptorokat találtunk, a P2Y_4 receptor ezekben a sejtekben nem volt jelen. A differenciálódás előrehaladtával (az azt beindító mechanizmustól függetlenül) a P2X_4 receptor expressziójának szintje jelentősen, a kiindulási érték 10%-ára vagy az alá csökkent (15./b ábra). Az optikai denzitás értékek azt is megmutatják, hogy a P2X_7 receptor expressziója lényegében változatlan maradt a PKC α -t overexpresszáló sejtekben, viszont közel négyszeresére nőtt SID során.

A P2Y receptorok közül a $\text{P2Y}_2\text{R}$ szintje szintén csak mérsékelten emelkedett a PKCID 2. napjáig, ezzel szemben negyedére csökkent a SID befejeződéséig. A legmarkánsabb, nemcsak mennyiségi, hanem minőségi különbség a P2Y_4 receptor esetében volt megfigyelhető, hiszen ez a receptor teljesen hiányzott a differenciálatlan kétnapos myoblastokról és ez a helyzet a PKC α overexpressziója során sem változott meg, viszont a SID végállapotában a $\text{P2Y}_4\text{R}$ erőteljes expressziója volt detektálható.

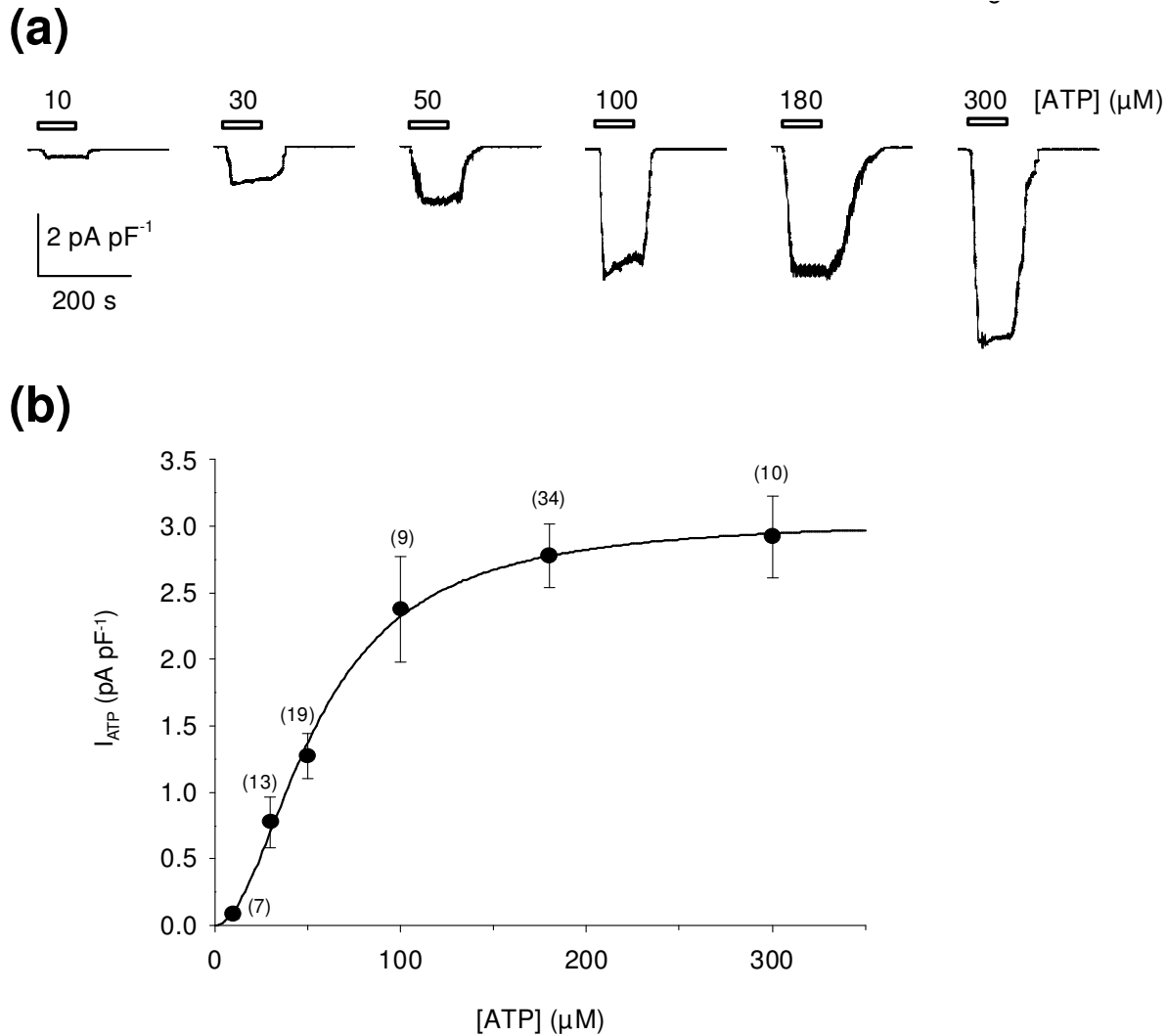


15. ábra. Purinerg receptorok expressziója kontroll és differenciálódó C2C12 sejtekben. (a) Differenciálatlan (kontroll, 2. nap) és differenciált (kontroll, 9. nap és PKCα, 2. nap) myoblastok és myotubulusok anti-P2X₄, -P2X₇R, -P2Y₂R és -P2Y₄R primer antitestekkel és FITC-cel konjugált másodlagos antitesttel (zöld) történt immuncitokémiai festésének eredménye. Expozíciós idő: 2 s. Magfestés: propidium-jodid (piros). (b) Ugyanazon sejttípusokon ugyanazon primer antitestekkel végzett Western immunoblot eredménye. A P2X₄, P2X₇, P2Y₂ és P2Y₄ receptoroknak megfelelő sávokat rendre a 70, 65, 40 és 80 kDa-nak megfelelő magasságban kaptuk. Az optikai denzitás (OD) értékeket a 2 napos kontroll sejtek 1,0-nak vett OD értékeire normalizáltuk. A citokróm c egyforma sávjai a felvitt minták proteintartalmának azonosságát igazolják.

V.2. A purinerg szignalizáció változásai primer tenyésztett egér vázizomsejtek differenciálódása során

V.2.1. ATP hatásának dózis- és korfüggése

A C2C12 sejtekkel kapcsolatban említett megfontolások alapján primer tenyésztett vázizomsejteken is a dózis-hatás összefüggés feltérképezésével és a maximális hatást kiváltó ATP-koncentráció meghatározásával indítottuk kísérletsorozatunkat. Minthogy munkacsoportunk korábbi eredményei P2X receptorok mediálta inward áramok jelenlétét igazolták tenyésztett emlős izomsejteken (Collet és mtsai, 2002; Cseri és mtsai, 2002), a dózis-hatás görbét az ATP jelen modellrendszerünkben inward ionáramot kiváltó képességének vizsgálatával határoztuk meg (16. ábra). Az EC₅₀-re 56 μM, a Hill-féle kooperativitási koefficiens értékére



16. ábra. Az ATP hatásának dózisfüggése 5-10 magvú primer egér myotubulusokban. (a) Két 5-10 magvú, 131 (30, 50, 180 μM görbék) és 119 pF (10, 100, 300 μM görbék) kapacitású sejten, -80 mV tartó (holding) potenciálnál regisztrált áramsűrűség (a sejtkapacitásra normalizált I_{ATP}) görbék, melyeket a feltüntetett koncentrációkban extracellulárisan alkalmazott ATP-adás (*vízszintes fehér vonalak*) után mértünk. (b) Hasonló kísérletekből meghatározott dózis-hatás görbe. A pontokra illesztett Hill-függvény alapján az $EC_{50}=56$ μM és $n=1,96$.

$n=1,96$ adódott. A 180 μM-os ATP-koncentrációt már telítő dózissnak találtuk, így a következőkben az ATP egyre fejlettebb izomsejteken ionáramokra, $[Ca^{2+}]_i$ -ra és Ca^{2+} -fluxusra kifejtett hatásait ezen koncentrációt használva végeztük.

Először ATP-adagolás hatását vizsgáltuk meg 5-10 és 10-nél több magvú myotubulusok inward ionáramaira és membránpotenciáljára teljes sejtes patch-clamp technikával (17. ábra). A nukleotid 40 s-on keresztül fenntartott adagolása egyik fejlődési stádiumban sem váltott ki deszenzitizációt (17./a-i és b-i ábra), ugyanakkor a befelé irányuló I_{ATP} nagysága szignifikánsan különbözött: az 5-10 magvú sejteken mért áramsűrűség átlaga 1,5 pA pF⁻¹-nél nagyobb, míg a 10-nél több maggal rendelkező sejteken 0,25 pA pF⁻¹-nél is kisebb volt (17./c-i ábra). A differenciáltabb sejtek nyugalmi MP-ja átlagosan jóval negatívabb volt (-80 mV körüli, szemben az 5-10 magvú sejtek -60 mV körüli értékével), és – amint az a kisebb ionáramok alapján

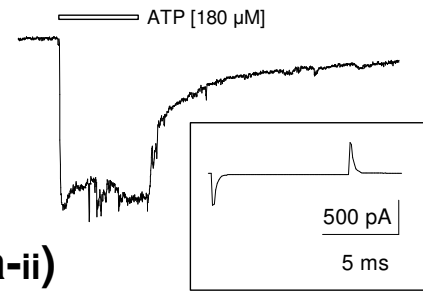
17. ábra. ATP által kiváltott áram- (I_{ATP}) és membránpotenciál- (MP) változások primer egér myotubulusok fejlődésének különböző stádiumaiban. (a) Egy 5-10 magvú, 173 pF kapacitású, -62 mV nyugalmi membránpotenciálú sejten 180 μ M ATP 40 s-ig történő alkalmazását (vízszintes fehér vonalak) követően regisztrált változások az I_{ATP} -ben (a-i) és ezzel párhuzamosan az MP-ben (a-ii). A tartó (holding) potenciál az a és b panelen bemutatott kísérleteknél is -60 mV volt. (b) Egy több, mint 10 magvú, 511 pF kapacitású, -76 mV nyugalmi membránpotenciálú sejten mért I_{ATP} - (b-i) és MP- (b-ii) változások. Az inzertek -10 mV-os hiperpolarizáló impulzusra bekövetkezett áramváltozásokat mutatnak, melyek alapján a sejtek lineáris kapacitásait kiszámoltuk. Az ábra b részén látható skála az a részre is vonatkozik. (c) Számos hasonló kísérlet során meghatározott átlagos áramsűrűség (a sejtkapacitásra normalizált I_{ATP} ; c-i) és MP (c-ii). A csillag (*) a két sejtípus, a kettős kereszt (#) a nyugalmi kontroll MP és az ATP-adás utáni értékek közötti szignifikáns különbséget jelzi.

várható is volt – az ATP csak sokkal kisebb mértékben váltott ki depolarizációt (17./a,b,c-ii ábrák).

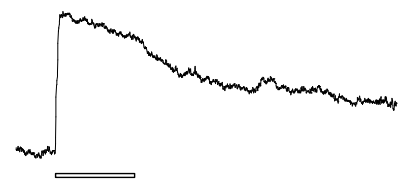
Az ATP hatására kialakuló Ca^{2+} -tranziensek és -fluxusváltozások igen jellegzetes különbségeket mutatnak 5-nél kevesebb, 5-10 és 10-nél több sejtmagott tartalmazó, eltérő differenciáltsági fokú sejtekben (18. ábra és 4. táblázat). A legéretlenebb sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ja az ATP-adagolás időtartama alatt az elért magasabb szinten stabilizálódott, majd azt követően visszaállt a nyugalmi értékre (18./a ábra). Az ábrán látható, hogy a Ca^{2+} -szint ezen változásainak hátterében egy gyors emelkedést, majd csökkenést mutató első (FL_{csúcs}), illetve azt követően egy, a nyugalminál magasabb szinten stabilizálódó, fenntartott második (FL_{plató}) komponensből álló fluxusváltozás állt.

A már valamivel érettebb 5-10 magvú sejtek egy részében az éretlen sejtekben tapasztaltakhoz jellegében hasonló, ám sokkal meredekebben felszálló, nagyobb maximális $[Ca^{2+}]_i$ -értéket eredményező és rövidebb ideig tartó FL_{csúcs}-ot találtunk (18./b-i ábra, 4. táblázat). A sejtek másik csoportjában az FL_{csúcs} ezen jellegzetességei szintén megfigyelhetők voltak, azonban a fluxusgörbe korai fázisának leszálló szára nem állapo-

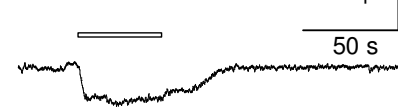
(a-i) 5-10 sejtmag



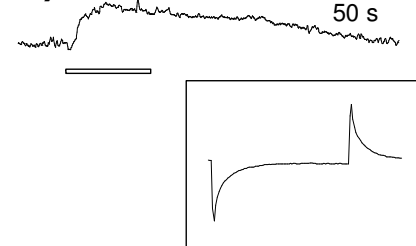
(a-ii)



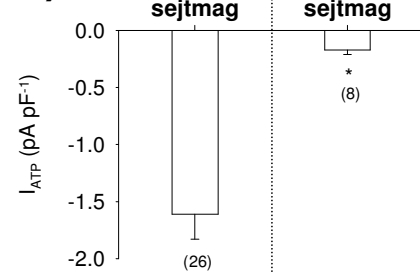
(b-i) >10 sejtmag



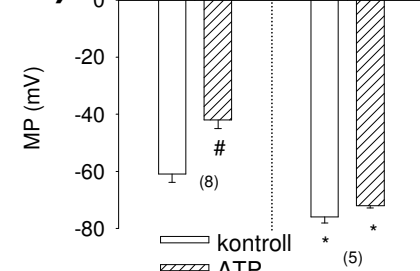
(b-ii)



(c-i)



(c-ii)



4. táblázat. Egér primer vázizomsejtek Ca^{2+} -tranzienseinek és -fluxusainak egyes paramétereit a differenciáció különböző stádiumaiban

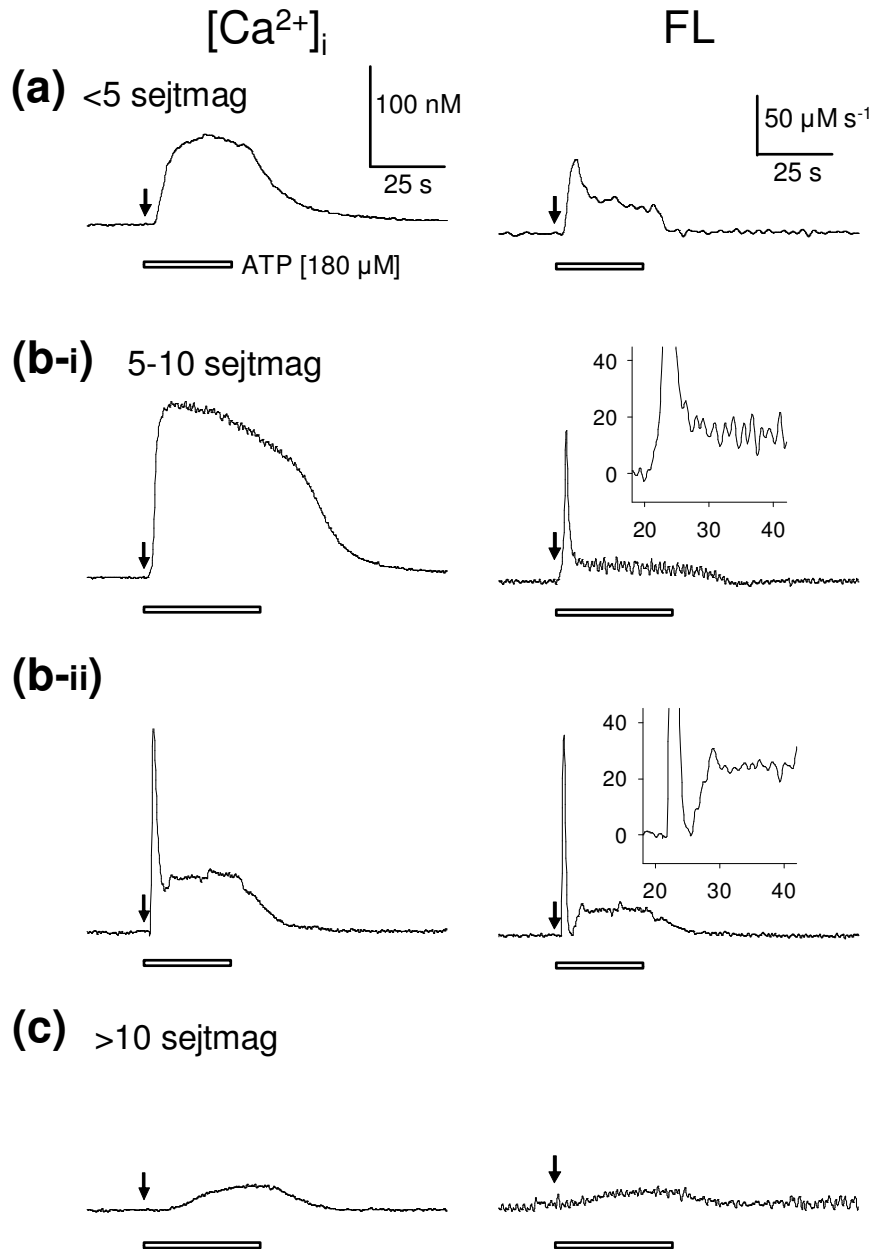
differenciálódási stádium	< 5 sejtmag	5-10 sejtmag	> 10 sejtmag
$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)	164 ± 27	264 ± 20	34 ± 9
$\text{FL}_{\text{csúcs}}$ (μMs^{-1})	72 ± 22	74 ± 13	-
$\text{FL}_{\text{plató}}$ (μMs^{-1})	17 ± 3	15 ± 4	18 ± 4
$\text{FL}_{\text{csúcs}}$ félértékszélessége (s)	$4,8 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,1$	-
a csúcs eléréséhez szükséges idő (s)	$17,0 \pm 2,0$	$2,6 \pm 0,7$	-

dott meg a nyugalmi fluxusnál nagyobb fenntartott értéken, hanem visszacsökkent a kiindulási szintre, és onnan emelkedett másodlagosan a plató fázis fluxusértékéig (18./b-ii ábra, jobb oldali grafikon). Ez a megfigyelés rámutat arra, hogy időben jól elhatárolható, független folyamatok vezetnek a korai csúcs és a késői plató kialakulásához. Az utóbbi fluxusváltozástípussal párhuzamosan jelentkező $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változásra az $\text{FL}_{\text{plató}}$ -t fenntartó folyamatok relatív késéssel történő aktiválódása miatt egy korai csúcs utáni alacsonyabb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szinten beálló egyensúly volt jellemző (18./b-ii ábra, bal oldali grafikon).

A legérettebb, 10-nél több nucleust tartalmazó sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - és fluxusgörbéjéről hiányzott a korai emelkedés és csak a késői, jóval kisebb amplitúdójú (4. táblázat) Ca^{2+} -tranzienst létrehozó $\text{FL}_{\text{plató}}$ jelentkezett az ATP hozzáadását követően (18./c ábra).

V.2.2. ATP hatása extracelluláris Ca^{2+} hiányában, illetve depolarizált sejteken

A Ca^{2+} -tranziensek és -fluxusok gyors és késleltetett fázisainak megfigyelése és az ATP által kiváltott ionáramok léte a purinerg stimulust követően aktiválódó feszültségfüggő folyamatok, továbbá ionotrop és metabotrop purinoreceptorok jelenlétét valószínűsítették. A kétféle P2 receptorcsoport funkcionális szerepének és relatív súlyának meghatározását a sejten kívüli térben lévő Ca^{2+} eltávolítását követően megmaradó sejtválasz, a feszültségfüggő komponens hozzájárulásának mértékét (a feszültségfüggő Na^+ - és Ca^{2+} -csatornák gyors inaktivációja, illetve a Ca^{2+} -ot a sejtbe befelé hajtó elektrokémiai gradiens lecsökkenése miatt) a tartósan depolarizált sejteken végzett mérések elemzésétől vártuk. Ezeket megelőzően



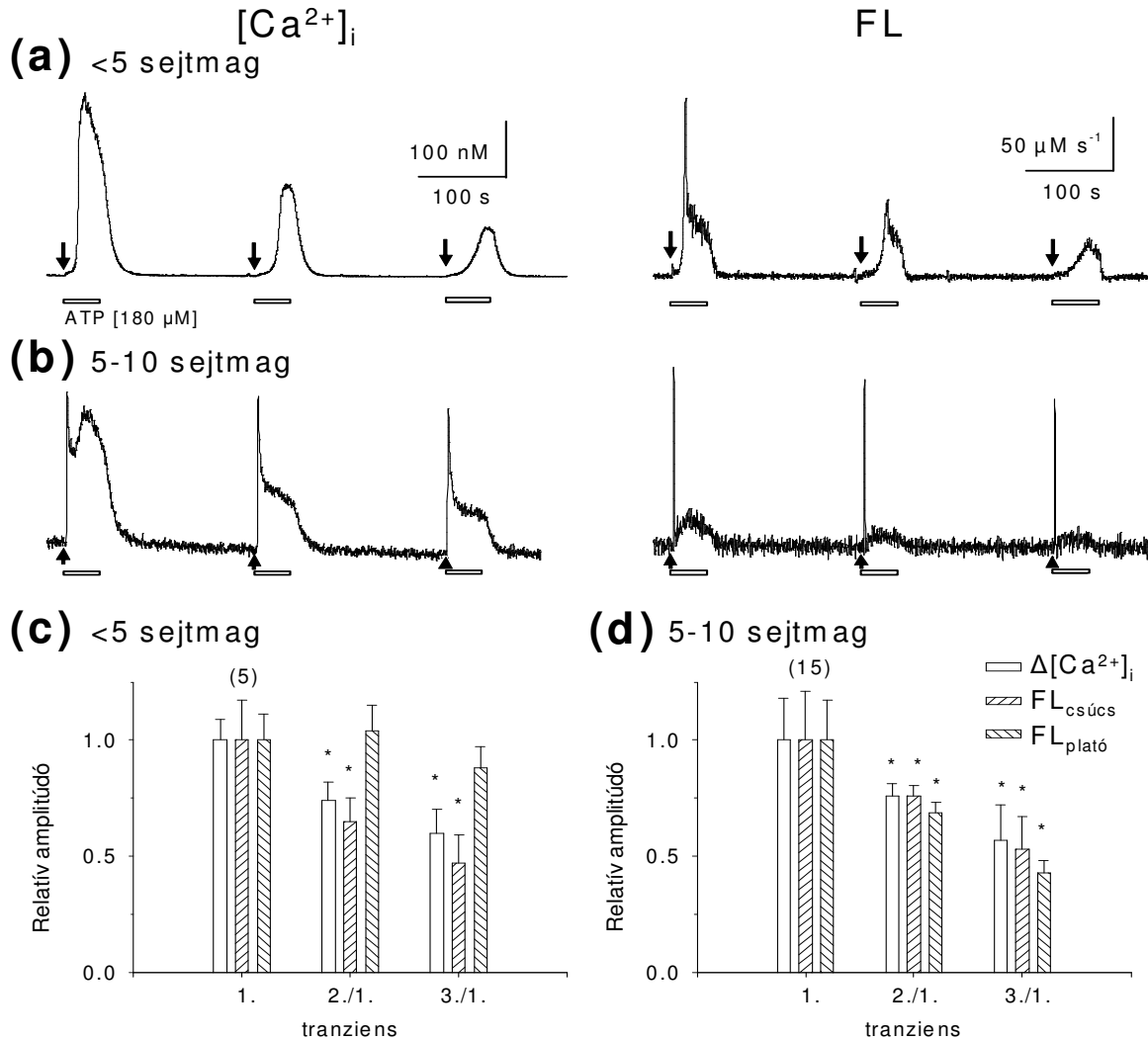
18. ábra. ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek és -fluxusok (FL) primer tenyésztett egér vázizomsejtek fejlődésének különböző stádiumaiban. (a) 180 μM ATP extracelluláris alkalmazását követő tranziens $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - (bal oldali oszlop) és FL- (jobb oldali oszlop) változások 5-nél kevesebb (a), 5-10 (b) vagy 10-nél több (c) magvú sejteken. Az a, b és c paneleken látható görbék esetében a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és az FL kiszámításához használt maximális Ca^{2+} -eltávolítási sebesség (PV_{max}) értékek rendre 138, 120, 82 és 54 nM, illetve 60, 63, 91 és 198 $\mu\text{M s}^{-1}$ voltak. Az ábra b részében látható *inzerterek* a fluxusgörbék kezdeti részét mutatják kinagyítva. Egy-egy példa látható a fluxusgörbén a korai csúcsot követő másodlagos emelkedés hiányára (b-i) és meglétére (b-ii). Az a paneleken látható skála a b és c ábrarészre is vonatkozik.

azonban – a C2C12 sejtekkel kapcsolatban már említett ok miatt – az ATP ismételt alkalmazását követő deszenzitizáció mértékét kellett felmérnünk, a primer sejtek esetében külön figyelmet fordítva az egyes fluxusváltozás-fázisok önálló módosulására.

