

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A vázizom Ca^{2+} -homeosztázisának módosulása egyes regulatórikus- és csatornafehérjék overexpressziója esetén

Oláh Tamás

Témavezető:
Prof. Dr. Csernoch László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