Minthogy a legfejlettebb, 10-nél több magvú sejtek eleve igen kevésbé válaszoltak az ATP-stimulusra, ezek esetében a deszenzitizációt nem vizsgáltuk. Mind 5-nél kevesebb, mind 5-10 magvú sejteken elvégeztük azonban a kísérletsorozatot, és szignifikáns sejtválaszcsökkenést tapasztaltunk mindkét esetben, azonban a deszenzitizáció nem egyforma mértékben érintette a tranziensek és fluxusváltozások egyes részeit (19. ábra). 5-10 magvú sejtek esetében a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója az első ATP-ismétlés során átlagban 26 ± 8 , a második után pedig $40 \pm 10\%$ -kal volt kisebb, mint az első, kontroll tranziensé (19./a,c ábra). Amint az a

háttérben álló Ca^{2+} -fluxusok kiszámolása után kiderült, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban tapasztalt változásokat a fluxus két komponense közül az elsőben bekövetkezett csökkenés eredményezte. Amíg az $\text{FL}_{\text{csúcs}}$ értéke a 2. és 3. ATP-adagolás során 35 ± 10 és $53 \pm 12\%$ -kal csökkent, addig az $\text{FL}_{\text{plató}}$ változatlan maradt (statisztikailag inszignifikáns $4 \pm 11\%$ -os növekedés, illetve $12 \pm 9\%$ -os csökkenés).

Érett, 10-nél több magot tartalmazó sejtek esetében a fluxusváltozás mindkét fázisának szuppressziója vezetett az ismételt ATP-adást kísérő kalciumválasz-deszenzitizációhoz, azon-

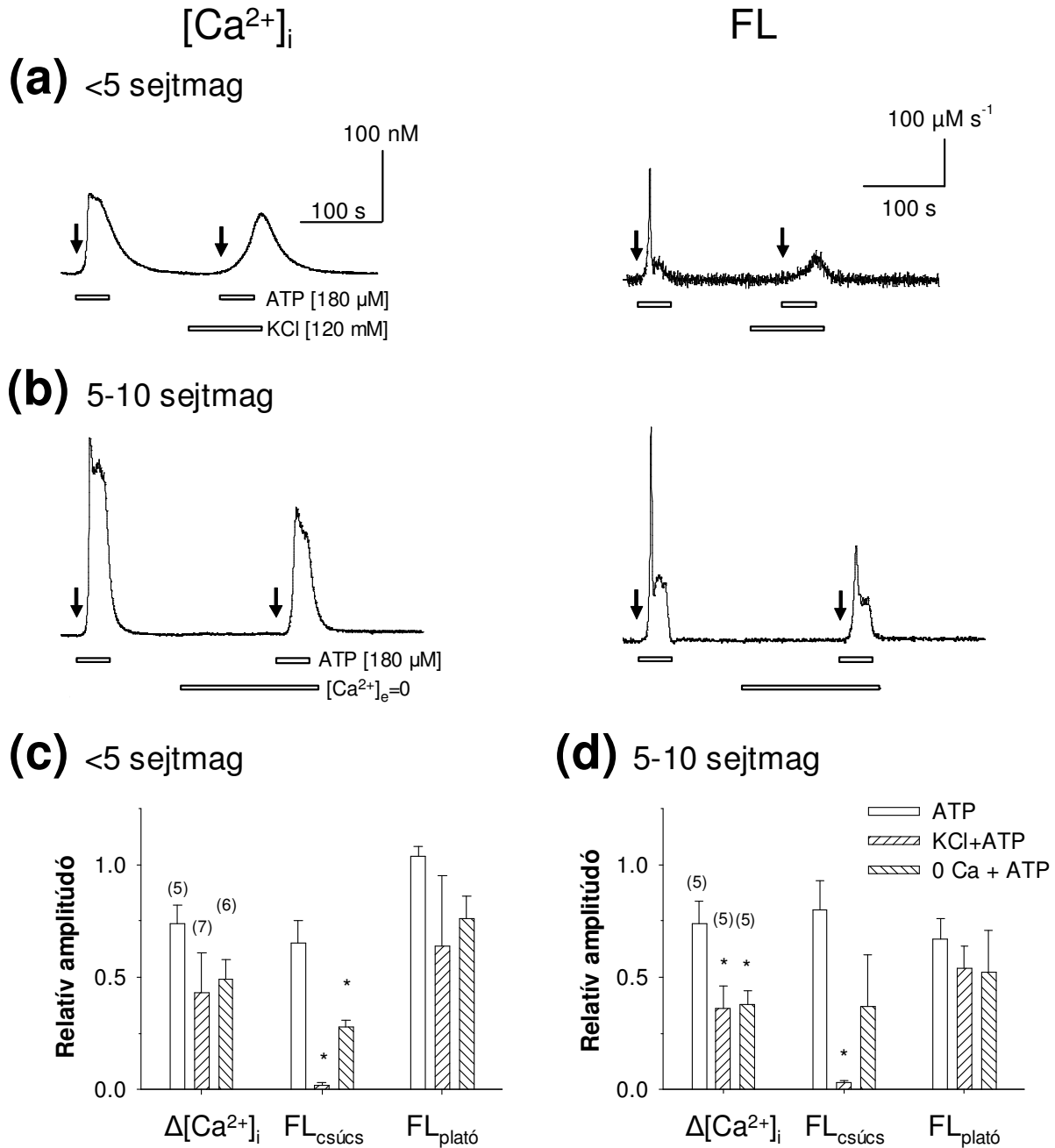


19. ábra. Ismételt ATP-adagolás hatása primer egér vázizomsejtek Ca^{2+} -tranzienseire a fejlődés különböző stádiumaiban. A reprezentatív görbék 5-nél kevesebb (a) és 5-10 (b) maggal rendelkező myotubulusokra 180 s-os mosási szünetekkel összesen háromszor, alkalmanként 40 s-on keresztül adagolt (vízszintes fehér vonalak, adagolások kezdete: nyílak) ATP $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra és FL-re kifejtett hatását mutatják. A bemutatott FL görbék kiszámításához használt PV_{max} értékek 117 (a) és $142 \mu\text{M s}^{-1}$ (b) voltak. 5 és 15 hasonló kísérlet eredményéből meghatároztuk a Ca^{2+} -tranziens amplitúdójának ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$), az FL korai fázis csúcsának ($\text{FL}_{\text{csúcs}}$) és az FL késői fenntartott fázis során mérhető FL ($\text{FL}_{\text{plató}}$) nagyságának átlagát 5-nél kevesebb (c) és 5-10 (d) magot tartalmazó sejtek esetében. Az oszlopdiagram az első ATP-adás során mért értékekre normalizált adatokat tünteti fel. A három vizsgált paraméterre 1. tranziens során kapott értékeket az értékek átlagára (1. tranziens), a 2. és 3. tranziens során kapott értékeket pedig az ugyanazon a sejten mért 1. tranziens megfelelő adataira normalizáltuk (2./1. és 3./1. tranziens). A csillag (*) az adott paraméternek az 1. tranziens megfelelő paraméterétől való szignifikáns eltérését jelzi. Az ábra a részén látható skála a b panelre is vonatkozik.

ban ez esetben a fokozatos csökkenés nagyobb mértékben érintette az $FL_{\text{plató}}$ -t (19./d ábra). Noha a korai csúcs átlagosan szintén szignifikánsan lecsökkent az első tranziens során fellépőhöz képest, legtöbbször jól elkülöníthető maradt még a 3. tranziens alatt is (19./b ábra).

Ezt követően már nem volt akadálya annak, hogy megfelelően tudjuk értékelni a depolarizált sejteken és kalciummentes külső oldatban végzendő kísérletek eredményeit. Kontroll ATP-stimulust követően a sejteket KCl-dal tartósan depolarizáltuk, majd mintegy 60 s elteltével újra ATP-t tettünk az extracelluláris oldatba (20./a ábra). 5-nél kevesebb magvú, éretlen sejteken maga a depolarizáció általában nem váltott ki Ca^{2+} -tranziens, viszont az azt követő ATP-alkalmazás csökkent amplitúdójú Ca^{2+} -választ eredményezett, ez azonban statisztikailag nem különbözött szignifikánsan a deszenzitizáció kiváltotta csökkenéstől (20./c ábra). Megnézve a háttérben álló fluxusváltozásokat azt találtuk, hogy a korai gyors komponenst a depolarizáció gyakorlatilag eltüntette, a késői lassú fázis viszont a csak deszenzitizálódott sejtek válaszhhoz képest nem volt szignifikánsan különböző. Gyakorlatilag ugyanilyen eredményre vezettek az érettebb, 5-nél több magvú sejteken végzett kísérletek azzal a különbséggel, hogy a Ca^{2+} -tranziens amplitúdójában bekövetkezett csökkenés ezen sejtek esetében már statisztikailag is szignifikáns volt (20./d ábra).

KCl-depolarizáció helyett a második ATP-stimulus előtt az extracelluláris tér Ca^{2+} -tartalmát 0-ra csökkentve (20./b ábra) a depolarizált sejteken regisztrált válaszokhoz hasonló jelenségeket figyelhettünk meg (20./c,d ábra): a külső Ca^{2+} elvonása csökkentette a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját (de csak az érettebb sejtek esetében szignifikánsan) és nem okozott jelentős csökkenést a fluxusváltozás fenntartott fázisának nagyságában. Különbség viszont a két kísérletsorozat között, hogy a külső Ca^{2+} -hiányát az $FL_{\text{csúcs}}$ mindkét esetben sokkal kevésbé „érezte meg”, 5-10 magvú sejtek esetében olyannyira, hogy nem is tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Ca^{2+} -ot is tartalmazó külső oldatban elvégzett kísérletektől. Ez arra mutat rá, hogy a Ca^{2+} fluxusa korai fázisának kialakításában fontosak ugyan a P2X receptorokon keresztül a külső térből belépő Ca^{2+} ionok, azonban a differenciálódás során mind nagyobb relatív szerephez jut az ugyanezen receptorokon keresztül kiváltott depolarizáció és az általa aktivált, a $[Ca^{2+}]_i$ megemelkedését eredményező mechanizmusok és ioncsatornák (RyR és sejtfelszíni feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák).

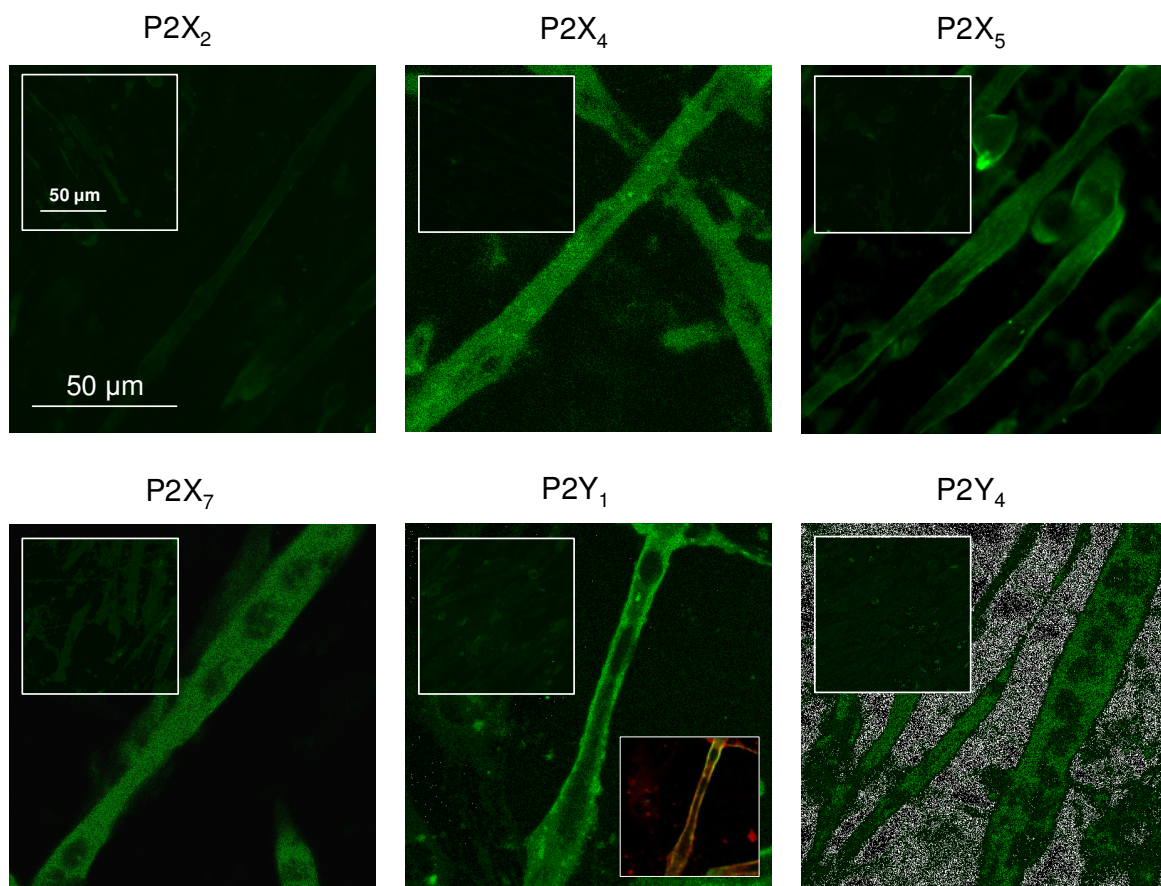


20. ábra. ATP-adagolás hatása depolarizált sejteken és az extracelluláris Ca^{2+} eltávolítását követően primer egér vázizomsejteken a fejlődés különböző stádiumaiban. (a) A $[Ca^{2+}]_i$ és FL változásai 180 μM ATP egymást követő két alkalmazása során (adagolások kezdete: nyílak) egy 5-nél kevesebb magot tartalmazó sejten. A nulkeotid második hozzáadását megelőzően és a során a *jelzett időintervallumban* a sejtet 120 mM KCl-dal depolarizáltuk. A skála a b panelre is vonatkozik. (b) Az előzőhöz hasonló kísérlet, de ez esetben a sejt 5-10 maggal rendelkezett, illetve az ATP második hozzáadása előtt depolarizáció helyett az (eredetileg 1,8 mM) Ca^{2+} -ot teljesen eltávolítottuk az extracelluláris térből. Az FL számolásánál használt PV_{max} értékek 51 (a) és 119 $\mu M s^{-1}$ (b) voltak. Több hasonló kísérletből meghatároztuk a $\Delta[Ca^{2+}]_i$, az $FL_{csúcs}$ és az $FL_{plató}$ átlagát 5-nél kevesebb (c) és 5-10 (d) magvú sejteken, majd az értékeket összehasonlítottuk azokkal a második tranziensekkel, amelyek kiváltásakor a második ATP-stimulust nem előzte meg sem depolarizáció (KCl+ATP), sem a külső Ca^{2+} elvétele (0 Ca+ATP), tehát mindössze deszenzitizáció okozta az amplitúdócsökkenést (ATP; ld. 19. ábra); a szignifikánsnak talált különbségeket csillag (*) jelzi. A feltüntetett adatok az adott sejten kiváltott első tranziens-re normalizált értékek.

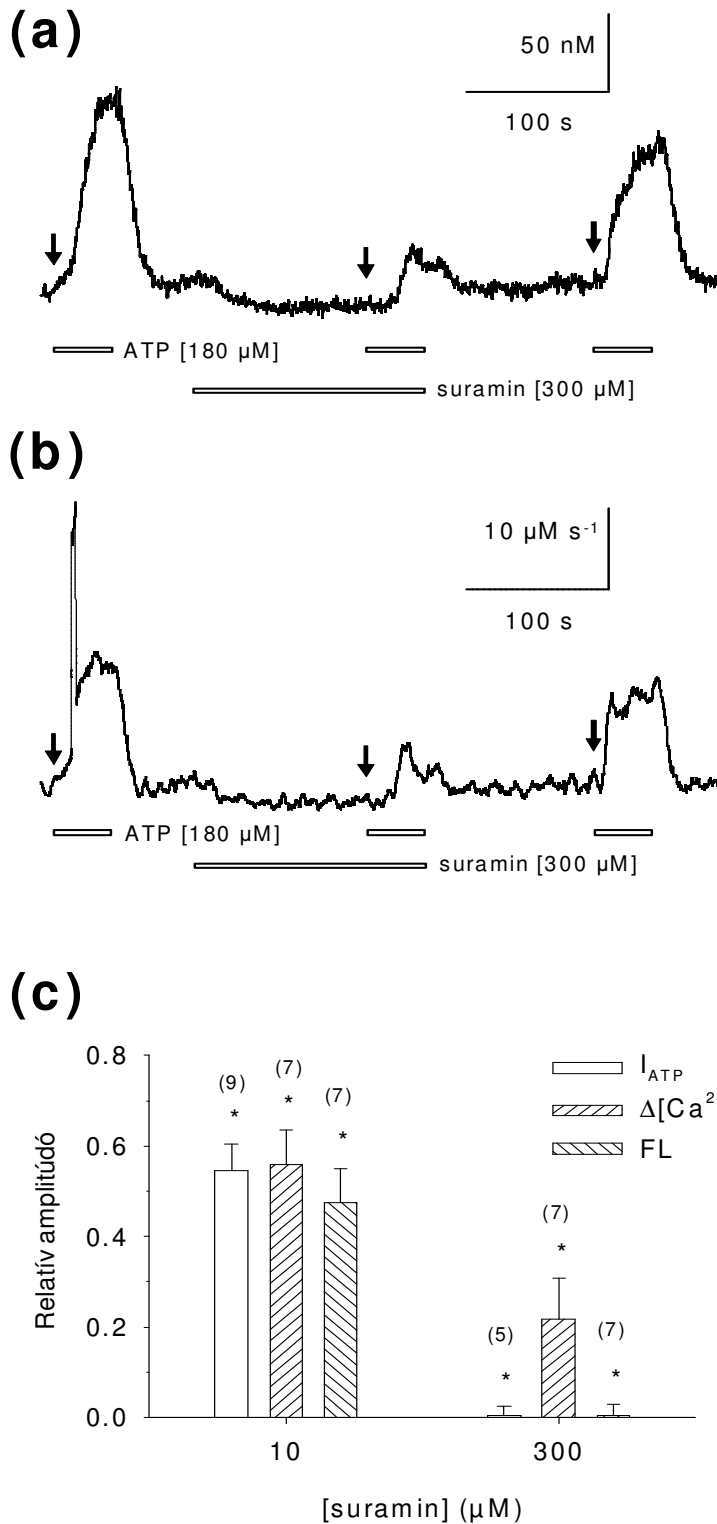
V.2.3. Az ATP-re adott bifázisos Ca^{2+} -válasz kialakításában részt vevő purinerg receptor altípusok azonosítása

Az extracelluláris Ca^{2+} ionok és a depolarizáció szerepét megvizsgálva egyértelművé vált, hogy mind P2X, mind P2Y receptorok részt vesznek az ATP-stimulust követő sejtválasz kialakításában, ráadásul előbbiek közvetlen módon, Ca^{2+} -csatornaként, és közvetve, depolarizációt indukálva is. A következőkben magától értetődően merült fel azon purinerg receptor altípusok pontos azonosításának igénye, melyek a differenciáció során bekövetkező változásokat létrehozzák és a jellegzetes bifázisos Ca^{2+} -tranziensek kialakításáért felelősek. A problémát három irányból közelítettük meg: a receptorok specifikus antitestekkel történő kimutatását, farmakológiai azonosítását, valamint molekuláris biológiai módszerrel történő inaktivációját végeztük el.

A tenyészetekben esetleg fennmaradt fibroblastoktól dezmin pozitivitásuk alapján

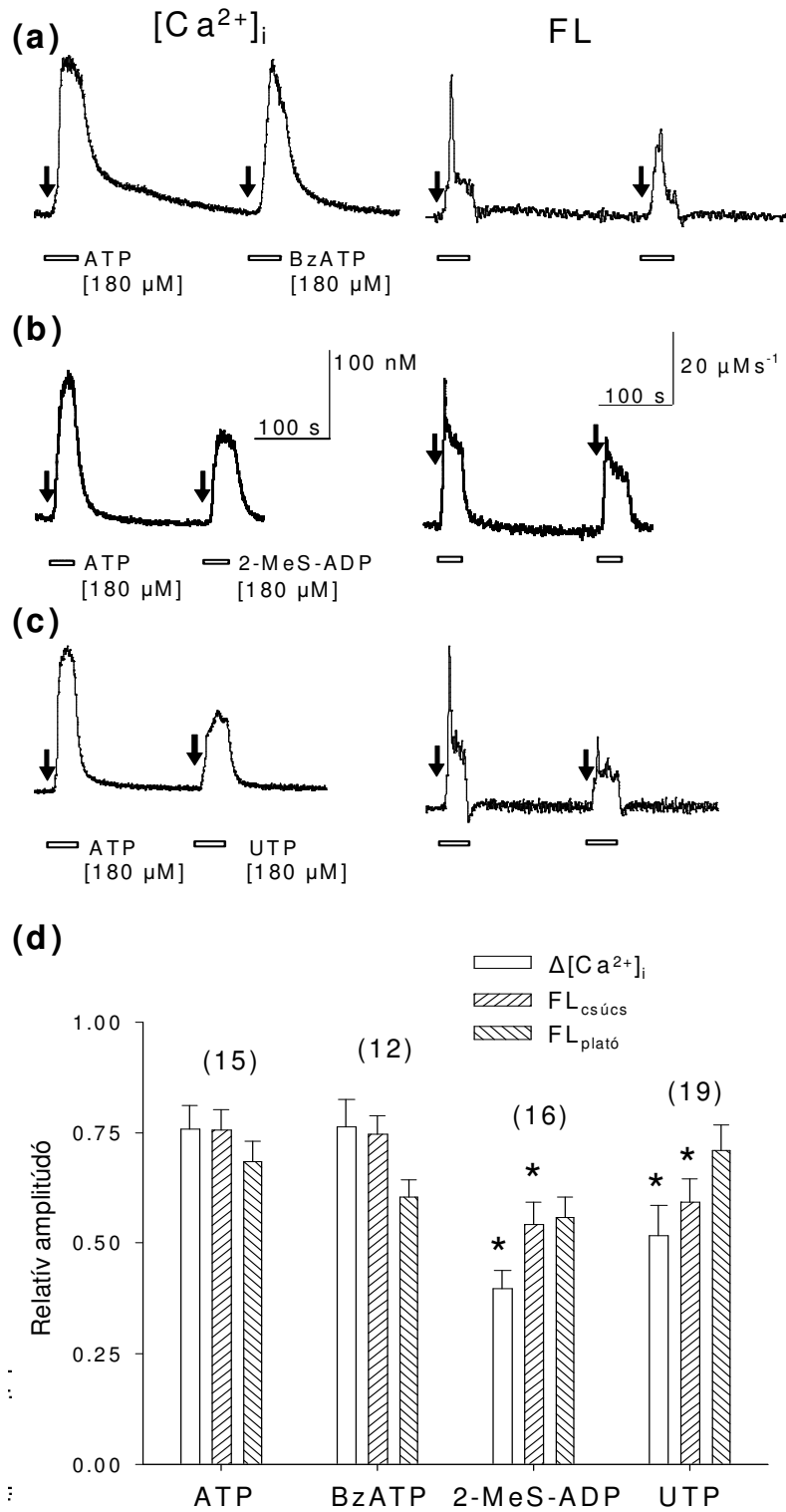


21. ábra. Primer egér myotubulusokon kifejeződő purinoreceptorok immuncitokémiai azonosítása. Az ábrán szereplő egyes festések esetében a feltüntetett purinerg receptor elleni primer (és FITC-cel konjugált másodlagos – zöld) és minden esetben dezmin elleni primer (és TR-del konjugált másodlagos – piros) antitestekkel kettős festéseket végeztünk. A fotókon szereplő minden sejt dezmin pozitivitást mutatott, mely alátámasztja miogén eredetüket, de az áttekinthetőség kedvéért a kettős jelölődésre és részleges kolokalizációra (sárga) csak egy példa szerepel a P2Y₁R festés jobb alsó inzertjében. A primer antitest kihagyásával készült negatív kontrolokat a bal felső inzertek mutatják.



22. ábra. Primer egér myotubulusokon kifejeződő purinoreceptorok farmakológiai azonosítása I.: suramin hatása. (a) 180 μ M ATP kontroll, 300 μ M suramin, majd ismét kontroll körülmények között történő adagolásának (ATP adás kezdete: nyilak) hatása a sejt $[Ca^{2+}]_i$ -jára. (b) Ugyanezen transziensből számolt FL, a $PV_{max}=140 \mu$ M s $^{-1}$ volt. (c) Hasonló kísérletekben 10 és 300 μ M suramin alkalmazása során meghatározott I_{ATP} , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ és FL értékeinek átlaga, az első, kontroll transziens megfelelő paramétereire normalizálva. Az értékeket suramin nélkül alkalmazott második ATP-stimulust követő deszenzitizált transziensek paramétereivel (ld. 19. ábra) vetettük össze, a szignifikáns szuppressziót csillag (*) jelzi.

egyértelműen elkülöníthető 5-10 magvú myotubulusokat a purinerg receptorok elleni antitestekkel festettük meg (21. ábra). A vizsgált receptor altípusok közül a P2X₄, P2X₅, P2X₇, P2Y₁ és P2Y₄ receptorok jelenlétét sikerült igazolnunk. Az ábrán nem szereplő receptorok közül a P2X₁ és P2Y₂ igen gyenge immunpozitivitást mutatott, a P2X₃ receptor teljesen hiányzott. Említésre méltó még, hogy a P2X₂ receptor, melynek jelenlétét fejlődő patkány váz-



23. ábra. Primer egér myotubulusokon kifejeződő purinoreceptorok farmakológiai azonosítása II.: specifikus agonisták hatása. (a-c) A $[Ca^{2+}]_i$ (bal oldali oszlop) és az FL (jobb oldali oszlop) változásai ATP, majd azután specifikus purinoreceptor-agonisták – BzATP, a; 2-MeS-ADP, b; UTP, c – 180 μ M-jának alkalmazását (vízszintes fehér vonalak, adagolás kezdete: nyilak) követően. A b panelen levő skála mindhárom ábrarészre vonatkozik. **(d)** Hasonló kísérletek során meghatározott $\Delta[Ca^{2+}]_i$, $FL_{csúcs}$ és $FL_{plató}$ értékek átlagai, az értékeket az adott sejten kiváltott első tranziens megfelelő paramétereire normalizálva. A specifikus agonisták által kiváltott Ca^{2+} -válaszokat azokhoz a második tranziensekhez hasonlítottuk, melyeket a nem specifikus agonista ATP hozott létre. A szignifikáns különbségeket csillagok (*) jelzik.

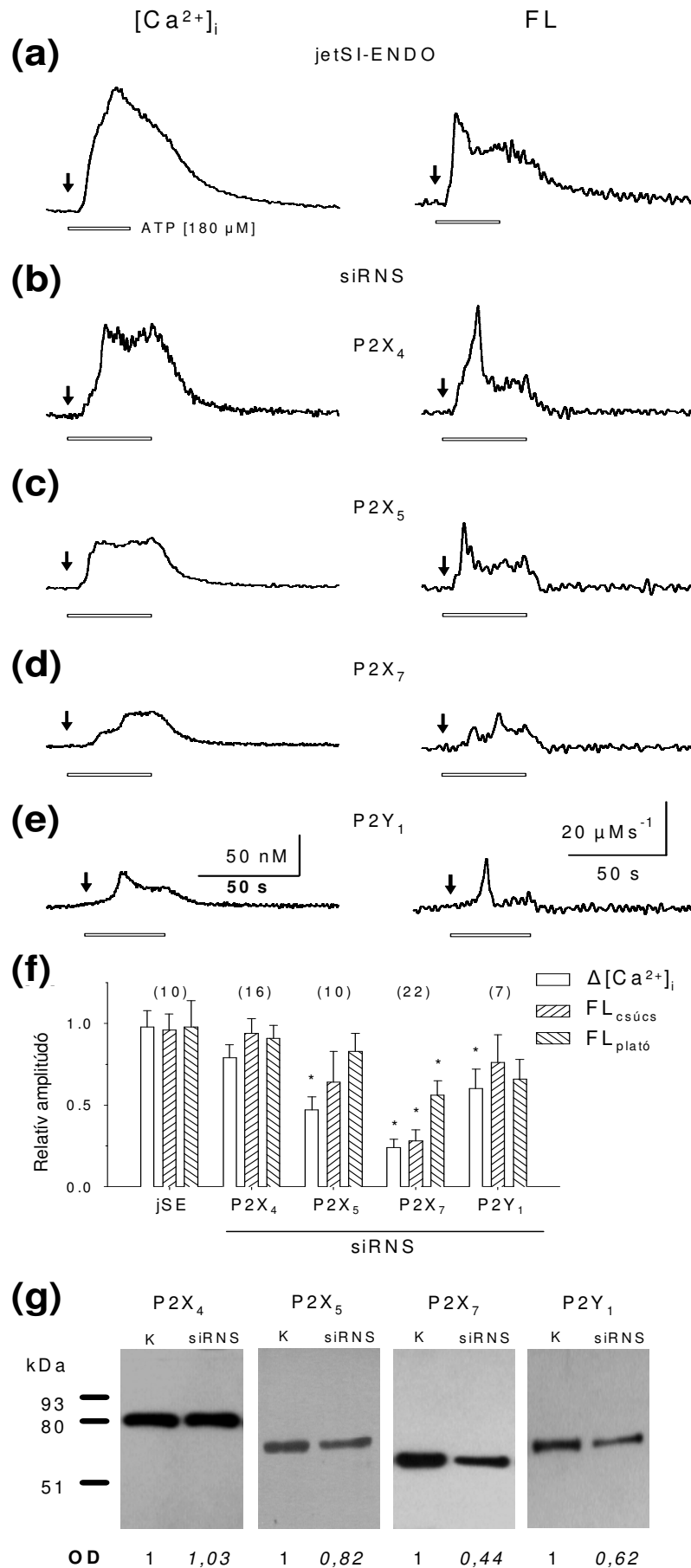
izmából kimutatták (Ryten és mtsai, 2001), az általunk izolált egér myoblastokból hiányzott (21. ábra, 1. panel).

Mivel a suramin általános P2 receptor antagonistaként ismeretes (1. táblázat; Ralevic és Burnstock, 1998), alkalmasnak tűnt arra, hogy farmakológiai vizsgálataink kezdetén segítségével elkülönítsük az ATP-stimulust követő – vizsgálataink szempontjából – aspecifikus folyamatokat a purinerg receptorok aktiválásával létrejött sejtválaszoktól. Az 1. táblázat és a 21.

ábra összevetéséből látható, hogy a suramin minden, a mi sejtjeinken megtalálható P2X receptort gátolni képes. Amint az a 22./c ábrából kiderül, 10 μM suramin csak részben, 300 μM viszont már szinte teljesen megszüntette az ATP-alkalmazást követő ionáramokat, ami azt igazolja, hogy az ATP áram- és membránpotenciál-változást kiváltó hatása mindenképpen a P2X receptorok segítségével valósul meg. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és a Ca^{2+} -fluxus megnövekedését szintén dóziszfüggő módon (22./c ábra) és reverzibilisen (22./a és b ábra) gátolta, azonban nem csökkentette 0-ra a Ca^{2+} -tranziens amplitúdóját, s mivel az egyetlen P2Y receptor, melyen a suramin hatástalan, a P2Y₄, ez bizonyítékot szolgáltat ezen receptor sejtjeinken való jelenlétére, ami egybevág immunfestésünk eredményével.

A csaknem minden P2 receptort gátolni képes suramint követően az egyes purinoreceptor altípusok specifikus agonistáinak – a P2X₇ agonista BzATP-nek, a P2Y₁ agonista 2-MeS-ADP-nek, valamint a P2Y_{2/4} agonista UTP-nek – a hatásait vizsgáltuk meg. Azt találtuk, hogy a BzATP a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és a FL mindkét fázisára hasonló hatást váltott ki, mint az ATP (23./a,d ábra). A nem deszenzitizálódó ATP-szenzitív kationcsatorna jelenlétét igazoló árammérések eredményeivel együtt (17./a ábra) ez az eredmény arra utalt, hogy a P2X₇R a tranziens korai és késői fázisának kialakításában is fontos szerephez jut. A 2-MeS-ADP-vel (23./b,d ábra) és az UTP-vel (23./c,d ábra) végzett kísérletek során a Ca^{2+} -tranziensek szignifikánsan kisebbek lettek, csakúgy, mint az FL_{csúcs}, miközben az FL_{plató} csökkenésének mértéke nem volt statisztikailag szignifikáns, ami pedig arról árulkodik, hogy a metabotrop P2Y receptorok a tranziens későbbi fázisának kialakulásáért lehetnek felelősek.

Az egyes purinerg receptorok relatív súlyát a tranziens kialakításában egy-egy receptor siRNS-sel történő inaktiválásával is megpróbáltuk felmérni. A sejteket a jetSI-ENDO transzfektáló reagenst használva a P2X₄, P2X₅, P2X₇ és P2Y₁ receptorok elleni siRNS-sel transzfektáltuk, illetve transzfekciós kontrollként csak jetSI-ENDO-val kezelt sejteket alkalmaztunk. Utóbbiakról elmondható, hogy bár némileg lassabban növekedtek a tenyészetben, mint a kezeletlen kontroll sejtek, az ATP-stimulusra adott válaszukon ez nem látszott meg, hiszen mind Ca^{2+} -tranzienseikben, mind fluxusaikban megkülönböztethetetlenek voltak azoktól a sejtektől, melyek tápoldatába nem raktunk transzfekciós reagenst (24./a,f ábra). Az egyes purinoreceptorok elleni siRNS-sel kezelt klónokból a megfelelő receptorokat Western blottal mutattuk ki, hiszen a denzitometriával meghatározott expressziósszint-csökkenés mértékének ismerete nélkül a további eredmények értelmezhetetlenek. Amint azt a 24./g ábra mutatja, a P2X₄ receptor szuppressziója nem járt eredménnyel, a P2X₅ receptor kifejeződését pedig csak kis fokban sikerült gátolni. Ezzel szemben a P2Y₁ receptor szintjét a siRNS-transzfekció közel 40%-kal, a P2X₇ receptor szintjét pedig 56%-kal tudtuk csökkenteni.

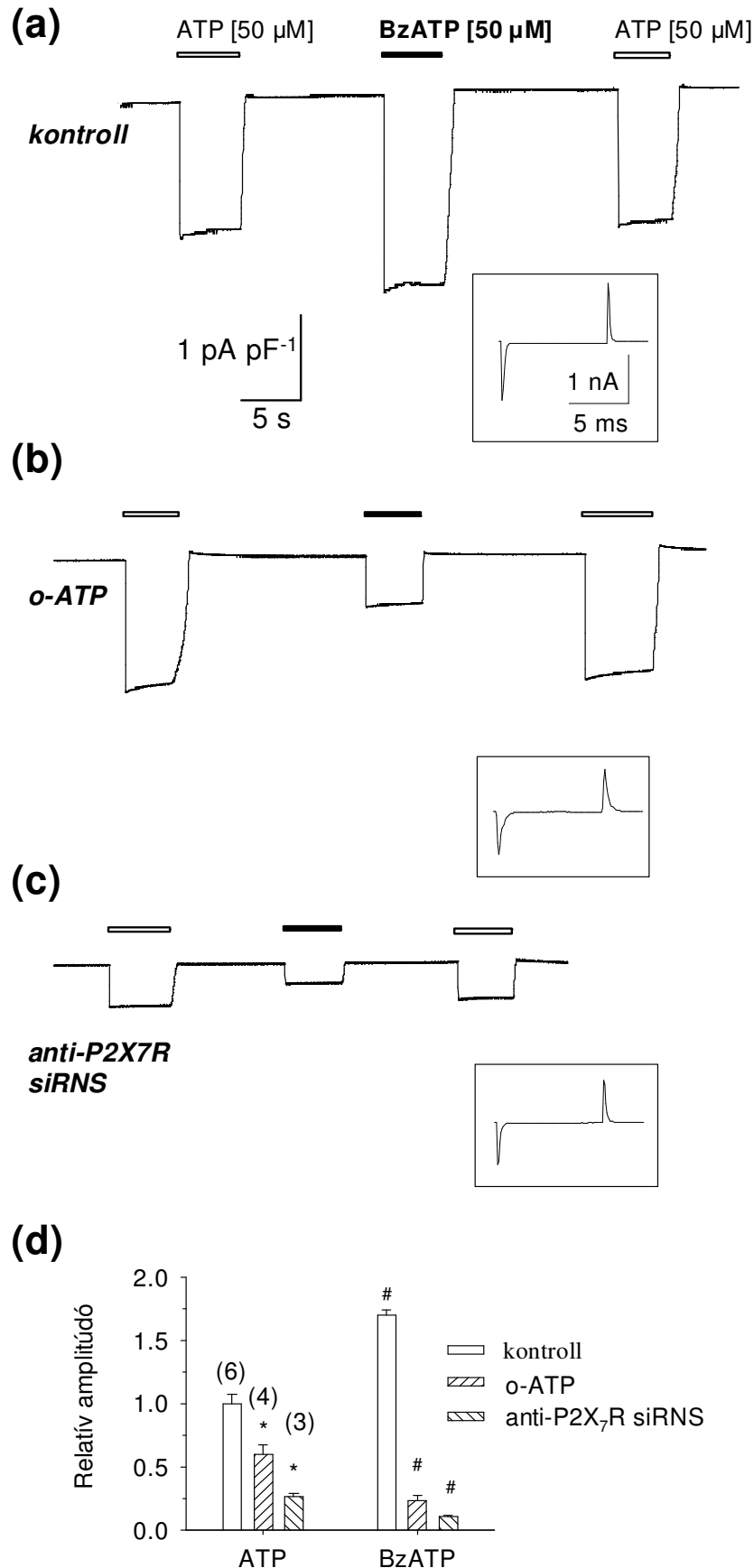


24. ábra. Primer egér myotubulusokon kifejeződő purinoreceptorok azonosítása siRNS technikával. (a-e) 180 μ M ATP hozzáadására a $[Ca^{2+}]_i$ -ban (bal oldali oszlop) és az FL-ben (jobb oldali oszlop) bekövetkező változásokat bemutató reprezentatív görbék csak jetSI-ENDO-val kezelt kontroll (a), illetve a feltüntetett purinoreceptor izoformák elleni siRNS-sel transzfektált (b-e) sejteken. Az ATP adagolásának kezdetét nyilak, időtartamát vízszintes fehér vonalak jelzik. Az ábra e részében megadott skála az a-d panelekre is vonatkozik. (f) Hasonló kísérletekből meghatározott $\Delta[Ca^{2+}]_i$, FL_{csúcs} és FL_{plató} értékek átlagai. A siRNS-sel transzfektált sejteken nyert adatokat a csak jetSI-ENDO-val (jSE) kezelt sejtek megfelelő adataira, a jetSI-ENDO-kezelt sejtek paramétereit pedig kezletlen kontroll sejteken nyert értékekre normalizáltuk. A csillagok (*) a jetSI-ENDO-val kezelt kontrollok megfelelő paramétereitől való szignifikáns eltérést jelzik. (g) Az egyes purinoreceptorok protein szintű expressziójának kimutatása Western blottal siRNS-transzfekció előtt (kontroll, K) és az adott purinerg receptor elleni siRNS-sel történő transzfekciót követően (siRNS). Az ábra feltünteteti a kontrollra normalizált optikai denzitás (OD) értékeket, illetve a felvitt minták proteintartalmának ekvivalenciáját igazoló citokróm c jelölődést is.

Ezekkel az eredményekkel egybevágunk a Ca^{2+} -mérés eredményei, hiszen az anti-P2X₄R siRNS-sel kezelt sejtek Ca^{2+} -válasza a transzfekciós kontrolltól gyakorlatilag nem különbözött (24./b,f ábra), míg a némi expressziócsökkenést mutató P2X₅ (24./c,f ábra) és P2Y₁ (24./d,f ábra) receptorok esetében a tranziensek nagysága már szignifikánsan lecsökkent. Expressziójában a legeredményesebben gátolt és a korábbi kísérletek alapján a tranziens mindkét fázisának kialakításában jelentősnek gondolt P2X₇ receptor fontos szerepét ez a kísérlet is aláhúzta: a Ca^{2+} -tranziens amplitúdója és a korai fázis alatti FL_{csúcs} értéke közel negyedére csökkent, de még a fluxus késői fázisának nagysága is megfelelőződött (24./e,f ábra).

V.2.4. A P2X₇ receptor szerepének további vizsgálata az ATP által kiváltott ionáramokban

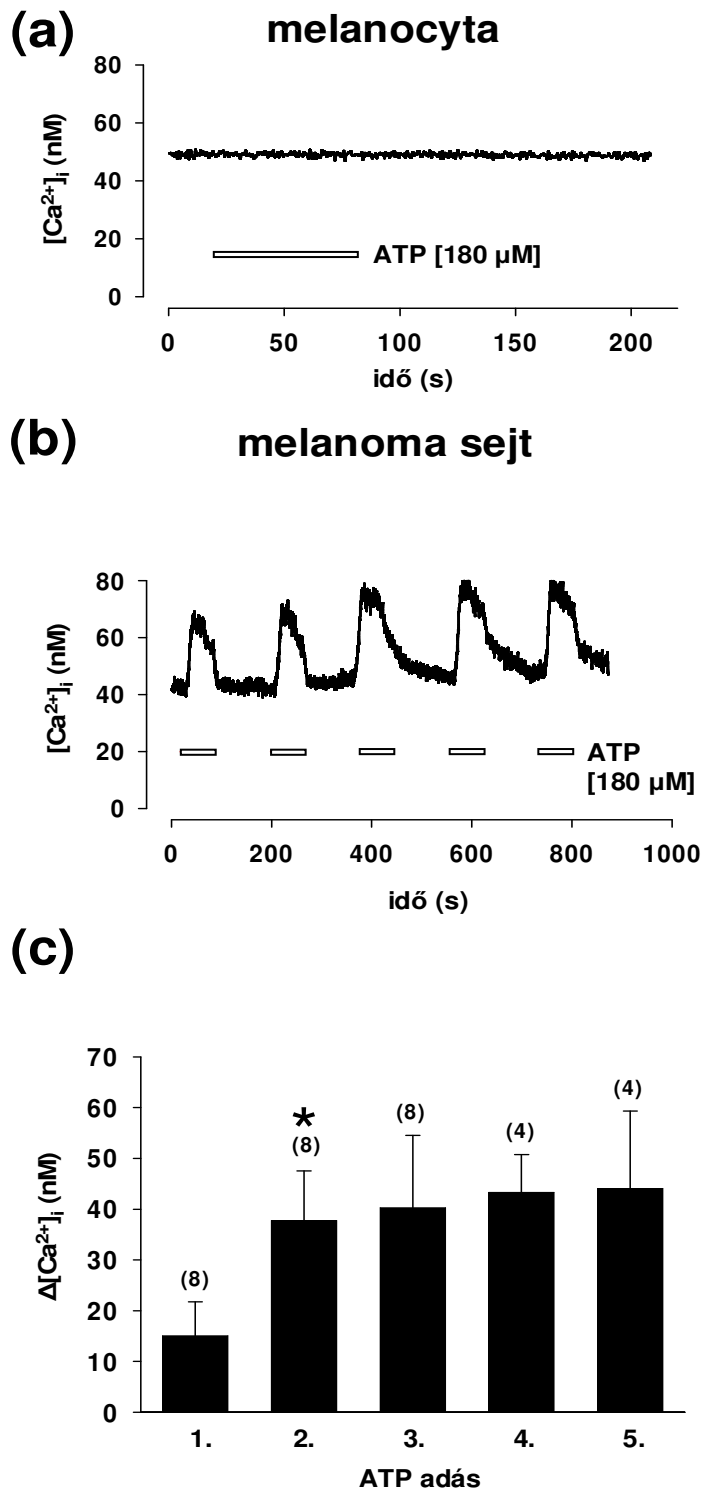
Az elvégzett kísérletekből két dolog körvonalazódott: egyrészt egér primer tenyészetekben a tenyészet korának és differenciáltsági fokának növekedésével a purinerg stimulusra adott válaszkészség egy darabig nő, majd a differenciálódás lezáródásával az ATP egyre kisebb sejtválaszt indukál, másrészt a fejlődés aktív szakaszában megjelenő ATP által kiváltott választ számos purinoreceptor együttműködése hozza létre. A harmadik megállapítás, miszerint ezen receptorok közül a sejtválasz kiváltásában az egyik legfontosabb szerep a P2X₇R-nak jut, már az eddigi eredmények alapján is valószínűnek tűnt. A receptor hozzájárulásának mértékét a P2X receptorok által mediált, ATP által kiváltott ionáram-változásokhoz egy további kísérletsorozatban kívántuk megvizsgálni. A sejteket a szaturáló ATP-dózisnál kisebb koncentrációjú ATP-vel kezeltük, majd ugyanilyen koncentrációjú, P2X₇R-specifikus BzATP-t adtunk az oldathoz, mely a kiindulási, ATP által kiváltottnál nagyobb áramot indukált (25./a,d ábra). Amennyiben a sejteket a specifikus P2X₇ antagonistával oxidált ATP-vel előkezeltük vagy a P2X₇ receptor ellenes siRNS-sel előzetesen transzfektáltuk, akkor egyrészt a fentivel megegyező koncentrációjú ATP szignifikánsan kisebb áramot hozott létre, másrészt a másodikként alkalmazott BzATP még a lecsökkent I_{ATP}-nél is kisebb válasz kiváltására volt csak képes (25./b-d ábrák). Ez az eljárás, vagyis receptor specifikus agonistájának és antagonistájának/suppressziójának kombinált alkalmazása a P2X₇R jelentőségét még kontasztabban emelte ki, hiszen amíg csak az antagonistát volt specifikus (az o-ATP esetében), ATP-stimulust követően mintegy 50%-os csökkenést tapasztaltunk az áram amplitúdójában; amikor csak az agonista volt specifikus (BzATP-stimulus összevetve ATP-stimulussal), körülbelül 50%-os növekedést tapasztaltunk; viszont – bár már az eddigi különbségek is szignifikánsak voltak – a specifikus BzATP által kontroll esetben és a P2X₇R szelektív gátlása mellett kiváltott áramok amplitúdójában igen meggyőző, 7-10-szeres különbség volt (25./d ábra).



25. ábra. A P2X₇ receptor szerepének vizsgálata primer egér vázizomsejtek ATP indukálta ionáramaiban. (a-c) Inward (befelé irányuló) ionáramok patch clamp regisztrátumai 50 μ M ATP (vízszintes fehér vonalak), BzATP (vízszintes fekete vonalak), majd ismét ATP alkalmazását követően, -80 mV-os tartó (holding) potenciál mellett. Az *inserterek* az adott sejt -10 mV-os, 10 ms-os hiperpolarizáló impulzusra adott válaszát mutatják. Az ábra *a* részében mutatott skálák a *b* és *c* panelre is vonatkoznak. (a) Egy 110 pF kapacitású, kontroll sejten regisztrál görbe. (b) Egy 79 pF kapacitású, 2 h-n keresztül 300 μ M oxidált ATP-vel (o-ATP) előkezelt sejt regisztrátuma. (c) Egy 74 pF kapacitású, a kísérlet előtt két nappal anti-P2X₇R siRNS-sel transzfektált sejten végzett mérés eredménye. (d) Hasonló kísérletekből meghatározott I_{ATP} és I_{BzATP} nagyságának átlagai a kontroll körülmények közötti első ATP-adás utáni áram nagyságára történt normalizálást követően. A csillag (*) a kontroll körülmények között mért I_{ATP} -tól, a kettős kereszt (#) az azonos körülmények között mért I_{ATP} -tól való szignifikáns különbséget jelzi.

V.3. Melanoma malignum sejtek purinerg szignalizációjának speciális sajátosságai

V.3.1. A purinerg szignalizáció megjelenése a melanomagenesis során



26. ábra. Extracelluláris ATP hatása melanocyták és melanoma sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -jára. (a) 180 μ M ATP (vízszintes fehér vonal) hatástalansága melanocytán. (b) Ismételt ATP-adások által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek egy HT168-M1 melanoma sejten. (c) Hasonló kísérletek során nyert tranziensek átlagos amplitúdói. A csillag (*) a közvetlenül megelőző tranzienstől való szignifikáns eltérést jelzi.

Az előzőekben bemutatott kísérletekkel igazolni tudtuk, hogy egyes excitábilis sejtekben (esetünkben vázizom) a fiziológias fejlődés során a differenciálódás különböző stádiumaiban és az azt megelőző korai proliferációs fázisban a sejt érzékenysége a purinerg jelzésekre folyamatosan változik. Ha a proliferáció és differenciálódás szabályozásában zavar keletkezik, a sejtek korlátlan szaporodásnak indulva daganatot hozhatnak létre. Ebből kiindulva úgy gondoltuk, a normális folyamatok szabályozásában valószínűleg részt vevő purinerg szignalizáció megváltozása részese lehet a malignus transzformációnak, mint a tumorigenesis kiváltó genetikai módosulások egyike. Hipotézisünket egészséges humán melanocyták és humán melanoma malignum sejtek összehasonlításával kívántuk tesztelni, legfőképpen azért, mert a szóban forgó vizsgálataink kezdetén (2004-ben) a melanocyták és különösen a melanoma sejtek purinerg jelátvitelére gyakorlatilag fehér foltnak számított a purinerg jelátviteli kutatások területén – annak ellenére, hogy az egyik legrosszindulatúbb és igen

terápiarezisztens, korán metasztatizáló daganatról van szó. (Jól jellemzi e betegség súlyosságát, hogy a visceralis áttétet adott esetekben értelmetlen a bevett terminológia alapján 5 éves túlélési adatokról beszélni, mert a betegek túlnyomó többsége 1 éven belül – a kemoterápia ellenére – meghal. Braunwald és mtsai, 2001) Emellett azt reméltük, hogy az ATP, mint jelátvivő molekula szerepének excitábilis (vázizom) és nem excitábilis (melanocyt/melanoma) sejtekben egyaránt betöltött fontos szerepének igazolása még jobban rámutat a purinerg szignalizáció proliferációban és differenciálódásban betöltött általános érvényű jelentőségére.

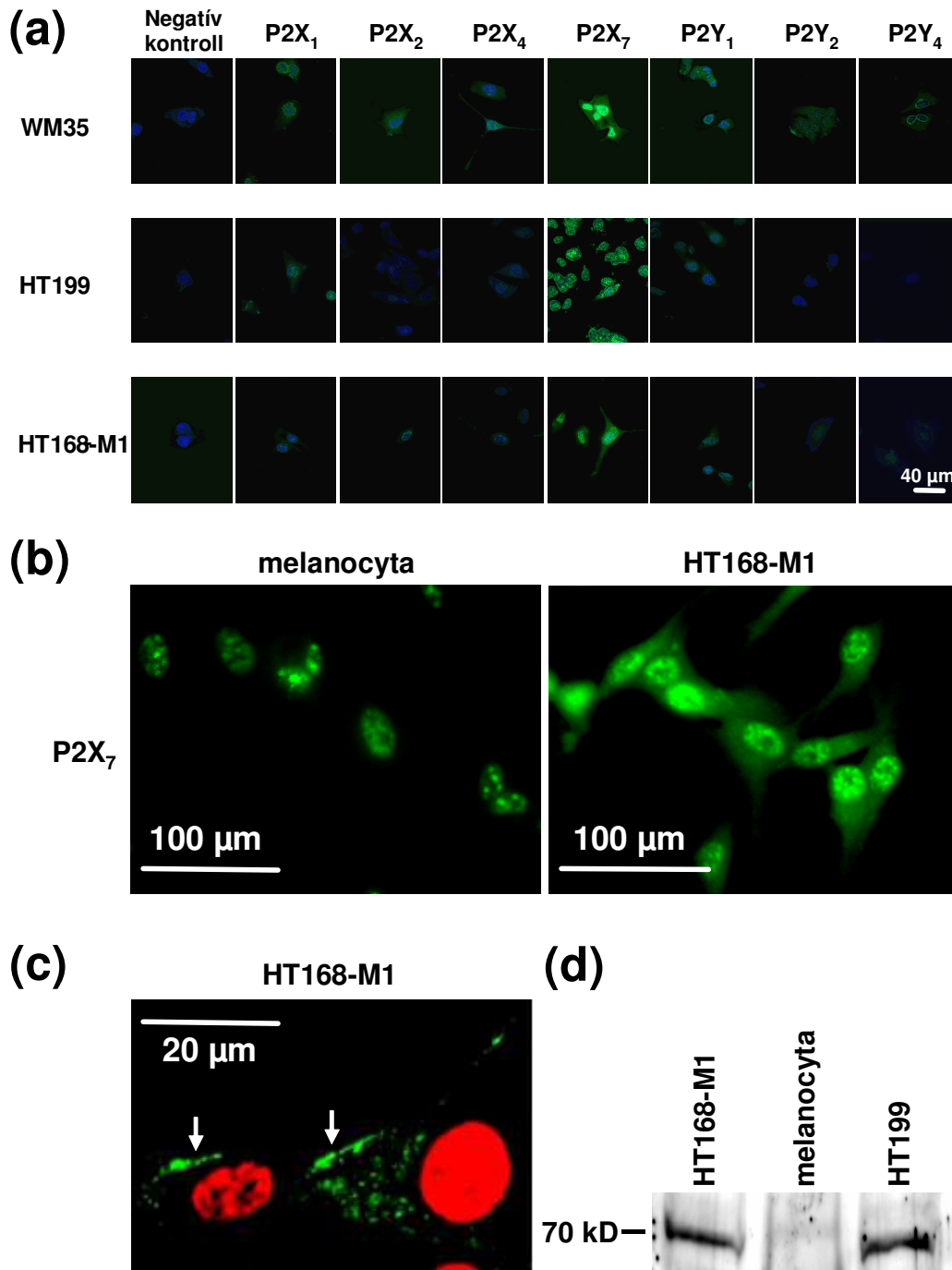
Első lépésként a melanocyták ATP-re mutatott válaszkésztségét szeretnénk volna felmérni. Több tucat sejten elvégzett próbálkozásaink egyértelműen rámutattak, hogy a melanocyták az extracellulárisan alkalmazott ATP-re nem reagálnak $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedéssel (26./a ábra). Ugyanolyan koncentrációjú ATP hatására viszont a melanoma sejtek Ca^{2+} -tranzienseket hoztak létre, melyek az agonista ismételt adagolásával deszenzitizáció nélkül újra és újra kiválthatók voltak (26./b ábra). A vizsgált sejtek jelentős része nemcsak nem mutatott deszenzitizációt, hanem kifejezetten egyre érzékenyebbé vált a stimulusra és mind nagyobb tranzienseket hozott létre (lásd még 28. ábra). Bár ez a jellegzetesség meglehetősen variábilis volt a sejtek között, elmondhatjuk, hogy a deszenzitizáció kivétel nélkül minden esetben elmaradt, és a szenzitizáció során a legnagyobb amplitúdóugrás átlagban az 1. és 2. tranziens között jelentkezett, a 2. tranziens az elsőnél átlagosan több, mint kétszer nagyobb volt (26./c ábra). Itt érdemes felhívni a figyelmet az excitábilis izom- (8., illetve 16. ábra) és nem excitábilis melanocyt/melanoma (26. ábra) sejtek ATP-re adott válaszaiban tapasztalható egy nagyságrendbeli különbségre, mely nyilvánvalóan a sejtek funkciójának és ebből adódóan Ca^{2+} -homeostasisának eltéréseire vezethető vissza (lásd még II.2.2. alfejezet).

V.3.2. Farmakológiailag normálisan működő $P2X_7$ purinoreceptor overexpressziójának igazolása melanoma sejtekben

Az ATP-re adott növekvő amplitúdójú Ca^{2+} -válaszok egyértelműen a $P2X_7$ receptor megjelenésére engedtek következtetni, ez azonban nem zárta ki más purinoreceptorok ezzel párhuzamos megjelenését is. A melanomában *de novo* megjelenő ATP-re mutatott válaszkésztség háttérében álló receptoriális változások felderítését újfent immuncitokémiai festéssel kezdtük el.

Amint azt a 27./a ábra mutatja, három melanoma sejtvonalat festettünk meg hétféle rendelkezésünkre álló purinoreceptor ellenes antitestet használva. Egyes sejtvonalak ugyan mutattak igen gyenge, az aspecifikus festődéstől alig erősebb pozitivitást néhány receptorra

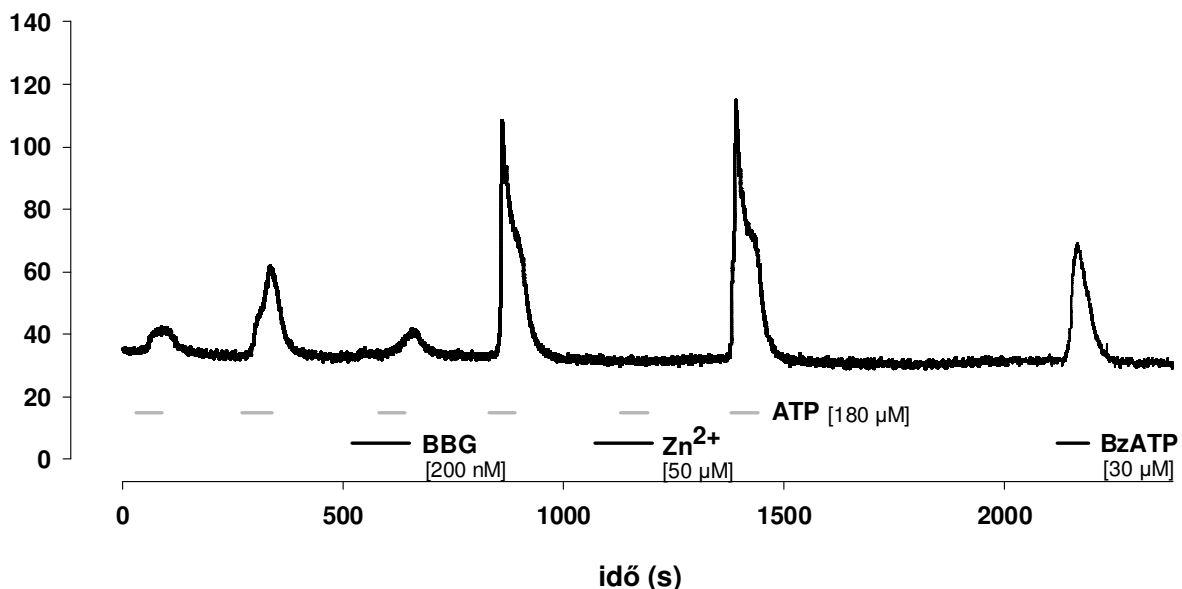
(WM35: P2X₂, P2X₄, P2Y₁, P2Y₂; HT199: P2X₁), azonban mindhárom sejtvonalban és meggyőző intenzitással csak a P2X₇ receptor bizonyult pozitívnak. Ezt követően a receptor expresszióját melanocytákban és melanoma sejtekben is összehasonlítottuk (27./b ábra). Jól



27. ábra. Melanoma sejtekben expresszáldó purinoreceptor típusának azonosítása I.: immundetekció. **(a)** A WM35, HT199 és HT168-M1 melanoma sejtvonalak immuncitokémiai festése a feltüntetett purinoreceptor altípusok elleni primer és FITC-cel konjugált (zöld) szekunder antitestekkel. A negatív kontroll a primer antitest kihagyásával készült. Magfestés: DAPI (kék). Expozíciós idő: 1 s. **(b)** Melanocyták és HT168-M1 melanoma sejtek anti-P2X₇R elleni primer és FITC-konjugált szekunder (zöld) antitesttel történt jelölése. **(c)** HT168-M1 melanoma sejtek konfokális mikroszkópos képe P2X₇R (FITC, zöld) jelölés és magfestés (propidium-jodid, piros) után. A P2X₇R citoplazmamembránbeli lokalizációját nyilak jelzik. **(d)** A P2X₇R protein kimutatása Western blottal két melanoma sejtvonalból és primer humán melanocytákból.

látható az azonos kamerabeállításokkal készült felvételek összehasonlításakor, hogy a melanoma sejtek esetében jóval intenzívebb a festődés, és ami talán még lényegesebb, a szummációs kép extranuclearis (citoplazmatikus és/vagy plazmamembrán) immunpozitivitást mutat. Ez azért fontos, mert normálisan a P2X₇R receptor funkcióját a külső membránban elhelyezkedve fejt ki. A melanocytákban és melanoma sejtekben is megfigyelhető (27./a,b ábra) nuclearis festődés okát és jelentőségét egyelőre nem ismerjük. Feltehetően az anti-P2X₇R antitest aspecifikus kötődéséről vagy a P2X₇ receptor ectopiás elhelyezkedéséről lehet szó, azonban ahhoz a normális funkcióhoz, amit a 26. ábra is bemutatott, extranuclearis festődésre van szükség. Mindazonáltal konfokális mikroszkópos vizsgálattal azt is sikerült kimutatnunk, hogy a P2X₇ receptor (cytoplasmaticus jelenléte mellett) a plazmamembránban is megtalálható (27./c ábra). Végül a melanocytákhoz képest fokozott receptorexpressziót Western blotol is igazoltuk, mely megerősítette immunfestéseink eredményeit (27./d ábra).

Tekintettel arra, hogy daganatos sejtek gyakran mutáns, és ezért disz- vagy afunkcionális fehérjéket termelnek, a következőkben szükséges volt a melanomán megjelenő P2X₇ receptor funkcionális azonosítása is. (Az ilyen vizsgálatok döntik el, hogy „legfeljebb” tumormarkerként hasznosítható, funkció nélküli molekulával van-e dolgunk, vagy egy jól meghatározott vagy remélhetőleg meghatározható funkciójú potenciális terápiás célponttal.) A receptor specifikus agonistáinak és antagonistáinak, illetve – a fentebb már tárgyalt –



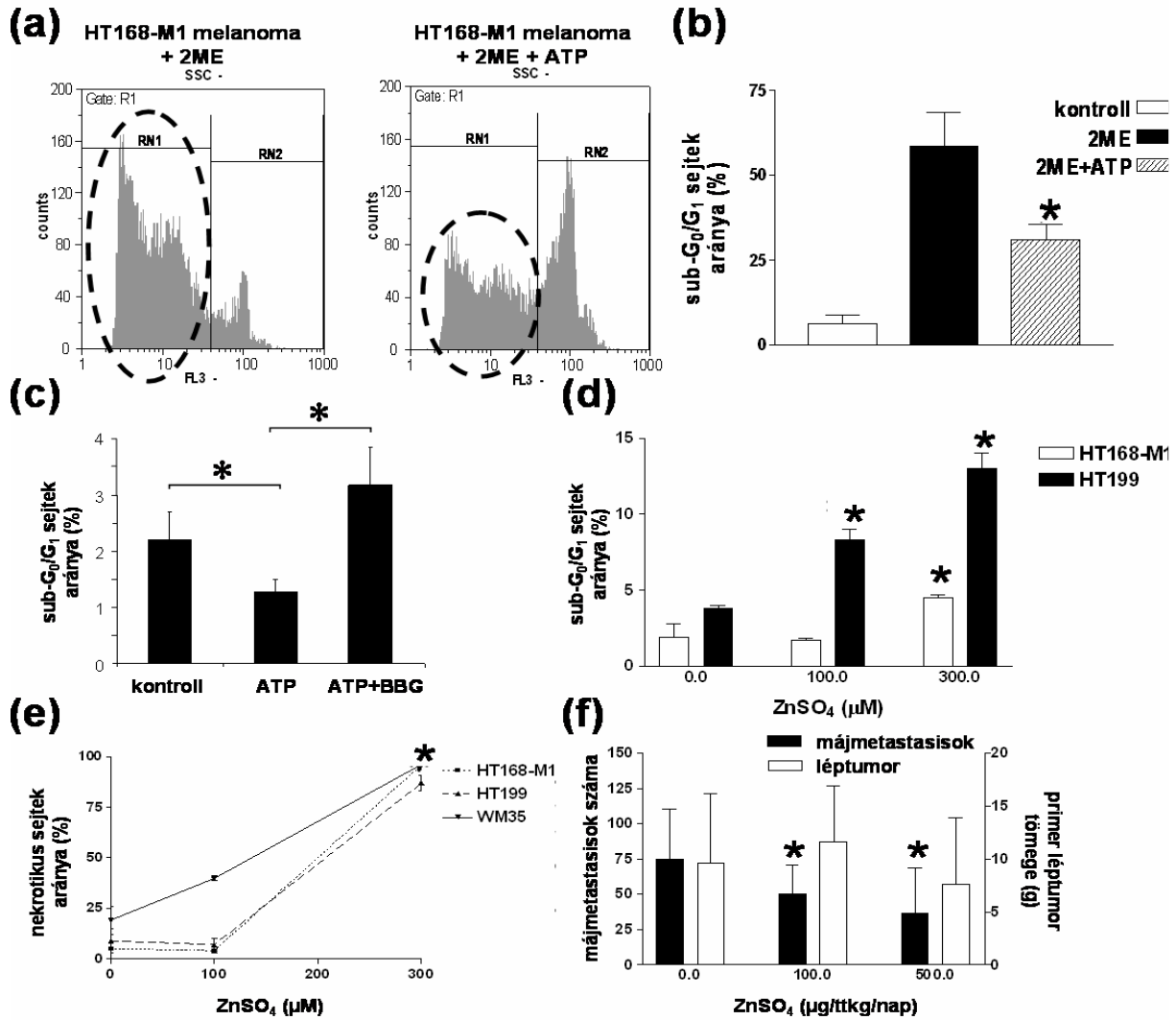
28. ábra. Melanoma sejtekben expresszáldó purinoreceptor típusának azonosítása II.: farmakológiai sajátosságok. A HT168-M1 melanoma sejten regisztrált reprezentatív görbe a P2X₇ receptor négy – a többi purinerg receptortól jellegzetesen különböző – farmakológiai jellemzőjét mutatja be. Az antagonisták hozzáadása (vízszintes fekete vonalak) által nem kísért ATP-adagolások egyre nagyobb Ca²⁺-tranzienseket váltanak ki (1). 200 nM BBG (2) és 50 μM ZnSO₄ (3) reverzibilisen gátolja az ATP által kiváltott (vízszintes szürke vonalak) [Ca²⁺]_i-növekedések létrejöttét. A BzATP egy nagyságrenddel kisebb (30 μM) koncentrációban is az ATP-re adott válaszokkal összemérhető amplitúdójú Ca²⁺-tranzienszt vált ki (4).

szenzitizációs tulajdonságainak vizsgálatait egy tipikus eredményt mutató sejt esetében a 28. ábra foglalja össze. A kísérletek alapján tehát a P2X₇ receptort funkcionálisan is sikerült a hagyományos P2X₇ receptorral azonosítanunk, legalábbis ami a [Ca²⁺]_i-ra kifejtett hatását illeti.

V.3.3. A melanoma P2X₇ receptorának hatása az apoptosissra, necrosisra és metastasisképzésre

Amint arról a dolgozat bevezetőjében már szó volt, a P2X₇ receptor mára általánosan elfogadott, mint apoptosist kiváltani képes receptor. Egy apoptosist kiváltó fehérje jelenléte korlátlanul proliferáló tumorsejteken (esetünkben a melanoma sejteken) a legegyszerűbben így magyarázható: a receptor feltehetőleg potenciálisan daganat kialakulását eredményező (vagy egyéb) sejtlelésiokat követően a károsodott sejten (esetünkben a melanocytán) jelenik meg az apoptosiss program részeként. Azok a sejtek, melyekben a program végbemegy, elpusztulnak és eltűnnek. Ha azonban egy második mutáció valamilyen módon gátolja a P2X₇R funkcióját, a sejt apoptosiss elmarad és lehetőség nyílik a tumorképződésre. Az elméletnek némileg ellentmondani látszott, hogy melanoma sejteink ATP-stimulust követően normális [Ca²⁺]_i-emelkedést mutattak, funkciójuk nem tűnt korlátozottnak, ami alapján a P2X₇R agonista ATP-től a sejtek apoptosissának indukcióját vártuk. Ennek – igen nagy meglepetésünkre – pontosan az ellenkezőjét tapasztaltuk.

Már kezdeti, tájékoztató jellegű vizsgálataink (ATP néhány napos alkalmazása a melanoma sejtek tápoldatában, majd DAPI magfestés után a fragmentált és picnoticus magvú sejtek arányának meghatározása fluoreszcens mikroszkóp alatt; itt nem bemutatott eredmények) meglepő módon arra engedtek következtetni, hogy az ATP nemhogy fokozná az apoptotikus sejtek arányát, hanem pontosan ellenkezőleg, csökkenti azt. A kérdés egyértelmű eldöntése érdekében a tenyészetekben 2-metoxi-ösztadiol segítségével apoptosist indukáltunk (Dobos és mtsai, 2004) és áramlási citometria segítségével meghatározva a sejtpopulációk sub-G₀/G₁ frakcióját pontosan megmértük az apoptotikus sejtek arányát 48 h elteltével, ezt követően pedig megnéztük, miként befolyásolja az ATP jelenléte a sejtek pusztulását (29./a,b ábra). Az eredmények egyértelműen igazolták, hogy az ATP ezekben a sejtekben antiapoptotikus hatású, hiszen a 2ME kiváltotta, 50%-nál nagyobb arányú sejtelhalást az ATP jelenléte mintegy felére csökkentette. Ugyanakkor az ATP antiapoptotikus hatását a szelektív P2X₇R antagonistá BBTG kivédte (29./c ábra). Ezt követően megnéztük, hogy a P2X₇ receptort igen potensen gátló ZnSO₄ (lásd 28. ábra) milyen hatást vált ki a spontán (nem indukált)



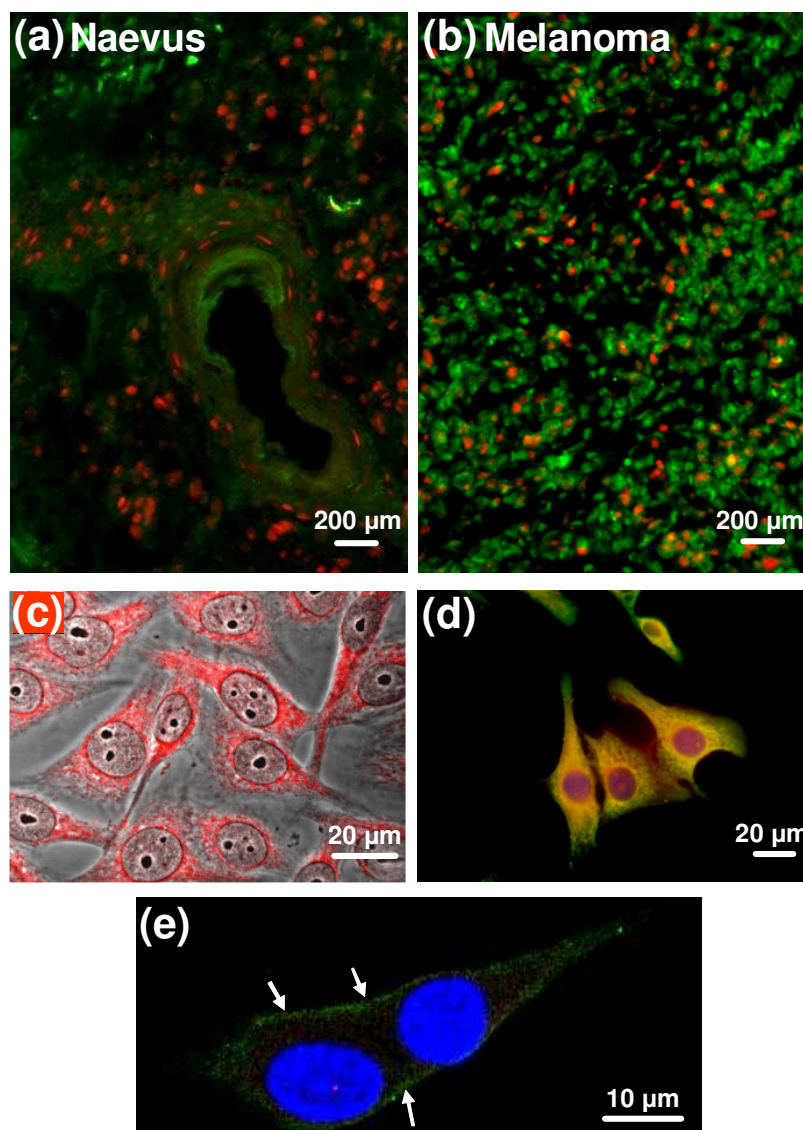
29. ábra. P2X₇ receptor agonisták és antagonisták hatása melanoma sejtek apoptózisára, necrosisára és metastasisképzésre. (a) Melanoma sejtek áramlási citometriás apoptózisvizsgálatának eredeti hisztogramjai 1 µM 2-metoxi-ösztadiol (2ME), illetve 1 µM 2ME és 180 µM ATP együttes 48 h-s alkalmazását követően. Counts: beütésszám, FL3: piros fluoreszcenciára beállított fotoelektron-sokszorozó, SSC: oldalirányú szórás (side scatter), RN1 (szaggatottan bekarikázva): sub-G0/G1 (apoptotikus) sejtekből érkező jelek, RN2: G0/G1/G2 sejtekből érkező jelek. (b) Az ábra a részén láthatóhoz hasonló vizsgálatok eredményeit összefoglaló oszlopdiagram. Kontroll: semmilyen kezelést nem kapott sejtek 48 h elteltével (spontán apoptosizrata). (c) HT168-M1 melanoma sejtek spontán apoptosizrátájának alakulása 48 h tenyésztést követően 180 µM ATP, illetve 180 µM ATP és 200 nM BBG jelenlétében. (d) HT168-M1 és HT199 melanoma sejtek spontán apoptosizrátájának alakulása 48 h tenyésztést követően 0, 100 és 300 µM ZnSO₄ jelenlétében. (e) Melanoma sejtvonalak tripánkék exklúziós teszttel meghatározott *in vitro* necrosizrátájának alakulása 0, 100 és 300 µM ZnSO₄ jelenlétében. (f) *Per os* ZnSO₄ kezelés hatása SCID egerek lépébe injektált HT168-M1 melanoma sejtek primer léptumorainak nagyságára és májmetastasisainak számára az inokuláció utáni 28. napon. A csillag (*) a b panelen a 2ME és a 2ME+ATP csoportok, a c panelen a jelzett csoportok közötti, a d, e és f paneleken pedig a ZnSO₄ hiányában kapott értékektől való szignifikáns eltérést jelzi.

apoptosis- (29./d ábra) és necrosizrátára (29./e ábra). Látható, hogy a ZnSO₄ dózisfüggő módon fokozta az apoptosist és a necrosist, ami szintén összhangban van eddigi megfigyeléseinkkel. A ZnSO₄ tehát *in vitro* daganatellenes hatást fejtett ki. Hogy képes-e ugyanerre *in vivo* állatmodellben is, SCID egerek lépébe injektált melanoma sejtek lokális daganatot létrehozó és távoli metastasist képző képességének vizsgálatával kívántuk megállapítani (lásd Anyagok

és módszerek fejezet). Az eredmények azt mutatják, hogy a *per os* alkalmazott ZnSO_4 nem befolyásolta a primer léptumor tömegét, azonban dózisfüggő módon csökkentette a kialakuló májáttétek számát (29.f ábra).

V.3.4. Rianodinreceptor-overexpresszió, -diszfunkció és RyR-P2X₇R interakció melanomában

Az eddig bemutatott kísérleteink egyértelművé tették, hogy a P2X₇ receptor Ca^{2+} -transziens kiváltására képes és e funkciójában látszólag normálisan viselkedik, ugyanakkor nyilvánvalóan – és szokatlan módon – antiapoptotikus, és a kezdeti kísérletek alapján feltehetően antinecroticus, valamint antimetastaticus hatású. Annak keresése során, hogy mi lehet a sejthalálra kifejtett fordított hatás oka, két tény ragadta meg a figyelmünket. Bennett és munkatársai 1996-ban olyan RyR 2-es izoforma overexpresszióját írták le HeLa epithelialis tumorsejtekben, mely receptor a szokásos agonistákkal aktiválhatatlan volt, ugyanakkor rianodin adagolásával az egyébként nem deszenzitizálódó, ATP által kiváltott Ca^{2+} -

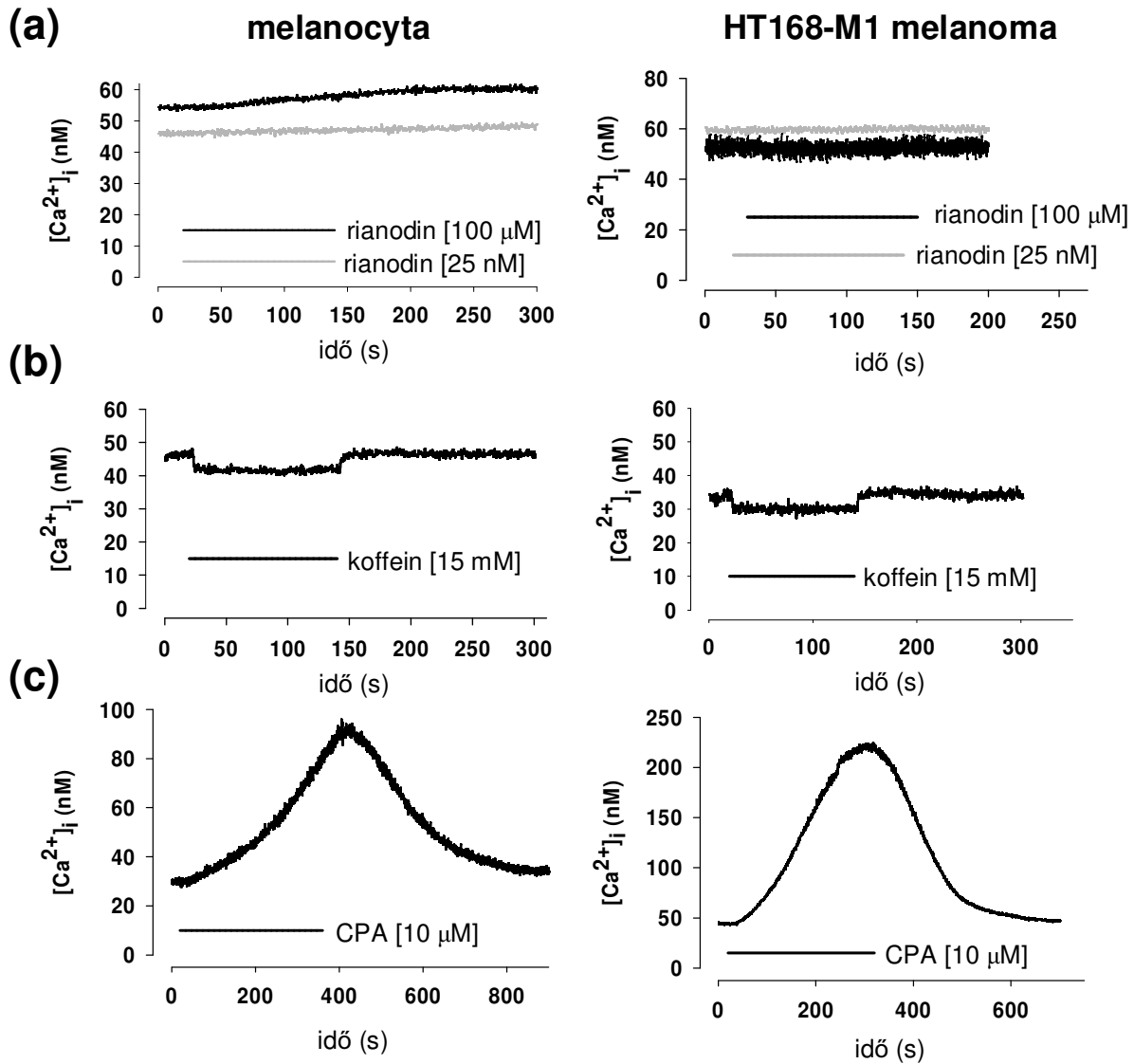


30. ábra. Rianodin receptor (RyR) jelenlétének és lokalizációjának vizsgálata melanoma sejtekben. RyR (FITC, zöld) és sejtmagok (propidium-jodid, piros) bőrből nyert naevus (a) és melanoma (b) szövet fagyasztott metszetében immunhisztokémiai festéssel történt jelölése. (c) RyR jelölése (TR, piros) HT168-M1 melanoma sejtekben immuncitokémiai festéssel. Egy-másra vetített fáziskontraszt-mikroszkópos és konfokális mikroszkópos képek. (d) RyR (FITC, zöld) és SERCA (TR, piros) kolokalizációjának (sárga) vizsgálata HT168-M1 melanoma sejtekben. Magfestés: DAPI (kék). Fluoreszcens mikroszkópos felvétel. (e) Az ábra d részénél leírtaknak megfelelően megfestett sejtek egy része konfokális mikroszkópos felvételen a citoplazmamembránra lokalizálódó zöld fluoreszcenciát mutat (nyilak).

tranziensek amplitúdói igen jelentősen csökkenthetők voltak. Ugyanakkor kollaborációs partnereink, Tímár József és munkacsoportja az OOI Tumorprogressziós Osztályán naevussejtek és az általunk is használt három melanoma sejtvonal mRNS-állományát cDNS chip segítségével összehasonlítva azt találták, hogy a vizsgált 3200 gén közül mindössze 10 volt, melyek mindhárom sejtvonalban legalább kétszeres overexpressziót mutatott, és ezek közül is a 2. helyen a RyR2 állt, további kettő pedig a RyR két ismert szabályozó fehérjéje, az FKBP12.6 és a sorcin volt. A RyR2 mennyisége a melanoma sejtekben 4,5-7-szerese volt a naevussejtekének. Felvetődött a kérdés, hogy nem a HeLa sejtekben tapasztaltakhoz hasonló jelenséggel van-e dolgunk.

Az mRNS szinten kimutatott overexpresszió qPCR technikával történő megerősítése (az OOI-ben elvégzett kísérletek, melyek eredményeit itt nem mutatom be) után a RyR2 fehérje overexpresszióját is sikerült igazolni (szintén az OOI-ben) immunhisztokémiai módszerrel (30./a,b ábra). Ezt követően a RyR2 szubcelluláris lokalizációját próbáltuk meghatározni immuncitokémiával, részben konfokális mikroszkópia, részben kettős immunfestés alkalmazásával. A konfokális vizsgálatok egy része azt mutatta, hogy a RyR2 cytoplasmaticus tubulovesicularis struktúrákhoz kötötten fordul elő (30./c ábra). A SERCA pumpával való nagyfokú kolokalizáció ezt az ER-ként azonosította (30./d ábra), ami meg is felelt várakozásainknak, hiszen a RyR az ER/SR Ca^{2+} -csatornájaként ismert. Meglepetésként ért viszont bennünket az a megfigyelés, hogy a sejtek egy részében jól láthatóan a cytoplasmamembránban ülő molekula jelölődött a RyR elleni antitest alkalmazása során (30./e ábra), ami viszont merőben szokatlan, még ha nem is teljesen ismeretlen elhelyezkedése ennek a receptornak (v.ö. II.3.2. alfejezet).

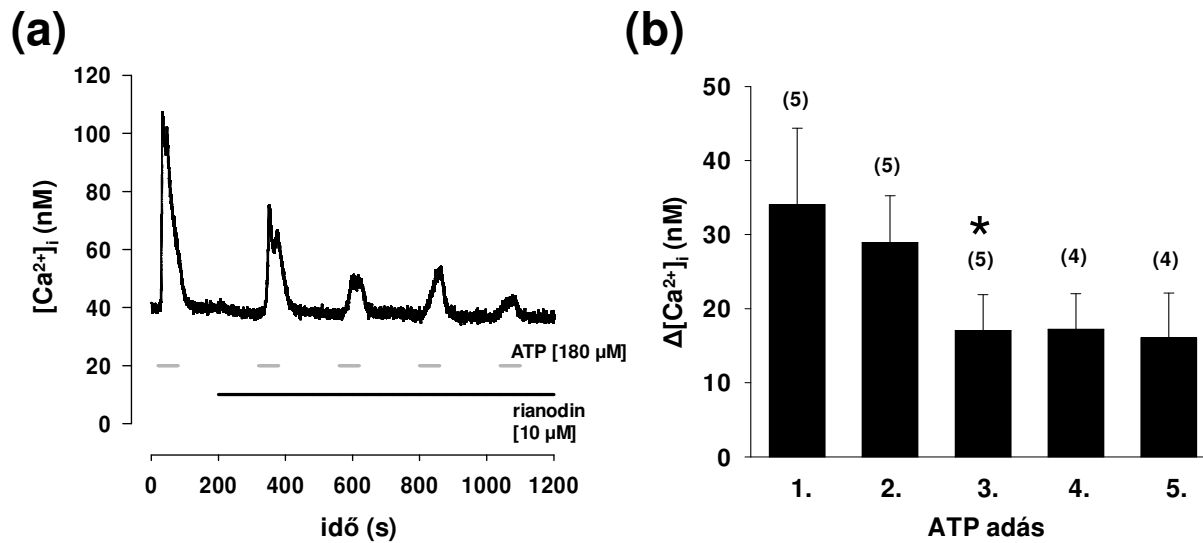
A RyR fehérje overexpressziójának kimutatása és lokalizációjának feltérképezése után a receptor funkcionális tesztelését végeztük el melanocytákon és melanoma sejteken. A számos koncentrációban kipróbált rianodin (melyek közül a 31./a ábra csak kettőt, egy normálisan aktiváló, és egy nagyobb, már általában gátló koncentrációt mutat be) mindkét sejttypuson ineffektívnek bizonyult, csakúgy, mint a koffein (31./b ábra). A receptor aktiválhatatlanságát azonban addig nem modhattuk ki, amíg be nem bizonyosodott, hogy a melanocyták és a melanoma sejtek egyáltalán rendelkeznek-e raktározott és felszabadítható Ca^{2+} -mal. A SERCA pumpa CPA-val történő gátlása során azonban a kompenzálatlanul maradó, raktárakból történő Ca^{2+} -csorgás $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -növekedést eredményezett, ami kizárta, hogy a Ca^{2+} -raktárak üresek lennének (31./c ábra).



31. ábra. Rianodin receptor agonisták hatása melanocyták és melanoma sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -jára. Sem 25 nM, illetve 100 μ M rianodin (a), sem 15 mM koffein (b) nem változtatja meg sem a melanocyták (bal oldali oszlop), sem a melanoma sejtek (jobb oldali oszlop) $[Ca^{2+}]_i$ -jét. (Megfigyelhető viszont a koffein autofluoreszcenciájából származó, $[Ca^{2+}]_i$ -csökkenést utánozó ismert műtermék.) (c) 10 μ M ciklopiazonsav (CPA) mindkét sejtípuson $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést vált ki.

Vagyis eddigi eredményeink kísértetiesen hasonlítottak Bennett és munkatársai megfigyeléseihez: diszfunkcionális RyR2-overexpresszió nem deszinzitizálódó ATP-választ mutató tumorsejtekben. (Emellett ráadásul melanoma sejtjeinkben a P2X₇R atípusos hatása az apoptosusra.) Megismételtük tehát Bennették tíz évvel korábbi kísérletét abban bízva, hogy esetleg az abnormálisan működő (pontosabban nem működő) RyR2 lehet az a molekula, amely a P2X₇ receptor működését módosítja. A 10 μ M koncentrációjú rianodin, melyről nem ismert, hogy a purinerg receptorok bármelyikével is közvetlen kapcsolatba lépne, az ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek kialakulását szignifikánsan gátolta (32. ábra). Ez mindenképpen felveti a RyR2 és P2X₇R valamilyen kölcsönhatásának és az utóbbi receptoron keresztül ki-

váltott sejtválaszok (mint például a Ca^{2+} -jel és az apoptózis) előbbi általi módosításának lehetőségét.



32. ábra. A rianodin csökkenti a melanoma sejtek ATP-re adott Ca^{2+} -válaszát. (a) Egy HT168-M1 melanoma sejt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jának változásai 180 μM ATP ismételt adagolásai (vízszintes szürke vonalak) hatására, 10 μM rianodin jelenlétében (vízszintes fekete vonal). (b) Több hasonló kísérlet során kapott egymást követő Ca^{2+} -tranziensek átlagos amplitúdói. (V.ö. 25b,c ábrák, ugyanez a protokoll rianodin alkalmazása nélkül.) A csillag (*) a megelőző tranziens amplitúdójához viszonyított szignifikáns csökkenést jelzi.

VI. Megbeszélés

VI.1. C2C12 sejtek purinerg szignalizációjának változásai a differenciálódás és proliferáció során

VI.1.1. Változások szérumban indukálta differenciálódás (SID) során

Amint azt a C2C12 egér vázizom sejtvonal differenciálódása során végzett kísérleteink megmutatták, az izom fejlődése során a sejtek válaszkészsége az extracelluláris ATP-re egyre fokozódik, majd a $[Ca^{2+}]_i$ változásai a legérettebb sejtekben kvalitatív változáson is keresztülmennek, a Ca^{2+} -tranziens bifázissá válik. Tudva azt, hogy a PKC α által kiváltott differenciálódás során hasonló típusú purinerg válasz alakul ki, mint a SID végeredményeként megjelenő bifázisos válasz késői, lassú komponense, ugyanakkor az igen gyors első fázis hiányzik, mindenképpen érdemesnek tűnt meghatározni, milyen mechanizmusok állnak az egyes fázisok hátterében. A KCl-depolarizációval kiváltott tranziensek paramétereivel való nagyfokú egyezés rámutatott, hogy az érett sejtek esetében feltehetőleg az ATP-adagolás is a feszültségfüggő folyamatok, Na^+ -csatornák aktiválásával, akciós potenciál kiváltásával, a sejt-felszíni L-típusú Ca^{2+} -csatornákon keresztül belépő, és főképpen a DHPR aktiválta RyR-en keresztül az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} -ionok révén emeli meg a $[Ca^{2+}]_i$ -szintet a tranziens első fázisa során. Ezt a mechanizmust támasztotta alá a primer tenyészetek – más időbeliséggel megjelenő, de morfológiailag hasonló – Ca^{2+} -szint változásainak áram- és membránpotenciálmérésekkel történő részletes elemzése is (lásd később). Valójában tehát nem az vár megválaszolásra az eredmények ismeretében, hogyan is jön létre a gyors fázis a differenciáció végére, hanem az, hogy miért nem jelenik meg már korábban. A kérdés különösen azért merül fel joggal, mert a legkézenfekvőbb magyarázatot, vagyis azt, hogy a sejtek válaszkészsége a depolarizáló impulzusra szintén csak a differenciálódás végére jelenne meg, eredményeink egyértelműen cáfolják, hiszen már 5 napos myotubulusok közel maximális választ produkálnak KCl alkalmazását követően, a feszültségfüggő folyamatok tehát már több nappal a bipoláris válasz megjelenése előtt érettek, a feszültség-szenzorok érzékenyek.

Ismert, hogy a vázizomsejtek membránpotenciálja a differenciálódás előrehaladtával egyre negatívabbá válik, ezt a tényt az irodalmi adatok mellett (Kidokoro, 1975) saját méréseink (17./c-ii ábra) is megerősítették, bár ezeket a méréseket primer tenyésztett, nem pedig a szóban forgó C2C12 sejteken végeztük. Mindazonáltal feltételezhetően hasonló hiperpolarizáció történik a fejlődésük során, ami viszont felveti, hogy esetleg korai és középső fejlett stádiumban a sejtek oly mértékig depolarizáltak lehetnek, hogy a feszültségfüggő

Na⁺-csatornák jelentős része tartósan inaktív és az ATP által kiváltott elektrotónusos depolarizáció emiatt nem képes az akciós potenciál kiváltására, ugyanakkor tartós KCl-depolarizáció hatására a DHPR és a RyR közvetítésével Ca²⁺-tranziens jön létre.

Abban is biztosak lehetünk, hogy a gyors fázis elmaradásáért a 9. fejlődési napig nem a belső Ca²⁺-raktárak éretlensége a felelős. 7 napos sejteken ugyanis extracelluláris Ca²⁺ hiányában is olyan Ca²⁺-tranzienseket tudtunk kiváltani mind ATP-vel, mind KCl-depolarizációval, melyek csak alig voltak kisebbek a külső Ca²⁺ jelenlétében kiváltott válasznál, egyértelműen igazolva, hogy már ebben a fejlődési stádiumban lehetséges jelentős mennyiségű Ca²⁺ felszabadítása az SR-ből akár az IP₃R-on, akár a RyR-on keresztül.

Végezetül a legkézenfekvőbb magyarázatot az jelenti, hogy a P2X receptorok száma nem elegendően nagy a 9. nap előtt ahhoz, hogy rajtuk keresztül a sejtet az akciós potenciál küszöbéig depolarizálni képes nagyságú inward áram folyjon. Erre utal az is, hogy a fejlődés során a Ca²⁺-tranziens amplitúdója egyre nő, majd egy bizonyos nagyságot elérve bifázisossá válik (persze az összefüggés nem szoros, hiszen a metabotrop P2Y receptorok jelenléte, illetve a CICR miatt a Ca²⁺-tranziens amplitúdója nem egyenesen arányos a P2X receptorok számával és a rajtuk keresztül kiváltott depolarizáció mértékével, még az akciós potenciált kiváltáshoz szükségesnél kisebb elektrotónusos potenciálváltozás esetében sem).

A fenti gondolatmenetet követően tulajdonképpen várható volt, hogy az érett myotubulusokon valamely P2X receptor jelentősen nagyobb mennyiségben lesz kimutatható, mint a fejlődés kezdetén tartó myoblastokon. Az immuncitokémiai és Western blot vizsgálatok ezt igazolták is: az érett sejtek közel 4-szer annyi P2X₇ receptort expresszálnak (15. ábra). Emellett a differenciálódás során a P2X receptorok jelen levő izotípusaiban nagymértékű arányeltolódás is jelentkezett, hiszen a P2X₇R említett expressziófokozódását a P2X₄R szintjének tizedére csökkenése kísérte. Valószínűleg azonban az előbbi receptor nem deszenzitizálódó jellege, illetve már korábban is fokozottabb jelenléte miatt ezek a változások a P2X receptor mintázatban összességében mégis az ionotrop ATP receptorokon keresztül kiváltható áramok növekedését eredményezték.

Érdekes megfigyelésünk volt a purinerg receptorok expressziós mintázatával kapcsolatban, hogy a P2Y₂ receptor szintjének negyedére csökkenését a differenciálódás kezdetén hiányzó P2Y₄ receptor kifejeződésének „bekapcsolása” kísérte. Ez az a két receptor, melyek legfontosabb agonistája az UTP. Az UTP proliferációt serkentő hatását szatellitasejtenyészetben már kimutatták (Ryten és mtsai, 2002), jelen eredményeink pedig – minthogy a sejtek az egyik UTP receptor szintjének csökkenését a másik szintjének növelésével kompen-

zálják – felvetik annak lehetőségét, hogy az extracelluláris UTP szintjének érzékelése fontos információtartalommal bírhat a differenciálódás során is.

VI.1.2. Változások PKC α overexpresszió kiváltotta differenciálódás (PKCID) során

Kísérleteink kezdetén megerősítettük, hogy a PKC α izoenzim overexpressziója fokozza a dezmin, a vázizom egyik differenciációs markerének az expresszióját és ezzel párhuzamosan csökkenti a proliferációt, összhangban korábbi kísérletek eredményeivel (lásd II.3.3. *alfejezet*). A purinerg és depolarizáló stimulusokat követő sejtválaszokban a PKCID során bekövetkező változásokat megvizsgálva azt találtuk, hogy a feszültségfüggő folyamatok funkcionális fejlődése a SID során tapasztaltakhoz hasonlóan alakult, a korai fejlődési stádiumban a sejtek inszenzitívek voltak KCl-ra, majd később ugyanilyen ingerre gyors és nagy Ca²⁺-tranzienseket hoztak létre. Az ATP-re adott válasz ezzel szemben két igen lényeges szempontból is különbözött a SID folyamán látottaktól: egyrészt a SID végállapotában megjelenő bifázisos válasz második komponenséhez hasonló nagyságú és kinetikájú purinerg válasz jelent meg már a 2. tenyésztési napon, másrészt viszont a 9. napon a gyors fázis megjelenése elmaradt és a tenyésztés során a 2. napot követően kialakult Ca²⁺-tranziens a továbbiakban már sem jellegében, sem nagyságában nem változott tovább. Nyilvánvaló, hogy a PKC α overexpressziója lehetségessé tette, hogy a purinerg jelátvitel még azelőtt nagyfokú fejlettséget érjen el, mielőtt a feszültségfüggő válasz megjelent volna, viszont az is vitathatatlan, hogy később, amikor már a feszültségváltozásokat érzékelni és azokra reagálni képes apparátus rendelkezésre állt, nem kapcsolódott egymáshoz a purinerg és a depolarizáció vezérelte szignalizáció. A KCl-re való válaszolás képességének jelenléte igazolja, hogy a feszültségfüggő folyamatok készen álltak, csak a purinerg stimulus nem volt elég erős az aktiválásukhoz. (Ugyanakkor a PKC α overexpressziója a nyugalmi Ca²⁺-szintet és az SR Ca²⁺-mal való feltöltöttségét sem befolyásolta, a raktár SERCA-blokkoló CPA-val való kiürítéskor bekövetkező Ca²⁺-szint emelkedés ugyanakkora volt kontroll sejtekben, mint a transzfektált klónokban. Az erre az eredményre vezető kísérleteket a dolgozatban nem mutattam be.) A PKC α excesszív sejten belüli jelenléte elméletileg két módon csökkentheti a purinerg jelet: a purinerg receptor expressziójának és/vagy funkciójának gátlásával (metabotrop P2Y receptorok esetében a PKC hatása persze lehet posztreceptorális is, azonban egy metabotrop receptor szerepe gyors feszültségfüggő folyamatok aktiválásában valószínűtlen, amint azt a primer sejtek bifázisos tranzienseinek elemzésénél is látni fogjuk).

A PKC α -t overexpresszáló sejtekben akkor, amikor az ATP kiváltotta válasz már maximális volt, a purinerg receptorok mintázata alig változott meg, leszámítva a P2X₄ receptor expressziójának drasztikus csökkenését, mely a differenciálódást kiváltó stimulus jellegétől függetlenül (SID vagy PKCID) kísérni látszik a nagyobb purinerg válasz megjelenését. A többi vizsgált receptor szintje viszont csak kisebb változásokat mutat. Lehetséges, hogy a P2X₇ receptor nagyfokú expressziónövekedésének elmaradása eredményezi az akciós potenciál kiváltásának hiányát, ugyanakkor a kisebb emelkedés a P2X₇ és P2Y₂ receptorok szintjében már elegendő a gyors fázis nélküli, nagy amplitúdójú Ca²⁺-tranziens megjelenéséhez. A rendelkezésünkre álló adatok birtokában azonban azt sem zárhatjuk ki, hogy egy, a vizsgálatainkban nem szereplő P2 receptor altípus expressziója emelkedik meg. Ha ez így is van, akkor is valószínűbb, hogy ez egy metabotrop receptor, mert a gyors fázis hiánya vitathatatlan.

Másik lehetőségként a purinoreceptorok PKC α -túlműködést kísérő funkcionális változásai állhatnak a SID-hez képest megfigyelt különbségek hátterében. A legkézenfekvőbb feltételezés, hogy a PKC α a P2 receptorok foszforilációjával módosítja azok működését. Ez a feltevés nem is alaptalan, hiszen a P2X receptorok mindegyike rendelkezik az intracelluláris domainjén egy PKC foszforilációs hellyel (Boue-Grabot és mtsai, 2000; Liu és mtsai, 2003). Tekintetbe kell venni azt is, hogy a PKCID során a PKC α megjelenésén kívül a szérumszint mennyiségének és minőségének SID során bekövetkező megváltoztatása is elmarad, ami szintén hozzájárulhat a purinoreceptorok funkciójának módosulásához. Ismeretes ugyanis, hogy a szérumszint megváltoztatása a Rho GTPáz család egyes tagjain keresztül (RhoA, Rac1, CDC42) közvetlenül aktivál egy „szérumra érzékeny faktor” (SRF) nevű transzkripciós faktort, mely SRE nevű DNS kötőhelyeihez kapcsolódik, amelyek az izomdifferenciálódáshoz szükséges gének közül számos promoterében (például c-fos, egr-1, nur77, α -aktin, miozin nehéz lánc, izom kreatin-kináz) megtalálható (Hill és mtsai, 1995; Selvaray és Prywes, 2003). Az SRF-et számos egyéb foszforilációs hely és kináz mellett a 162-es szerinen a PKC α tudja foszforilálni, ami az SRF-SRE kapcsolódást módosítja (Iyer és mtsai, 2006). A szérumszint megváltozásának elmaradása és a PKC α overexpressziója együttesen bonyolult programokat indíthatnak be, melyek az izom differenciálódását, ezen belül pedig a purinerg szignalizáció – SID-től különböző – módosulását eredményezhetik.

Mindent egybevetve a számos bizonytalan tényező ellenére kimondhatjuk, hogy a SID és a PKCID során a feszültségfüggő mechanizmusok látszólag hasonló, a purinerg folyamatok viszont jelentősen eltérő fejlődésen mennek keresztül. Az utóbbi során az ATP-re való válaszolás képessége korábban megjelenik, viszont a későbbiekben elmarad a purinerg és a fe-

szültségfüggő jelátviteli utak összekapcsolódása. Ezen változások háttérében purinoreceptor-expressziós és -működési különbségek állhatnak.

VI.1.3. Változások PKC δ overexpresszió kiváltotta proliferáció során

A PKC δ myoblastokban való túltermeltetése az egymást kölcsönösen kizáró proliferáció és differenciálódás közül mind a dezminexpresszió, mind az élő sejtek számának meghatározása alapján az előbbi útján indította el a sejteket. ATP-re a sejtek még igen idős tenyészetek (9 napos) esetében sem válaszoltak, ami azt igazolja, hogy a proliferáció felgyorsulása ez esetben nem a purinerg szignalizációs útvonal közvetítésével valósult meg. Az a tény, hogy ezekben a kizárólag proliferáló izomprekurzor sejtekben a vizsgálataink tárgyát képező két jelátviteli útvonal, a feszültségvezérelt és a purinerg közül egyik sem fejlődött ki az idő előrehaladtával, indirekt módon azt igazolja, hogy e két szignalizációs rendszer – okként vagy okozatként – valóban a sejtek specifikus szövettípusá, vázizommá való differenciálódásának beindulása során jut szerephez.

VI.2. Primer tenyésztett egér vázizomsejtek purinerg szignalizációjának változásai a differenciáció és proliferáció során

VI.2.1. A bifázisos Ca²⁺-tranziens jelentősége

Az egér primer sejtek Ca²⁺-tranzienseinek alakulását elemezve a differenciálódás előrehaladtával azt a megállapítást tehetjük, hogy a myoblast sejtvonala *in vitro* megvalósítható differenciálódása valahol ott ér véget, ahová a primer szatellitasejtek rövid idő után már eljutnak: ezek a sejtek már néhány magvú myotubulusként bifázisos válaszokat hoznak létre ATP-stimulust követően, melyek kezdeti gyors komponense ugyan eleinte lassabb, azonban közepesen fejlett sejteken már a legfejlettebb C2C12 sejteknél megismert igen gyors és nagy amplitúdójú fellövéssel indul a tranziens (és a Ca²⁺-fluxus változása is) és ezt követi a fenntartott komponens. A fejlődés azonban a primer sejtek esetében nem áll meg. Amikor a tenyészetek annyi idősekké válnak, mint a legérettebb C2C12 sejtek (kb. 9 napos korukban), a meredeken felszálló első fázis eltűnik, és a legnagyobb izomcsövek és -rostok csak jóval kisebb és lassabb ATP által kiváltott [Ca²⁺]_i-változásokat hoznak létre. Úgy tűnik tehát, hogy az ATP az izomdifferenciálódáshoz (-regenerációhoz) csak átmenetileg szükséges, mint jelátvivő molekula, a folyamat lezárultával háttérbe szorul – feltehetően párhuzamosan egy elképzelt izomsérülés során elpusztult sejtekből az extracelluláris térbe jutó ATP mennyiségének fokozatos csökkenésével. Úgy gondoljuk, hogy ez az utolsó fázis marad el az előzőekben bemutatott

immortalizált sejtvonal differenciálódása során, de az sincsen kizárva, hogy ugyanez az involúció ott is bekövetkezne némileg később, csak a technikai lehetőségek és az izom kontraktilis jellege (emiatt pedig a tenyészetek felválása és elpusztulása) nem teszik lehetővé ezen stádium tanulmányozását. Igen valószínű, hogy a Ca^{2+} -tranziens egyes fázisai során, illetve abban a stádiumban, amikor a nagyobb fokú $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -növekedések a tranziens elején már elmaradnak, más-más jellegű folyamatok indulnak be, hiszen a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ különböző szintjei változatos üzeneteket és utasításokat közvetítenek a sejtnak. Ezért úgy gondoltuk, hogy a tranziens két fázisát kialakító folyamatokat érdemes görcső alá venni azon túlmenően is, amit a C2C12 sejtek kapcsán már tárgyaltunk.

VI.2.2. A Ca^{2+} -tranziens korai, gyors fázisa

A 9 napos C2C12 sejtek Ca^{2+} -tranzienseinek gyors korai fázisának kinetikai paraméterei olyan nagyfokú hasonlóságot mutattak a KCl-depolarizációt követő tranziens hasonló paramétereivel, hogy önmagában ez is igazolta, hogy a két jelenség hátterében azonos folyamatok állnak. Mindazonáltal a primer tenyésztett sejteken áramméréseket is végeztünk, melyek szintén igazolták, hogy ATP alkalmazását követően jelentős inward kationáram jön létre ezen sejtek cytoplasmamembránján keresztül, mely olyan fokú membránpotenciál-változást indukál, mintegy -40 mV-ra depolarizálva a sejteket, ami képes aktiválni a feszültségfüggő Ca^{2+} - és Na^+ -csatornákat, akciós potenciált hozva létre annak minden sejtélettani következményével együtt. A feszültségfüggő csatornák gyors komponens során betöltött szerepét támasztja alá az is, hogy KCl-dal elődepolarizált sejteken, vagyis az ioncsatornák inaktívan tartása mellett az ATP-stimulus szelektíven az $\text{FL}_{\text{csúcs}}$ -os szüntette meg és az $\text{FL}_{\text{plató}}$ -t érintetlenül hagyta. Amint azt a hosszan fenntartott ATP-adagolás mellett sem csökkenő I_{ATP} jelzi, az akciós potenciálnak nem a purinerg receptorok deszenzitizációja vet véget, ami egyrészt – még a receptortípusok pontos azonosítása előtt – valószínűtlenné tette sejtjeinken a P2X_1 és P2X_3 receptorok I_{ATP} -hez való jelentős hozzájárulását, hiszen ezek az altípusok néhány száz ms alatt deszenzitizálódnak. A gyors komponens alatti áramért éppen ezért főként a P2X_7 receptor a felelős, mert ugyan az 1-es és 3-as P2XR altípusok kivételével egyik P2X receptor sem deszenzitizálódik gyorsan, viszont az általunk alkalmazott több 10 s-os agonistaalkalmazás a $\text{P2X}_7\text{R}$ kivételével mindegyik altípuson általában már jelentősen csökkent áramokat eredményez (North, 2002).

A Ca^{2+} -tranzienst tehát a feszültségfüggő Ca^{2+} - (T- és L-típus) és Na^+ -csatornák terminálják inaktiválódásukkal. Részben ez, részben az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} RyR-re ki-

fejtett negatív feed-back hatása vezethet a Ca^{2+} -tranziens és -fluxus korai komponensének csökkenéséhez. Ez megmagyarázza az 5-nél kevesebb magvú és az 5-10 magvú sejtek tranzienseinek paramétereit között talált különbségeket (4. táblázat). A myotubulusok éretlenebb formái még lassú, főleg Ca^{2+} -belépésen alapuló akciós potenciáljait a fejlődés során az izomrostok Na^+ -alapú, gyors akciós potenciáljai váltják fel (Cognard és mtsai, 1993). A gyorsabb kialakulás és a gyorsabb inaktiváció eredményezi a fejlettebb myotubulusok tranzienseinek látványosan meredekebb kezdeti felszállását és szignifikánsan keskenyebb első fázisát. Ehhez még hozzájárul, hogy a differenciáltabb sejtekben a Ca^{2+} -raktárak is fejlettebbek, nagyobb tranziensamplitúdót, de egyúttal hamarabb gátlás alá kerülő CICR-t is eredményezve.

Felmerül a kérdés, hogyan vezet ez a fejlődés végeredményben pont a legfejlettebb myotubulusok és izomrostok esetében a korai komponens eltűnéséhez. A feszültségfüggő és purinerg folyamatok változásai mellett a nyugalmi membránpotenciált meghatározó ionkonduktanciák is módosulnak a fejlődés során oly módon, hogy a membránpotenciál mind negatívabb lesz. Ezzel párhuzamosan a kezdeti fokozódás után a sejteken ATP-vel kiváltható ionáramok nagysága csökken. Méréseink tanúsága szerint amíg 5-10 magvú sejteken -60 mV-ról kiindulva az ATP 20 mV-os depolarizációt tudott létrehozni és -40 mV-ra hozta a sejteket, addig 10-nél több magvú sejtek esetében átlagosan -75 mV-ról kiindulva kellett volna a sejteket az akciós potenciál küszöbéig depolarizálni egy olyan ATP-stimulusnak, mely valójában alig 5 mV-tal tudta pozitívabbá tenni a MP-t. Ez nyilvánvalóan az akciós potenciál és a Ca^{2+} -tranziens korai fázisának elmaradásához vezet.

VI.2.3. A Ca^{2+} -tranziens késői, fenntartott fázisa

Az ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranziens késői komponensét és az $\text{FL}_{\text{plató}}$ -t három tényező hozhatja létre: feszültségfüggő folyamatok, melyek a fenntartott fázis során is aktívak maradnak, P2X, valamint P2Y receptorok. A feszültségfüggő folyamatok ebben a fázisban jelentős szerepet nem képesek betölteni. Ezt igazolják a fentebb már említett kísérleteink, amikor a KCl-depolarizációval inaktivált sejteken is változatlan nagyságú $\text{FL}_{\text{plató}}$ -t számoltunk, de az irodalmi adatok is arra utalnak, hogy minden szóba jöhető feszültségfüggő folyamat inaktiválódna legkésőbb a depolarizáció kezdete utáni 10 . másodpercre. A T-típusú csatorna gyorsan inaktiválódik (Perez-Reyes, 2003), de még az L-típusú csatornán sem folyik áram néhány másodperc után, és a DHPR-RyR tengely is inaktív a 10 . másodpercre (Ursu és mtsai, 2001). Ha mindehhez hozzátesszük, hogy a néhány sorral fentebb említett okok miatt a 10-nél több magvú sejteken a feszültségfüggő folyamatok aktivációja létre sem jön, ugyanakkor a

tranziens késői fázisa megmarad, nyilvánvalóvá válik, hogy a feszültségfüggő folyamatok nem lehetnek felelősek a tranziens plató fázisának létrejöttéért.

A P2X receptorok, különösen a nem deszenzitizálódó P2X₇R hozzájárulása a FL_{plató}-hoz nem zárható ki, ugyanakkor legalább két kísérletünk bizonyítja, hogy a tranziens késői fázisában az ezen receptoron keresztül belépő Ca²⁺ ionok (még az esetleg általuk CICR-rel felszabadított további Ca²⁺-mal együtt is) csak mellékszereplők lehetnek. Egyrészt extracelluláris Ca²⁺ ionok hiányában sem csökkent szignifikánsan az FL_{plató}, miközben ugyanez az FL_{csúcs}-ról nem volt elmondható. Legalább ilyen meggyőzőek a 300 μM suramin jelenlétében ATP hozzáadása után mért I_{ATP} és [Ca²⁺]_i értékek, melyek azt mutatják, hogy I_{ATP}=0 mellett is létrejött a Ca²⁺-tranziens lassú fázisa. Kimondhatjuk tehát, hogy kísérleteink egyértelműen igazolták: a fejlődés során megjelenő bifázisos ATP-válasz késői, fenntartott komponenséért főképpen P2Y receptorok aktiválódása a felelős.

VI.2.4. A Ca²⁺-tranziens egyes fázisait alkotó P2X és P2Y receptor altípusok azonosítása

Sejtjeinken immuncitokémiai módszerrel az ionotrop receptorok közül a P2X₄, P2X₅ és P2X₇-et tudtuk kimutatni, a korábbi közleményekben leírt P2X₂ receptor (lásd II.3.1.5. *alfejezet*) egyértelműen hiányzott a sejtekről. A P2X₅ receptor jelenléte egybevág más szerzők eredményeivel, de mivel a receptor altípusok dinamikus megjelenését és eltűnését, vagyis a receptormintázat folyamatos változását írták le mind P2X, mind P2Y receptorokkal kapcsolatban, egy-egy korábban leírt receptor hiánya egy adott időpontban készített immunfestésnél nem tekinthető különlegesnek. Mindenképpen kiemelendő azonban, hogy a P2X₄ és P2X₇ receptorokat korábbi munkák nem említik a vázizomra jellemző altípusokként. A P2X₄ receptor jelenlétével kapcsolatban messzemenő következtetések levonása nem célszerű, hiszen az immuncitokémiai festés pozitivitásán túlmenően a receptor jelentőségét funkcionális vizsgálatokkal nem tudtuk igazolni, mivel specifikus agonistája és antagonistája nem ismert, emellett pedig a receptor elleni siRNS-sel végzett transzfekció sem hozta meg a remélt expressziócsökkenést.

A P2X₇ receptor jelenléte sokkal figyelemreméltóbb. Korábban nem írták le vázizomban, viszont specifikus agonistája (BzATP) és antagonistája (o-ATP) jelenlétében és hiányában, siRNS-sel végzett sikeres szuppressziót követően és anélkül árammérésekkel, [Ca²⁺]_i-mérésekkel és a számolt Ca²⁺-fluxus korai és késői fázisának elemzésével minden kétséget kizáróan bebizonyítottuk, hogy primer tenyésztett myoblastok myotubulussá differenciálódása során ez a receptor játssza a legfontosabb szerepet az ATP kiváltotta depolarizáció létrehozá-

sában és így a Ca^{2+} -szintben bekövetkező legnagyobb növekedés, a korai gyors fázis kiváltásában. A fejlődés/regeneráció lezárultát pedig szintén a Ca^{2+} -tranziens azon komponensének eltűnése jelzi a legmarkánsabban, amelyet ennek a receptornak a működése fémjelez. Ha figyelembe vesszük azt is, hogy a C2C12 sejtekben, melyek – mint láttuk – igen sok szempontból élesen különböznek a primer tenyészet sejtjeitől, szintén a P2X_7 receptor expressziójának nagyfokú növekedése jelenti a legdifferenciáltabb stádium elkülönülését a korábbiaktól, illetve hogy a PKC α -val kiváltott differenciálódás esetében is a P2X_7 R-hoz kötődő gyors fázis hiánya az egyik legszembeszökőbb különbség a SID-hez képest, akkor nem tűnik túlzásnak levonni a következtetést: a vázizom differenciációját kísérő változások között kiemelkedően fontos szerepet játszik a P2X_7 receptor expressziójának megjelenése/fokozódása és a rajta keresztül megvalósuló szignáltranszdukció felerősödése.

Az immuncitokémiával kimutatott P2Y_1 és P2Y_4 receptor jelenlétét és funkcióját a specifikus agonistákkal kapott eredmények (a Ca^{2+} -tranziens és az $\text{FL}_{\text{csúcs}}$ csökkenése az $\text{FL}_{\text{plató}}$ változatlanul maradása mellett) is igazolják. Emellett mindkét altípus jelenlétét egy-egy további vizsgálat is alátámasztja: a P2Y_1 receptor siRNS-sel történő szuppresszióját követően csökkent az ATP-vel kiváltható Ca^{2+} -tranziens nagysága, a P2Y_4 receptor jelenlétét pedig a nagy dózisú suramin által kiváltott purinerg jelátviteli blokádot követően is regisztrálható maradék Ca^{2+} -tranziens támasztotta alá.

VI.3. Purinerg szignalizáció melanoma malignumban

VI.3.1. P2X_7 R melanocytákon és melanoma sejteken – elhelyezkedés, funkció

Amint az legelső melanocytákon és melanoma malignum sejtvonalakon elvégzett vizsgálatainkból kiderült, a melanomagenesis során a sejtek purinerg jelátvitelére minőségi változáson megy keresztül: az ATP-re tökéletesen érzéketlen egészséges melanocyták érzékennyé válnak a purinerg stimulusra és bennük immuncitokémiával igazolhatóan nagy mennyiségben P2X_7 receptorok jelennek meg. A P2X_7 R-t kimutattuk a melanoma sejtek cytoplasmamembránjában, emellett azonban cytoplasmaticus és nuclearis immunpozitivitást is találtunk. A külső membránban való elhelyezkedés tekinthető normálisnak ezen receptor esetében, az itt levő receptorok szokásos működését a farmakológiai vizsgálatok is igazolták. A citoplazmatikus festődést az éppen készülő molekulák jelenlétével magyarázhatjuk, ám az igen erős nuclearis pozitivitás okát nem ismerjük. Különösen érdekes ez a festődési mintázat, mert ugyanez megfigyelhető a melanocyták esetében is, csak halványabban. A három felmerülő lehetőség a kóros elhelyezkedésű receptor, az antitest valamely nukleáris struktúrához

történt aspecifikus kötődése, valamint az, hogy a receptor valamilyen, eddig ismeretlen funkciót tölt be a magban. Ezek egyikét sem tudjuk kizárni, mindenesetre a halvány magi pozitívítás ellenére sem várhatunk normál P2X₇R funkciót melanocytákon, mert az immunfestések alapján a külső membránban a receptor bizonyosan nincsen jelen. Ezt a funkcionális vizsgálatok is megerősítették. Érdekes viszont azt megfigyelni, hogy a P2X₇R kimutatását célzó Western blot a kontroll melanocyták esetében is eredményezett egy igen halvány csíkot nagyjából a P2X₇R-nak megfelelő magasságban, ami (ha csak az aspecifikusan festődő struktúra nem pontosan a P2X₇R molekulatömegével megegyező méretű) mégis inkább a magban levő kész vagy félkész P2X₇R-ok jelenlétét valószínűsíti. Hogy pontosan mi a helyzet a receptor szubcelluláris lokalizációjával, az további vizsgálatok során fog csak kiderülni.

A receptort ATP-re adott Ca²⁺-válaszok tekintetében minden szempontból normálisnak találtuk melanoma sejtekben. A P2X₇R mRNS-ének jelenlétét kollaborációs partnereink, Tímár J. és kollégái qPCR-al is igazolták, és szekvenciaanalízisük nem mutatott ki mutációt, ami egybevág a receptor általunk talált normális ATP-szenzitivitásával. Mindezek ellenére a sejtjeinken megfigyelt receptor a normálisnak tekintett proapoptotikus hatásnak pontosan az ellenkezőjét váltotta ki akkor, amikor az apoptosist és necrosist kísérleteinkben gátolta (v.ö. II.3.1.6. *alfejezet*). El kellett tehát fogadnunk, hogy valami mégis befolyásolja a receptorműködést. A lehetséges modulátor keresése közben az *Eredmények* részben leírt módon került a vizsgálódásunk középpontjába a RyR. (Itt szeretném megjegyezni, hogy munkánkval egyidőben egy másik kutatócsoport olyan eredményeket közölt, melyek egy a mieinktől különböző melanoma sejtvonalonban P2X₇R apoptotikus hatására engedtek következtetni, illetve P2Y receptorok jelenlétét és szabályozó funkcióját valószínűsítették (White és mtsai, 2005a,b). Kísérleteik részben ellentmondanak a mi megfigyeléseinknek, azonban az eltéréseket magyarázhatja, hogy ők csupán egy melanoma sejtvonalat vizsgáltak, mely különbözött az általunk használt három sejtvonaltól, ráadásul eredményeiket nem vetették össze normál melanocytákkal.)

VI.3.2. RyR melanocytákon és melanoma sejteken – elhelyezkedés, funkció

A RyR2-t Tímár J. és munkatársai cDNS chippel és qPCR-al mutatták ki mRNS szinten, ezt követően a fehérje jelenlétét és melanocytákhoz, illetve naevussejtekhez viszonyított overexpresszióját immuncitokémiával igazoltuk. A RyR melanoma sejten belüli szubcelluláris lokalizációját SERCA-val együtt történt kettős festéssel és konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a RyR egyrészt tubulovesicularis cytoplasmaticus struktúrákban

jelölődik és a SERCA pumpával kolokalizált, így nagy valószínűséggel az endoplazmás retikulumban helyezkedik el, másrészt viszont a sejtek egy részében a külső membránban is kimutatható. Utóbbi meglehetősen szokatlan lokalizáció a receptor számára, de – ahogyan azt a II.3.2. alfejezetben is említettem – van rá néhány példa. Ezen receptorok pusztán elhelyezkedésén túlmenően külső membránba kerülésük módja és ottani funkciójuk is tisztázatlan. A főbb elképzelések a következők: a receptornak eredendően is a külső membránba kell jutni, ahol lokális Ca^{2+} -tranziensek létrehozásáért és így Ca^{2+} -függő K^+ -csatornák aktivációjáért felelős (simaizomsejtekben; Zou és mtsai, 1999), vagy az extracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt érzékelő rendszer része (osteoclastokban; Zaidi és mtsai, 2004). Esetleg a receptor a külső membránban normálisan csak érési folyamata során tölt egy rövid időt, így viszont overexpressziója esetén érthetően ott is felszaporodik. A harmadik lehetőség, hogy a receptorfehérje nem megfelelő sejten belüli szállítása eredményezi megjelenését a külső membránban, ez esetben a receptor egy, az intracelluláris transzportja irányításában fontos jelző részének mutációja állhat a háttérben.

A rianodin receptor ismert agonistáinak alkalmazását sem melanocytákon, sem melanoma sejteken nem követte a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megváltozása. Ez a tény némileg különböző kérdéseket vet fel a normál melanocyták esetében, melyek feltehetően a RyR normális formáját expresszálják kis mennyiségben (ezen expressziót DNS chip igazolta naevus sejtekben, immunfestés pedig melanocytákban és naevussejtekben – utóbbi megfigyelhető például a 30. ábra halvány zöld immunpozitivitásaként) és a melanoma sejtekben, melyek esetében a mutáns RyR jelenléte is könnyen elképzelhető. Természetesen mindkét esetben felmerül annak a lehetősége, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak üresek, ezt azonban a SERCA-blokkolók alkalmazásával kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emeléssel ki tudtuk zárni.

A melanocyták kapcsán felmerülő kérdés tehát a következő formában fogalmazható meg: bár a melanocytának vannak olyan belső kalciumraktárai, melyekből a SERCA gátlása után Ca^{2+} csorog az intracelluláris térbe, a sejtek RyR-ainak aktiválására tett kísérletek mégis eredménytelenek – hogyan lehetséges ez, és miért készít egy egészséges sejt egy látszólag nem funkcionáló receptorfehérjét? Mivel ez a kérdés vizsgálataink valódi tárgyától távolra vezet, megválaszolására kísérleteket nem végeztünk, és alább is csak egy elméleti lehetőséget szeretnék felvázolni. Nem zárható ki, hogy a neuroektodermális eredetű melanocytá az ER egy olyan szubpopulációjával rendelkezik, mely nyugalmi helyzetben üres, de van rajta RyR és SERCA. Ennek funkciója a sejtkárosító hatásokra bekövetkező $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés kontrollálása és így a sejt védelme egy potenciálisan sejthalált kiváltó tényezőtől. Ezt a lehetőséget megerősíti, hogy ilyen pufferraktárak jelenlétét egyéb, a neuroektodermából származó sejte-

ken már igazolták, és ezeket egyesek mint mitokondriumokat (Wang és mtsai, 1996), mások mint szeparált ER ciszternákat (Pozzo-Miller és mtsai, 1997) azonosították. A RyR-ok ezeken – és csak ezeken – az üres raktárakon való jelenléte jól megmagyarázná eredményeinket: a SERCA blokkolása Ca^{2+} -csorgást eredményez a töltött raktárakból (egy a RyR-tól különböző csatornán keresztül), a RyR agonisták hatástalanok, ugyanakkor ez a rendszer a sejtnak hasznos, mivel károsító noxa bekövetkeztekor az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a kritikus szint alatt marad a pufferraktár Ca^{2+} -felvétele miatt, és a sejt túlél.

Melanoma sejteink esetén az komplikálja a helyzetet, hogy tumoros sejtek esetében az overexpresszáldó receptor diszfunkciója nem tekinthető ritkaságnak, gondolatmenetünk tehát az elején kettéválik. Ha feltételezzük, hogy a RyR normofunkciós, de agonistái nem hoznak létre Ca^{2+} -tranzienst, az előző bekezdésben ismertetett üres raktáron elhelyezkedő RyR-ra gondolhatunk. Ha abnormális működésű csatornát feltételezünk Ca^{2+} -mal telt ER-en, akkor vagy maga a csatorna károsodott, vagy valami külső körülmény akadályozza az egyébként normális fehérje funkcióját. Utóbbi magyarázatául felmerül a sorcin és az FKBP12.6 szerepe, melyek a RyR negatív cytoplasmaticus regulátorai és az általunk vizsgált sejtekben igen jelentősen overexpresszáldódnak (lásd V.3.4. alfejezet).

VI.3.3. RyR-P2X₇R kölcsönhatás melanomában – hogyan?

A melanomában funkcióképes overexpresszált P2X₇ receptor és a funkcióképtelen RyR2 különálló vizsgálata után a két receptorra ható molekulákat együttesen alkalmaztuk és azt találtuk, hogy rianodin hatására az ATP kiváltotta Ca^{2+} -válaszok amplitúdója lecsökkent, összhangban Bennett és munkatársai HeLa sejteken tett megfigyeléseivel (1996). Az első kérdés, miként csökkenti a rianodin az ATP kiváltotta Ca^{2+} -tranzienst amplitúdóját. Az első, igen valószínűtlen lehetőség, hogy a rianodin közvetlenül a P2X₇ receptoron hatna. A P2X₇ receptor hatalmas irodalmában erre utaló közleményt nem találtunk, ami nem meglepő, hiszen a RyR azonosítását és izolálását lehetővé tevő radioaktív izotópos vizsgálatok tanúsága szerint az alkaloida nagy affinitással és specificitással csak a RyR-hez kötődik (Pessah és mtsai, 1986; Campbell és mtsai, 1987; Sutko és mtsai, 1997; Williams és Tanna, 2004).

Kézenfekvő tehát a feltételezés, hogy a rianodint kötött RyR befolyásolja a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásait. Könnyen kizárható, hogy a RyR normál funkciójával állnánk szemben, azaz a P2X₇R stimulációt követő egyre csökkenő amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienst a belső raktáron elhelyezkedő RyR gátlása miatt a raktárból felszabaduló kevesebb Ca^{2+} eredményezné. Ez ugyanis implicit módon azt jelenti, hogy rianodin jelenléte nélkül az ATP által kiváltott tranzienst azért

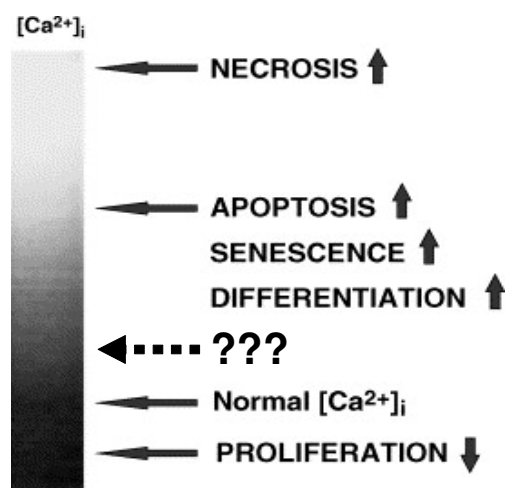
növekszik, mert a raktárakból egyre több Ca^{2+} szabadul fel. Ez esetleg úgy lenne elképzelhető, hogy a kezdeti, ATP által kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -növekedés túltölti a raktárat, majd a második tranziens a RyR-en keresztül CICR révén már nagyobb tranziens hoz létre, mint megelőzőleg. Ekkor gátló dózisú rianodin valóban csökkentené a tranziensamplitúdót. Magyarázatra szorulna azonban, hogy miért csökkennek az ismételt stimulusra adott válaszok, miközben jól ismert, hogy a P2X_7 receptor nem deszenzitizálódik, hanem normál közülmények között ismételt agonistaalkalmazások során egyre több Ca^{2+} -ot enged be a sejtbe (North, 2002). Helyesebbnek tűnik tehát inkább abból a feltevésből kiindulni, hogy a rianodin kötődése a RyR-hoz az ATP indukálta $\text{P2X}_7\text{R}$ -on keresztüli inward Ca^{2+} -áramot csökkenti. A kérdés az, hogyan.

Ennek megválaszolását a két receptor esetében más és más tényezők bizonytalansága komplikálja. Mindkét fehérje egy-egy óriási és heterogén receptorstruktúra fő alkotója, melyek önmagukban is komplex módon hatnak kölcsön molekuláris környezetükkel. Emellett a P2X_7 receptor kiváltotta sejtválasz igen sokféle és a mai napig nem mentes ellentmondásoktól (lásd II.3.1.6. *alfejezet*), a RyR szubcelluláris szintű elhelyezkedése pedig – az általunk vizsgált melanoma sejtekben legalábbis – nem egyértelmű, ahogy azt már fentebb részleteztük. Mindezek fényében érthető, hogy még elméletben is nehezen állapítható meg pontosan, hogyan lép kölcsönhatásba a RyR és a P2X_7 receptor. A lehetőségek átgondolásánál a közvetlen mechanikai kapcsolat és valamilyen közvetett kölcsönhatás lehetőségét célszerű mérlegelni. Egyrészt feltételezhetjük a két receptorkonglomerátum térbeli közelségét, ha elfogadjuk, hogy az overexpresszált RyR a külső membránban (is) megtalálható. Ezen elképzelés igazolására például a FRET (fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer) technika lehetne alkalmas a jövőben. Az sem zárható ki azonban, hogy az ER-ben levő RyR kapcsolódik a P2X_7 receptorhoz, akár a citoszkeleton közvetítésével, akár közvetlenül, a plazmamembrán alatt, annak közelében lévő ER-ben elhelyezkedve (az ilyen „kapcsolattartás” a felszíni membránnal egyébként sem idegen a RyR-tól). Ráadásul nem is feltétlen a P2X_7 receptorral, hanem – hogyha nem maga a $\text{P2X}_7\text{R}$ a megnyíló pórus (lásd II.3.1.6. *alfejezet*) – az általa vezérelt pórussal vagy feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornával (akár DHPR?) való mechanikai interakció is logikus magyarázattal szolgálna eredményeinkre. A feltételezés mindegyik esetben ugyanaz: a rianodin RyR-hez történő kötődése után konformációváltozás következik be, mely módosítja a RyR-hez kapcsolódó molekulát is, ami végeredményben a Ca^{2+} -beáramlás csökkenéséhez vezet.

VI.3.4. RyR-P2X₇R kölcsönhatás melanomában – miért?

Joggal merül fel a kérdés: van-e értelme a melanoma sejtekben található P2X₇R funkciójának módosításának, vagy csak a dolgok véletlen játéka eredményezi a módosult receptorfunkciót anélkül, hogy ennek bármi előnye is lenne a sejtre nézve? Leegyszerűsítve az eredményeket azt tapasztaltuk, hogy melanoma sejtekben P2X₇ receptor jelenik meg és a RyR overexpresszálódik, az utóbbihoz kötődő rianodin pedig az előbbin keresztül kiváltott Ca²⁺-választ csökkenti. Ezzel párhuzamosan a P2X₇ receptor a sejtet apoptosistól megvédő molekulaként jelenik meg, szöges ellentétben általánosan elfogadott proapoptotikus hatásával. Ez utóbbi tulajdonképpen válaszol is a bekezdés első mondatában megfogalmazott kérdésre, hiszen a sejthalál elmaradása a sejt számára mindenképpen (szelekciós) előny, még ha a szervezet számára nem is az, hiszen a daganatok kialakulásának lehetőségét, melanoma esetében már megvalósult lehetőségét hordozza. Az események alábbi szekvenciája képzelhető el: egy károsító behatás (például UV sugárzás stb.) éri a sejtet, ami esetleges egyéb hatásai mellett tumor szuppresszor géneket inaktívál vagy onkogéneket aktivál. Ez a sejt apoptosiprogramjának aktiválódását eredményezi, melynek részeként kifejeződik a P2X₇R, és a sejt elpusztul. Azokban a sejtekben azonban, amelyekben a véletlen folytán párhuzamosan bekövetkező mutáció miatt a RyR overexpresszálódik, a P2X₇ receptoron keresztül szignalizáció módosul és a RyR-P2X₇R funkcionális komplex antiapoptotikus hatást fejt ki, azaz a károsodott sejt túlélését és tumor (jelen esetben melanoma malignum) kialakulását segíti.

Arra, hogy ez miként valósulhat meg, kétféle elképzelésünk van, melyek közül az első a P2X₇R-on keresztül megvalósuló Ca²⁺-jel, a másik a P2X₇R Ca²⁺-tól független apoptotikus hatásainak módosulását feltételezi (lásd 5. ábra). Egyrészt feltételezhető, hogy az overexpresszált (és esetleg mutáns, illetve abnormis helyen található) RyR mindenféle agonistája vagy antagonistája nélkül is, már nyugalomban gátolja a P2X₇ stimuláció kiváltotta [Ca²⁺]_i növekedést, így a P2X₇ agonisták nem apoptosist kiváltó, hanem annál kisebb [Ca²⁺]_i szintet hoznak létre, ami eltérő jelátviteli útvonalakat aktivál és antiapoptotikus hatású. Ez az elmélet feltételezi, hogy az [Ca²⁺]_i-ban bekövetkező emelkedés mértéke alapvetően befolyásolja akár ellentétes jelátviteli mechanizmusok aktiválását és a sejt sorsát. Ez egybevág a napjainkban már-már alapvetésnek számító kijelentéssel, miszerint a Ca²⁺-jel dekódolása egyaránt függ annak nagyságbeli (amplitúdó), térbeli (szubcelluláris lokalizáció) és időbeli (időtartam, frekvencia) sajátosságaitól (Berridge és mtsai, 1998). A Sergeevtől (2005) átvett sematikus 33. ábra jól illusztrálja, hogy a különböző Ca²⁺-szintek meghatározhatják a sejt további



33. ábra. Különböző $[Ca^{2+}]_i$ -szintek hatása a sejt sorsára. (Sergeev, 2005 nyomán.)

sorsát, így nem zárható ki, hogy egy a $P2X_7R$ -on keresztül létrehozott alacsonyabb $[Ca^{2+}]_i$ (szaggatott nyíl) a sejt túléléséért felelős programokat indítja be, míg valamivel nagyobb $[Ca^{2+}]_i$ már sejthalált okoz. Lehetséges tehát, hogy melanoma sejteinkben az ATP adagolásakor látott egyre nagyobb Ca^{2+} -tranziensek már eleve kisebbek, mint a RyR jelenléte nélkül lennének (vagyis amit azokban a sejtekben mérhetnénk, amelyek – a fenti gondolatmenetet követve – anélkül pusztulnak el, hogy a kutató szeme elé kerülnének és lehetőségünk lenne megvizsgálni őket), a mester-

ségesen alkalmazott rianodin pedig csak a RyR bazális gátló hatását fokozza, a $[Ca^{2+}]_i$ növekedés mértékének további csökkentésével.

A másik lehetőség, hogy a RyR - $P2X_7R$ kölcsönhatás a $P2X_7R$ apoptosizis kiváltását eredményező hatásai közül egyéb funkciókat gátol, melyek (például citoszeletális átrendeződések vagy interleukintermelés) szintén nélkülözhetetlenek volnának a sejthalál kiváltásához. Ez esetben a RyR - $P2X_7R$ funkcionális komplex a $[Ca^{2+}]_i$ szintjének változásaitól függetlenül is antiapoptotikus hatású lehet. Amíg azonban a RyR ilyen típusú hatásairól nincsen kísérletes információnk, az előző bekezdésben leírtakat kell valószínűbbnek gondolnunk.

VI.3.5. RyR és $P2X_7R$ lehetséges *in vivo* agonistái és antagonistái

Végezetül azt kell átgondolni, mik lehetnek a $P2X_7R$ és a RyR antiapoptotikus funkcióját aktiváló molekulák *in vivo*, hiszen ilyenekre feltétlenül szükség van ahhoz, hogy a sejtelhalál kivédése megtörténhessen a szervezetben is. A $P2X_7$ receptor esetében a legkézenfekvőbb válasz az ATP, ami az extracelluláris térbe két úton kerülhet. Idegvégződésből kotranszmitterként, ami a beidegzéssel nem rendelkező melanocyták és melanoma sejtek esetében kevésbé valószínű (ugyanakkor a korábban tárgyalt izomdifferenciálódás során a fejlődés előrehaladtával – *in vivo* – kialakuló beidegzés és beinduló neurotranszmisszió az extracelluláris ATP fontos forrása lehet), illetve magukból a melanocytákból és melanoma sejtekből. Bár ATP-szekrécióra neuroektodermális eredetük miatt a sejtek akár képesek is lehetnének, ilyesmit az irodalomban a melanocyták kapcsán nem írtak le. Melanomás sejteinkben viszont egyes, egyelőre nem megismételt DNS chippel végzett kísérletek (Tímár J.,

OOI, nem publikált adatok) az ATP-szintáz mRNS-ének nagyfokú overexpresszióját is felvették, így esetükben ez valós lehetőségként merül fel. Ekkor az ATP autokrin antiapoptotikus faktorként is felfogható lenne, ez a lehetőség azonban egyelőre csak érdekes felvetésnek tekinthető és további vizsgálatokat igényel. A másik lehetőség a necrosis és apoptosis során felszabaduló ATP. A sejtelhalás egyáltalán nem tekinthető ritkaságnak egy olyan gyorsan növekvő tumorban, mint a melanoma, ahol folyamatos a neovascularisatio elmaradottsága és ebből következően az ischaemia.

A RyR esetében elméletileg – ahogy azt korábban már említettük – nem is feltétlenül szükséges valamilyen agonista jelenlétét feltételeznünk a P2X₇R funkcióját módosító hatás mérlegelésénél, hiszen lehetséges, hogy a RyR nyugalmi állapotban is folyamatos kölcsönhatásban áll a P2X₇R-al és módosítja annak funkcióját („RyR-P2X₇R funkcionális komplex”). Ha viszont csak valamilyen ágens kötődése után befolyásolja a purinerg receptor működését (mint ahogy ezt bizonyítani egyelőre csak a rianodin kötődését követően sikerült a Ca²⁺-tranziensek vonatkozásában *in vitro*), *in vivo* körülmények között főleg a Ca²⁺ ion és az ATP mint a RyR fiziológiai regulátorai jöhetnek szóba. Érdekes felfigyelni arra, hogy az ATP mindkét, a vizsgálódás tárgyát képező receptor funkcióját módosítja.

VI.3.6. RyR és P2X₇R farmakológiai agonistáinak és antagonistáinak lehetséges terápiás felhasználása

A P2X₇R RyR által módosított funkciója, vagyis az apoptosis programjának gátlása, és a receptor antagonizálása által kifejtett proapoptotikus és pronekrotikus, vagyis jelen esetben a tumorsejteket elpusztító hatás a P2X₇R-t a melanoma kemoterápiájának potenciális célpontjává teszi. Kezdeti állatkísérleteink egyelőre csak részleges eredményeket hoztak, hiszen a ZnSO₄-gyel *per os* kezelt SCID egerek primer tumorainak mérete jelentősen nem változott, és noha a metastasisok száma csökkent, jogos kritika érheti a Zn²⁺ ion antagonistaként való használatát, hiszen a Zn²⁺ közismerten számos biokémiai folyamatban szükséges nyomelem, hatását tehát bizonyosan nem csupán a purinerg receptorra hatva fejti ki. Hasonló a helyzet a P2X₇R-t szintén gátolni képes Cu²⁺ ionnal. A gátlószerek közül farmakológiai vizsgálatokban használtuk még a briliánskék G nevű festéket, mely a purinerg receptorok között szintén P2X₇R-specifikus, viszont ez a molekula is számos fehérjéhez kötődik (ezért használható fehérjekimutatási eljárásokban). A P2X₇R antagonistái közül esetleg további vizsgálatokra lehet érdemes a 17β-ösztadiol, noha ennek a vegyületnek is számolni kell az egyik legfontosabb női nemi hormonnaként kiváltott multiplex hatásaival (North, 2002). Az esetleges további

in vivo állatkísérletek interpretációját jelentősen megnehezíti az a tény, hogy a daganatellenes hatáshoz huzamos antagonistak alkalmazására van szükség, így a jelenleg rendelkezésre álló szerek adagolásakor számos hatás kombinációjával kell számolni.

VII. Összefoglalás

A disszertációban összefoglalt munka során a purinerg szignalizációban a vázizomsejtek differenciálódása, illetve egészséges melanocyták malignus transzformációja során bekövetkező változásokat vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a tenyésztő oldat szérumösszetételének megfelelő megváltoztatásával indukált differenciálódás során mind C2C12 egér myoblastokban, mind primer tenyésztett egér vázizomsejtekben a sejtek purinerg válaszkészsége fokozódik és a Ca^{2+} -tranziensek és az ezek háttérében álló Ca^{2+} -fluxusok bifázisossá válnak. A gyors, korai fázist ionotrop P2X receptorokon, mindenekelőtt a P2X₇R-on keresztül kialakuló inward ionáram, az ennek következtében megjelenő akciós potenciál és a feszültségfüggő folyamatok aktiválódása hozza létre. Ez a fázis az extracelluláris Ca^{2+} hiányára, a sejt előzetes depolarizációjára és a P2X receptorok gátlására érzékeny, kinetikai paraméterei a depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek paramétereihez hasonlítanak és gyors lecsengése a feszültségfüggő csatornák inaktiválódásával magyarázható. A C2C12 sejtvonal esetében a Ca^{2+} -válasz korai komponense csak a legfejlettebb sejteken jelenik meg, de ha a differenciálódást a PKC α izoenzim overexpressziójával indítjuk be, ez a korai fázis még ezen sejtek esetében is hiányzik (a késői fenntartott fázis ezzel szemben már igen korán és maximális amplitúdóval jelentkezik). Ezzel párhuzamosan a P2X₇R expressziójának máskor tapasztalt fokozódása is elmarad és a sejtek válaszkészsége hasonlít az anti-P2X₇R siRNS alkalmazását követően nyert, a korai komponens csökkenését mutató eredményekhez, aláhúзва ezen receptor altípus fontosságát a gyors fázis kialakításában. A primer tenyésztett vázizomsejtek esetében a bifázisos válasz már a korai fejlődési stádiumokban is megjelenik, a legfejlettebb izomrostokban azonban a purinerg szignalizáció „involúciójának” jeleként a nagy amplitúdójú korai fázis eltűnik és csak a lassú késői komponens marad meg. Ez utóbbi kialakításáért az aktiválódó metabotrop P2Y receptorok (C2C12 sejtek esetében a differenciálódást elindító tényezőtől függően a P2Y₂ és P2Y₄, primer myotubulusok esetében a P2Y₁ és P2Y₄ altípusok) által az SR-ből fáziskéséssel felszabadított Ca^{2+} a felelős.

Az általunk vizsgált melanoma malignum sejtvonalak mindegyikében a kontroll egészséges melanocytákhoz képest új tulajdonságként jelent meg az ATP-szenzitivitás. Vizsgálataink kimutatták, hogy a különböző sejtvonalakon egyöntetűen a P2X₇R expresszálódik, mely a cytoplasmamebránban elhelyezkedve a P2X₇R-nak megfelelő farmakológiai tulajdonságokkal hoz létre Ca^{2+} -tranzienseket. A receptor aktiválása azonban – a P2X₇R-től megszokottól eltérően – antiapoptotikus hatást fejt ki, míg a receptor gátlása elősegíti az apoptosist és

necrosist *in vitro*, illetve a metastasisképzést csökkenti *in vivo*. A P2X₇R módosult funkciója összefüggésben lehet a rianodin receptor melanoma sejtekben megfigyelhető overexpressziójával. A RyR az ER-ben és a plazmamembránban is kimutatható. Szokványos agonistái nem képesek aktiválni, viszont rianodin jelenlétében szignifikánsan csökken a P2X₇R közvetítésével megvalósuló $[Ca^{2+}]_i$ -növekedés amplitúdója. Nem zárható ki tehát, hogy a kórosan overexpresszált RyR módosítja a melanomában megjelenő P2X₇R funkcióját oly módon, hogy utóbbi receptor az apoptózis ellen védő tényezővé válik és működésével elősegíti a malignus transzformációt.

Az értekezésben bemutatott munka eredményei azt igazolják, hogy egymástól igen különböző sejttypusok használják a purinerg jelátviteli utakat olyan, a sejt végső sorsát meghatározó folyamatok szabályozásában, mint amilyen a specializált sejttypussá történő differenciálódás eseménysora vagy a programozott sejthalál, az apoptózis kivédése. Megfigyeléseink arra is rámutatnak, hogy a sejt sorsát végérvényesen meghatározó irány kijelölésében és az adott úton való végighaladás során a P2X₇ purinoreceptor kulcsfontosságú szerephez jut.

Summary

This Ph.D. thesis summarises the results of our research into the alterations observed during the differentiation of skeletal muscle cells and the malignant transformation of human melanocytes.

We have shown that when C2C12 mouse myoblasts and primary cultured mouse skeletal muscle cells are induced to differentiate by the appropriate alteration of the serum content of their culturing medium, the responsiveness of cells to extracellular ATP increases and the Ca^{2+} transients as well as the underlying Ca^{2+} fluxes become biphasic. The early peak component is initiated by the opening of ionotropic P2X receptors, especially the P2X₇R, followed by inward ionic currents, depolarization of the cell, initiation of an action potential and thus the activation of voltage-gated processes. This phase is sensitive to the removal of extracellular Ca^{2+} ions, to preceding and sustained membrane depolarization and to the inhibition of P2X receptors. Its kinetic parameters resemble those of the depolarization-induced Ca^{2+} transients, and it is rapidly terminated as voltage-gated channels inactivate. On C2C12 cells this early peak component appears only at the most differentiated stage, but if differentiation is induced by the overexpression of PKC α , the early phase fails to appear even in these cells (whereas the delayed phase can be detected with maximal amplitude early in differentiation). In the latter group of cells, the increase in the expression of P2X₇R is also lacking and the responses of cells resemble the transients of the ones that have undergone transfection with anti-P2X₇R siRNA displaying a suppressed early phase, which underlines the importance of the P2X₇ subtype during the peak component. In the case of primary cultured skeletal muscle cells, the biphasic shape of the Ca^{2+} transient appears already at an early stage, but, as a sign of the involution of purinergic signalling, the large peak disappears in the most developed myofibres and only the sustained phase can be detected. The latter component of the transient is produced by the release of Ca^{2+} from the SR following the activation of metabotropic P2 receptors (P2Y₂R and P2Y₄R on C2C12, while P2Y₁R and P2Y₄R on primary myotubes).

As compared to control healthy melanocytes, ATP sensitivity appeared in each of our melanoma cell lines as a gain of new function. Our experiments have shown that all the three melanoma cell lines express the P2X₇R, which, localised in the cytoplasmic membrane and having the typical pharmacological characteristics of P2X₇ receptors, is responsible for the ATP-evoked Ca^{2+} transients. Unlike in other tissues, however, the activation of the receptor exerts antiapoptotic effect, while its inhibition promotes apoptosis and necrosis *in vitro* and

inhibits metastasis formation *in vivo*. The altered function of P2X₇R can be related to the overexpression of the ryanodine receptor in melanoma cells. We have demonstrated that RyR is localised in the ER as well as in the cytoplasmic membrane. Its well-known agonists are unable to activate the receptor, but ryanodine significantly decreased the amplitude of the P2X₇R-mediated Ca²⁺ transients. It cannot be excluded that the pathologically overexpressed RyR modifies the function of the P2X₇R in a way that the latter becomes a protective factor for the cell, thus leading to malignant transformation.

The results of the work discussed in this dissertation prove that diverse cell types make use of the purinergic signalling pathway as the regulator of processes critical in the determination of the fate of the cell, such as differentiation to a specialised function or avoiding apoptosis. We have also demonstrated that the P2X₇ receptor subtype is a key player in directing cells between proliferation and differentiation, as well as apoptosis and survival.

VIII. Irodalomjegyzék

- Abbracchio M.P., Boeynaems J.M., Barnard E.A., Boyer J.L., Kennedy C., Miras-Portugal M.T., King B.F., Gachet C., Jacobson K.A., Weisman G.A., Burnstock G. (2003):** Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24(2):52-5.
- Alvaro V., Prevostel C., Joubert D., Slosberg E., Weinstein B.I. (1997):** Ectopic expression of a mutant form of PKC α originally found in human tumors: Aberrant subcellular translocation and effects on growth control. *Oncogene* 14(6):677-685.
- Bennett D.L., Cheek T.R., Berridge M.J., De Smedt H., Parys J.B., Missiaen L., Bootman M.D. (1996):** Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J Biol Chem* 271(11):6356-62.
- Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. (1998):** Calcium-a life and death signal. *Nature* 395(6703):645-8.
- Betto R., Senter L., Ceoldo S., Tarricone E., Biral D., Salviati G. (1999):** Ecto-ATPase activity of alpha-sarcoglycan (adhalin). *J Biol Chem* 274(12):7907-12.
- Bíró T., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Papp H., Kovács I., Juhász I., Kovács L. (2004):** Cell and isoform specific roles of protein kinase C isoenzymes in regulating in vitro and in vivo proliferation of keratinocytes and skeletal muscle cells. *J Invest Dermatol* 122:A21.
- Bo X., Jiang L.H., Wilson H.L., Kim M., Burnstock G., Surprenant A., North R.A. (2003):** Pharmacological and biophysical properties of the human P2X₅ receptor. *Mol Pharmacol* 63:1407-1416.
- 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.
- Boczan J., Biro T., Czifra G., Lazar J., Papp H., Bardos H., Adany R., Mechler F., Kovacs 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 (Berl)* 102:55-62.

- Boczan J., Boros S., Mechler F., Kovacs L., Biro T. (2000):** Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)* 99:96-104.
- Boue-Grabot E., Archambault V., Seguela P. (2000):** A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem* 275:10190-10195.
- Boyer L., Doye A., Rolando M., Flatau G., Munro P., Gounon P., Clement R., Pulcini C., Popoff M.R., Mettouchi A., Landraud L., Dussurget O., Lemichez E. (2006):** Induction of transient macroapertures in endothelial cells through RhoA inhibition by *Staphylococcus aureus* factors. *J Cell Biol* 173(5):809-19.
- Braunwald E., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L. (szerk.) (2001):** Harrison's Principles of Internal Medicine. 15. kiadás, *McGraw-Hill Medical Publishing Division*, USA. 557.o.
- Breitwieser G.E. (2006):** Calcium sensing receptors and calcium oscillations: calcium as a first messenger. *Curr Top Dev Biol* 73:85-114.
- Brunschweiler A., Muller C.E. (2006):** P2 receptors activated by uracil nucleotides-an update. *Curr Med Chem* 13(3):289-312.
- Buckingham M., Bajard L., Chang T., Daubas P., Hadchouel J., Meilhac S., Montarras D., Rocancourt D., Relaix F. (2003):** The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202(1):59-68.
- Bulanova E., Budagian V., Orinska Z., Hein M., Petersen F., Thon L., Adam D., Bulfone-Paus S. (2005):** Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X7 receptor in murine mast cells. *J Immunol* 174(7):3880-90.
- Burnstock G. (2006a):** Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S172-81.
- Burnstock G. (2006b):** Purinergic signalling-an overview. *Novartis Found Symp* 276:26-48; discussion 48-57, 275-81.
- Burnstock G., Kennedy C. (1985):** Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16(5):433-40.
- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. és Smythe, A. (1970):** Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves of the gut. *Br J Pharmacol* 40: 668-688.

- Campbell K.P., Knudson C.M., Imagawa T., Leung A.T., Sutko J.L., Kahl S.D., Raab C.R., Madson L. (1987):** Identification and characterization of the high affinity [3H]ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem* 262(14):6460-3.
- Capiati D.A., Tellez-Inon M.T., Boland R.L. (1999):** Participation of protein kinase C alpha in 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ regulation of chick myoblast proliferation and differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 153:39-45.
- Cell Line Data Base (CLDB) version 4.200201.** [http:// www.biotech.ist.unige.it/ interlab/ cldb.html](http://www.biotech.ist.unige.it/interlab/cldb.html). *Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST)*. Hivatkozva: 2006.07.29.
- Cheung K.K., Ryten M., Burnstock G. (2003):** Abundant and dynamic expression of G protein-coupled P2Y receptors in mammalian development. *Dev Dyn* 228:254-266.
- Chiozzi P., Murgia M., Falzoni S., Ferrari D., Di Virgilio F. (1996):** Role of the purinergic P2Z receptor in spontaneous cell death in J774 macrophage cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 218(1):176-81.
- Chizh B.A., Illes P. (2000):** P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev* 53:553-568.
- Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlstrom H., Lendahl U., Frisen J. (2000):** Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288:1660–1663.
- Cognard C., Constantin B., Rivet-Bastide M., Imbert N., Besse C., Raymond G. (1993):** Appearance and evolution of calcium currents and contraction during the early post-fusional stages of rat skeletal muscle cells developing in primary culture. *Development* 117:1153-1161.
- 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.
- Cseri J., Szappanos H., Szigeti G.P., Csernatony Z., Kovacs L., Csernoch L. (2002):** A purinergic signal transduction pathway in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Pflügers Arch* 443(5-6):731-8.
- Czifra G., Toth I.B., Marincsak R., Juhasz I., Kovacs I., Acs P., Kovacs L., Blumberg P.M., Biro T. (2006):** Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase Cdelta. *Cell Signal* 18:1461-1472.

- De Angelis L., Berghella L., Coletta M., Lattanzi L., Zanchi M., Cusella-De Angelis M.G., Ponzetto C., Cossu G. (1999):** Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta co-express endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 147:869–878.
- Dobos J., Timar J., Bocsi J., Burian Z., Nagy K., Barna G., Petak I., Ladanyi A. (2004):** In vitro and in vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. *Int J Cancer* 112:771-76.
- Dome B., Raso E., Dobos J., Meszaros L., Varga N., Puskas L.G., Feher L.Z., Lorincz T., Ladanyi A., Trikha M., Honn K.V., Timar J. (2005):** Parallel expression of α IIb β 3 and α v β 3 integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. *Int J Cancer* 116:27-35.
- Drury A.N., Szent-Györgyi A. (1929):** The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237.
- Egan T.M., Samways D.S., Li Z. (2006):** Biophysics of P2X receptors. *Pflügers Arch* 452(5):501-12.
- Endo M. (1977):** Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* 57:71-108.
- Fabiato A. (1984):** Dependence of the calcium induced release from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres from the frog semitendinosus on the rate of change of free calcium concentration at the outer surface of the sarcoplasmic reticulum. *J Physiol (Lond)* 353:56P.
- Faria R.X., Defarias F.P., Alves L.A. (2004):** Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am J Physiol Cell Physiol* 288(2):C260-71.
- Farzaneh F., Entwistle A., Zalin R.J. (1989):** Protein kinase C mediates the hormonally regulated plasma membrane fusion of avian embryonic skeletal muscle. *Exp Cell Res* 181:298-304.
- Fehér Gy. (2004):** A háziállatok funkcionális anatómiája. *Mezőgazda Kiadó*, Budapest, 110. ábra.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. (1998):** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528–1530.

- Fishman P., Bar-Yehuda S., Barer F., Madi L., Multani A.S., Pathak S. (2001):** The A3 adenosine receptor as a new target for cancer therapy and chemoprotection. *Exp Cell Res* 269(2):230-6.
- Fredholm B.B., Ijzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.-N., Linden J. (2001):** International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527–552.
- Freshney R.I. (1992):** Animal Cell Culture – A Practical Approach. 2. kiadás, *Oxford University Press*, Oxford, Nagy-Britannia. 2-3. o.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985):** A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
- Haak-Frendscho M., Darvas Z., Hegyesi H., Karpati S., Hoffman R.L., Laszlo V., Bencsath M., Szalai C., Furesz J., Timar J., Bata-Csorgo Z., Szabad G., Pivarsci A., Pallinger E., Kemeny L., Horvath A., Dobozy A., Falus A. (2000):** Histidine decarboxylase expression in human melanoma. *J Invest Dermatol* 115(3):345-52.
- Harari D. (2005):** RNAi and siRNAs: From Theory to Practice. In: siRNA: Technologies and Uses. *Ben Gurion University - Israeli National Node (BGU-INN) Workshop*. http://inn.org.il/workshops/bgu/siRNA_1.pdf. Hivatkozva: 2006.07.29.
- Hechler B., Cattaneo M., Gachet C. (2005):** The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost* 31(2):150-61.
- Henning R.H., 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.
- Hill C.S., Wynne J., Treisman R. (1995):** The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81:1159–1170.
- Hollopeter G., Jantzen H.M., Vincent D., Li G., England L., Ramakrishnan V., Yang R.B., Nurden P., Nurden A., Julius D., Conley P.B. (2001):** Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202-207.
- Holton P. (1959):** The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol (Lond)* 145:494-504.

- IMS Health Inc. (2006)** Leading Products by Global Pharmaceutical Sales, 2005. http://www.imshealth.com/ims/potal/front/articleC/0,2777,6599_77478579_77479663,0.html. Hivatkozva: 2006.09.09.
- Iyer D., Chang D., Marx J., Wei L., Olson E.N., Parmacek M.S., Balasubramanyam A., Schwartz R.J. (2006):** Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4516-4521.
- Kaczmarek L.K. (2000):** Mitochondrial memory banks. Calcium stores keep a record of neuronal stimulation. *J Gen Physiol* 115(3):347-50.
- Kahlenberg J.M., Dubyak G.R. (2004):** Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(5):C1100-8.
- Kidokoro Y. (1975):** Sodium and calcium components of the action potential in a developing skeletal muscle cell line. *J Physiol* 244:145-159.
- Kim M., Jiang L.H., Wilson H.L., North R.A., Surprenant A. (2001):** Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20(22):6347-58.
- Kondo R.P., Weiss J.N., Goldhaber J.I. (2000):** Putative ryanodine receptors in the sarcolemma of ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 440:125-131.
- Laemmli U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Littleton J.T., Bellen H.J. (1995):** Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a Ca²⁺-dependent manner. *Trends Neurosci* 18(4):177-83.
- Liu G.J., Brockhausen J., Bennett M.R. (2003):** P2X1 receptor currents after disruption of the PKC site and its surroundings by dominant negative mutations in HEK293 cells. *Auton Neurosci* 108:12-16.
- Liu W.S., Heckman C.A. (1998):** The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal* 10(8):529-42.
- MacKrell J.J. (1999):** Protein-protein interactions in intracellular Ca²⁺-release channel function. *Biochem J Feb* 337(3):345-61.

- Marteau F., Le Poul E., Communi D., Communi D., Labouret C., Savi P., Boeynaems J.-M., Suarez Gonzalez N. (2003):** Pharmacological Characterization of the Human P2Y₁₃ Receptor. *Mol Pharmacol* 64:104-112.
- Martinson, J. és Muren, A. (1963):** Excitatory and inhibitory effects of vagus stimulation on gastric motility in the cat. *Acta Physiol Scand* 57:309-316.
- Mauro A. (1961):** Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9:493-5.
- Mischak H., Goodnight J.A., Kolch W., Martiny-Baron G.M., Schaehtle C., Kazanietz M.G. (1993):** Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 268:6090-6096.
- Muntoni F., Brown S., Sewry C., Patel K. (2002):** Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord* 12(5):438-46.
- Murray N.R., Baumgardner G.P., Burns D.J., Fields A.P. (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.
- Narcisse L., Scemes E., Zhao Y., Lee S.C., Brosnan C.F. (2005):** The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49(2):245-58.
- Neuromuscular Disease Center (2005):** Myogenesis and muscle regeneration. *Washington University, St. Louis, MO, USA.* [http:// www.neuro.wustl.edu/ neuromuscular/ mother/ myogenesis.html](http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/myogenesis.html). Hivatkozva: 2006.07.30.
- Neylon C.B., Richards S.M., Larsen M.A., Agrotis A., Bobik A. (1995):** Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 215(3):814-21.
- Nishiyama A., Rahman M., Inscho E.W. (2004):** Role of interstitial ATP and adenosine in the regulation of renal hemodynamics and microvascular function. *Hypertens Res* 27(11):791-804.
- North R.A. (2002):** Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82(4):1013-67.
- Papp H., Czifra G., Bodo E., Lazar J., Kovacs I., Aleksza M., Juhasz I., Acs P., Sipka S., Kovacs L., Blumberg P.M., Biro T. (2004):** Opposite roles of protein kinase C

- isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Life Sci* 61:1095-1105.
- Parekh A.B., Putney J.W. Jr. (2005):** Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85(2):757-810.
- Perez-Reyes E. (2003):** Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-61.
- Pessah I.N., Francini A.O., Scales D.J., Waterhouse A.L., Casida J.E. (1986):** Calcium-ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 261(19):8643-8.
- Pozzo-Miller L.D., Pivovarova N.B., Leapman R.D., Buchanan R.A., Reese T.S., Andrews S.B. (1997):** Activity-dependent calcium sequestration in dendrites of hippocampal neurons in brain slices. *J Neurosci* 17(22):8729-38.
- Qu-Petersen Z., Deasy B., Jankowski R., Ikezawa M., Cummins J., Pruchnic R., Mytinger J., Cao B., Gates C., Wernig A., Huard J. (2002):** Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 157(5):851-64.
- Ralevic V., Burnstock G. (1998):** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3):413-92.
- Rasmussen H., Kojima I., Kojima K., Zawulich W., Apfeldorf W. (1984):** Calcium as intracellular messenger: sensitivity modulation, C-kinase pathway, and sustained cellular response. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 18:159-93.
- Rios E., Brum G. (1987):** Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325:717-720.
- Rossi A.E., Dirksen R.T. (2006):** Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve* 33(6):715-31.
- Ruppelt A., Ma W., Borchardt K., Silberberg S.D., Soto F. (2001):** Genomic structure, developmental distribution and functional properties of the chicken P2X5 receptor. *J Neurochem* 77:1256-1265.
- Ryten M., Dunn P.M., Neary J.T., Burnstock G. (2002):** ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells. *J Cell Biol* 158:345-355.

- 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.
- Schneider M.F., Chandler W.K. (1973):** Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242:244-246.
- Schuhmeier R.P., 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– 78.
- Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki M.A. (2000):** Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102(6):777-86.
- Selvaraj A., Prywes R. (2003):** Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional coactivator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *J Biol Chem* 278:41977-41987.
- Sergeev I.N. (2005):** Calcium signaling in cancer and vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97(1-2):145-51.
- Shepro D., Morel N.M. (1993):** Pericyte physiology. *FASEB J* 7(11):1031-8.
- Siekierka J.J., Sigal N.H. (1992):** FK-506 and cyclosporin A: immunosuppressive mechanism of action and beyond. *Curr Opin Immunol* 4(5):548-52.
- Silinsky E.M. (1975):** On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J Physiol* 247:145-162.
- Slater M., Danieletto S., Gidley-Baird A., Teh L.C., Barden J.A. (2004):** Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology* 44(3):206-15.
- Slater M., Scolyer R.A., Gidley-Baird A., Thompson J.F., Barden J.A. (2003):** Increased expression of apoptotic markers in melanoma. *Melanoma Res* 13(2):137-45.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985):** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1):76-85.
- Sutko J.L., Airey J.A., Welch W., Ruest L. (1997):** The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol Rev* 49(1):53-98.

- Szappanos H., Cseri J., Deli T., Kovacs L., Csernoch L. (2004):** Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *J Biochem Biophys Methods* 59(1):89-101.
- Thomas S.A., Hume R.I. (1990):** Permeation of both cations and anions through a single class of ATP-activated ion channels in developing chick skeletal muscle. *J Gen Physiol* 95:569–590.
- Urano T., Nishimori H., Han H., Furuhata 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.
- Ursu D., Seville S., Dietze B., Freise D., Flockerzi V., Melzer W. (2001):** Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit gamma1. *J Physiol* 533:367-377.
- Verhoef P.A., Estacion M., Schilling W., Dubyak G.R. (2003):** P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol* 170(11):5728-38.
- von Kügelgen I., Starke K. (1985):** Noradrenaline and adenosine triphosphate as cotransmitters of neurogenic vasoconstriction in rabbit mesenteric artery. *J Physiol* 367:435-455.
- Wang G.J., Thayer S.A. (1996):** Sequestration of glutamate-induced Ca^{2+} loads by mitochondria in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 76(3):1611-21.
- Wang J.H., Waisman D.M. (1979):** Calmodulin and its role in the second-messenger system. *Curr Top Cell Regul* 15:47-107.
- Wang L., Feng Y.H., Gorodeski G.I. (2005):** Epidermal growth factor facilitates epinephrine inhibition of P2X7-receptor-mediated pore formation and apoptosis: a novel signaling network. *Endocrinology* 146(1):164-74.
- Wang Q., Wang L., Feng Y.H., Li X., Zeng R., Gorodeski G.I. (2004):** P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(5):C1349-58.
- Weinstein I.B. (1987):** Growth factors, oncogenes, and multistage carcinogenesis. *J Cell Biochem* 33:213-224.

- Wells D.G., Zawisa M.J., Hume R.I. (1995):** Changes in responsiveness to extracellular ATP in chick skeletal muscle during development and upon denervation. *Dev Biol* 172:585-590.
- White N., Butler P.E., Burnstock G. (2005):** Human melanomas express functional P2 X(7) receptors. *Cell Tissue Res* 321(3):411-8.
- White N., Ryten M., Clayton E., Butler P., Burnstock G. (2005):** P2Y purinergic receptors regulate the growth of human melanomas. *Cancer Lett* 224(1):81-91.
- Williams A.J., Tanna B. (2004):** The interaction of ryanoids with individual ryanodine receptor channels. *Biol Res* 37(4):527-38.
- Woodhouse E.C., Amanatullah D.F., Schetz J.A., Liotta L.A., Stracke M.L., Clair T. (1998):** Adenosine receptor mediates motility in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 246(3):888-94.
- Yasin R., Van Beers G., Nurse K.C., Al-Ani S., Landon D.N., Thompson E.J. (1977):** A quantitative technique for growing human adult skeletal muscle in culture starting from mononucleated cells. *J Neurol Sci* 32(3):347-60.
- Yeung D., Zablocki K., Lien C.F., Jiang T., Arkle S., Brutkowski W., Brown J., Lochmuller H., Simon J., Barnard E.A., Gorecki D.C. (2006):** Increased susceptibility to ATP via alteration of P2X receptor function in dystrophic mdx mouse muscle cells. *FASEB J* 20:610-620.
- Young H.E., Steele T.A., Bray R.A., Hudson J., Floyd J.A., Hawkins K., Thomas K., Austin T., Edwards C., Cuzzourt J., Duenzl M., Lucas P.A., Black A.C. Jr. (2001):** Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 264:51-62.
- Zaidi M., Moonga B.S., Huang C.L. (2004):** Calcium sensing and cell signaling processes in the local regulation of osteoclastic bone resorption. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79(1):79-100.
- Zhang X., Zhang M., Laties A.M., Mitchell C.H. (2005):** Stimulation of P2X7 receptors elevates Ca²⁺ and kills retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(6):2183-91.
- Zou H., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Fogarty K.E., Singer J.J. (1999):** Imaging Ca²⁺ entering the cytoplasm through a single opening of a plasma membrane cation channel *J Gen Physiol* 114:575-588.

IX. Ábrajegyzék

ÁBRÁK

1. ábra. A vázizom felépítésének hierarchiája.....	7
2. ábra. A sejtek Ca^{2+} -homeostasisa.....	13
3. ábra. Az ATP felszabadulása és extracelluláris metabolizmusa.....	15
4. ábra. Az emlős purinerg receptorok osztályozása és vázlatos szerkezete.....	16
5. ábra. A $\text{P2X}_7\text{R}$ aktivációját követő intracelluláris események vázlatos összefoglalása..	22
6. ábra. Melanocyta azonosítása immuncitokémiai festéssel.....	30
7. ábra. A PTI DeltaScan TM mérőrendszer felépítése.....	32
8. ábra. Extracellulárisan alkalmazott ATP C2C12 izomsejtekre kifejtett hatásának dózis- és korfüggése.....	42
9. ábra. KCl-depolarizáció C2C12 izomsejtekre kifejtett hatásának dózis- és korfüggése.....	43
10. ábra. Ismételt ATP- és KCl-adagolás hatása 7 napos C2C12 sejtek Ca^{2+} -tranzienseire.....	45
11. ábra. Ca^{2+} -mentes extracelluláris környezet hatása 7 napos C1C12 sejtek ATP és KCl kiváltotta Ca^{2+} -tranzienseire.....	45
12. ábra. PKC α és PKC δ izoenzimok overexpressziójának hatása a C2C12 sejtek proliferációjára és differenciációjára.....	46
13. ábra. PKC α és PKC δ izoenzimok overexpressziójának hatása fiatal (2 napos) és idős (9 napos) C2C12 izomsejtek ATP kiváltotta Ca^{2+} -tranzienseire.....	47
14. ábra. PKC α és PKC δ izoenzimok overexpressziójának hatása fiatal (2 napos) és idős (9 napos) C2C12 izomsejtek KCl-depolarizáció kiváltotta Ca^{2+} -tranzienseire.....	48
15. ábra. Purinerg receptorok expressziója kontroll és differenciálódó C2C12 sejtekben..	50
16. ábra. Az ATP hatásának dóziszfüggése 5-10 magvú primer egér myotubulusokban.....	51
17. ábra. ATP által kiváltott áram- (I_{ATP}) és membránpotenciál- (MP) változások primer egér myotubulusok fejlődésének különböző stádiumaiban.....	52
18. ábra. ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek és -fluxusok (FL) primer tenyésztett egér vázizomsejtek fejlődésének különböző stádiumaiban.....	54
19. ábra. Ismételt ATP-adagolás hatása primer egér vázizomsejtek Ca^{2+} -tranzienseire a fejlődés különböző stádiumaiban.....	55
20. ábra. ATP-adagolás hatása depolarizált sejteken és az extracelluláris Ca^{2+} eltávolítását követően primer egér vázizomsejteken a fejlődés különböző stádiumaiban.....	57
21. ábra. Primer egér myotubulusokon kifejeződő purinoreceptorok immuncitokémiai azonosítása.....	58

22. ábra. Primer egér myotubulusokon kifejeződő purinoreceptorok farmakológiai azonosítása I.: suramin hatása.....	59
23. ábra. Primer egér myotubulusokon kifejeződő purinoreceptorok farmakológiai azonosítása II.: specifikus agonisták hatása.....	60
24. ábra. Primer egér myotubulusokon kifejeződő purinoreceptorok azonosítása siRNS technikával.....	62
25. ábra. A P2X ₇ receptor szerepének vizsgálata primer egér vázizomsejtek ATP indukálta ionáramaiban.....	64
26. ábra. Extracelluláris ATP hatása melanocyták és melanoma sejtek [Ca ²⁺] _i -jára.....	65
27. ábra. Melanoma sejtekben expresszáldó purinoreceptor típusának azonosítása I.: immundetekció.....	67
28. ábra. Melanoma sejtekben expresszáldó purinoreceptor típusának azonosítása II.: farmakológiai sajátosságok.....	68
29. ábra. P2X ₇ receptor agonisták és antagonisták hatása melanoma sejtek apoptózisára, necrosisára és metastasisképzésére.....	70
30. ábra. Rianodin receptor (RyR) jelenlétének és lokalizációjának vizsgálata melanoma sejtekben.....	71
31. ábra. Rianodin receptor agonisták hatása melanocyták és melanoma sejtek [Ca ²⁺] _i -jára.....	73
32. ábra. A rianodin csökkenti a melanoma sejtek ATP-re adott Ca ²⁺ -válaszát.....	74
33. ábra. Különböző [Ca ²⁺] _i -szintek hatása a sejt sorsára.....	89

TÁBLÁZATOK

1. táblázat. A purinerg receptorok agonistái és antagonistái.....	18
2. táblázat. Az immuncito- és -hisztokémiai vizsgálatokban használt antitestek.....	35
3. táblázat. Differenciált C2C12 myotubulusok KCl-depolarizáció és ATP által kiváltott Ca ²⁺ -tranzienseinek kinetikai paraméterei.....	44
4. táblázat. Egér primer vázizomsejtek Ca ²⁺ -tranzienseinek és -fluxusainak egyes paraméterei a differenciáció különböző stádiumaiban.....	53

X. Köszönetnyilvánítás

Ez úton is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Csernoch Lászlónak, hogy éveken keresztül irányította munkámat és minden segítséget megadott, amire szükség volt az ebben a dolgozatban bemutatott eredmények megszületéséhez. Köszönöm, hogy mindig nyitva állt előttem az ajtaja és a számtalan hosszabb-rövidebb emlékezetes és tanulságos beszélgetést tudományról és nem tudományról.

Köszönettel tartozom Dr. Kovács Lászlónak és Dr. Csernoch Lászlónak, hogy intézetigazgatóként biztosították a kutatás feltételeit és mindig érezhettem maximális támogatásukat.

Köszönöm Cserné Dr. Szappanos Henriettának, hogy oly sokat foglalkozott velem, amikor tudományos diákkörösként elkezdtem a munkát a laborban – a legfontosabb gyakorlati ismereteket tőle sajátítottam el.

Köszönöm minden társszerzőmnek és kollaborációs partnerünknek az eredményes közös munkát és mindazt, amit együttműködésünk során tőlük megtanulhattam. Külön köszönet illeti Ruzsnavszky Olga orvostanhallgatót, aki az egyes módszerek elsajátítása után komoly szerepet vállalt a disszertációban szereplő kísérletek elvégzésében, továbbá az Országos Onkológiai Intézet Tumorprogressziós Osztályán Dr. Tímár Józsefet és munkatársait a melanomákkal és melanocytákkal, illetve intézetünkben Dr. Bíró Tamást és Tóth István Balázst a protein-kináz C-vel kapcsolatos gyümölcsöző együttműködésért.

A sejtenyésztési és oldatkészítési munkában fáradhatatlanul segített Tálásné Őri Róza és Dr. Varga Attiláné, az ő munkájukat is köszönöm.

Köszönöm az Élettani Intézetben dolgozó összes embernek azt a jókedvű és baráti légkört, amiben mindig öröm volt bemenni az Intézetbe.

Végül köszönet a szüleimnek, akik sok-sok év alatt megteremtették a lehetőséget, hogy azzal foglalkozhassak, amit szeretek, és a páromnak, aki sosem szűnt meg türelmes lenni és végighallgatni, illetve biztatni, amikor frusztrált vagy éppen sikertelen voltam.

XI. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények, előadások és poszterek.

KÖZLEMÉNYEK:

Deli T., Szappanos H., Szigeti Gy.P., Cseri J., Kovács L., Csernoch L. (2006): Contribution from P2X and P2Y purinoreceptors to ATP-evoked changes in intracellular calcium concentration on cultured myotubes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (Közlésre elfogadva, doi: 10.1007/s00424-006-0146-6) [IF: 3,564]

Deli T., Tóth I.B., Czifra G., Szappanos H., Bíró T., Csernoch L. (2006): Differences in purinergic and voltage-dependent signalling during protein kinase Ca overexpression- and culturing-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* (Közlésre elfogadva, doi: 10.1007/s10974-006-9096-z) [IF: 1,338]

Deli T., Varga N., Ádám A., Rásó E., Puskás L.G., Burján Zs., Ladányi A., Kenessey I., Tóvári J., Fehér M., Szigeti Gy.P., Csernoch L., Tímár J.: Functional Genomics of Calcium Channels in Human Melanoma Cells. *International Journal of Cancer* (Közlésre beküldve)

Szigeti Gy.P., Szappanos H., **Deli T.**, Cseri J., Kovács L., Csernoch L. (2006): Differentiation-dependent alterations in the extracellular ATP-evoked calcium fluxes of cultured skeletal muscle cells from mice. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (Közlésre elfogadva, doi: 10.1007/s00424-006-0145-7) [IF: 3,564]

ELŐADÁSOK:

Deli T., Ruzsnavszky O., Szentesi P., Csernoch L. (2005): A rianodin receptor és a P2X₇ purinoreceptor kölcsönhatásának lehetséges szerepe melanociták transzformációjában. *Membrántranszport Konferencia*, Sümeg.

Deli T., Ruzsnavszky O., Szentesi P., Szigeti Gy.P., Csernoch L. (2005): Az intracelluláris kalciumhomeosztázis vizsgálata melanocitákon és melanoma sejtvonalakon. *Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése*, Budapest.

Tímár J., **Deli T.**, Csernoch L., Rásó E. (2005): Genomics of calcium signaling in human melanoma. *10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine*, Kréta, Görögország.

POSZTEREK:

Deli T., Szappanos H., Cseri J., Kovács L., Csernoch L. (2003): Purinerg és feszültségfüggő jelátvitel vizsgálata C2C12 harántcsíktolt izomsejteken. *Magyar Élettani Társaság LXVII. Vándorgyűlése*, Pécs.

Deli T., Ruzsnavszky O., Szigeti Gy. P., Tóvári J., Kenessey I., Tímár J., Csernoch L. (2006): Rianodin receptor (RyR)-P2X₇ purinoceptor kölcsönhatás szerepe a malignus transzformációban. *Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése*, Szeged.

Tímár J., Raso E., **Deli T.**, Csernoch L. (2006): Genomics of calcium signaling in human melanoma. 2006. 97th American Association for Cancer Research Annual Meeting, Washington, DC, USA. (Abstract: *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2006;47:4178.)

Az értekezésben fel nem használt közlemények, előadások és poszterek.

KÖZLEMÉNYEK:

Szappanos H., Cseri J., **Deli T.**, Kovacs L., Csernoch L. (2004): Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 59(1):89-101. [IF: 1,302]

Csoma E., **Deli T.**, Kónya J., Csernoch L., Beck Z., Gergely L. (2006): Human herpesvirus 6A decreases the susceptibility of macrophages to R5 variants of human immunodeficiency virus 1: possible role of RANTES and IL-8. *Virus Research* (Közlésre elfogadva, doi:10.1016/j.virusres.2006.05.007) [IF: 2,562]

Deli T., Almássy J., Szentesi P., Jung C., Fehér M., Dienes B., Simut C.A., Niggli E., Jona I., Csernoch L.: Altered sarcoplasmic reticulum calcium transport in the presence of the heavy metal chelator TPEN. *Biochimica et Biophysica Acta* (Közlésre beküldve)

ELŐADÁS:

Szentesi P., Simut C., **Deli T.**, Csernoch L. (2005): Egy alacsony affinitasu kalcium puffer hatása az elemi kalciumfelszabadulási eseményekre harantcsikolt izmokban. *Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa*, Debrecen.

POSZTER:

Szentesi P., Simut C., **Deli T.**, Csernoch L. (2005): Travelling elementary calcium release events in the presence of a low affinity calcium buffer in skeletal muscle fibres. XXXIVth European Muscle Conference, Hortobágy. (Abstract: *J Muscle Res Cell M*, 2005 26(1): 63.)

XII. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai.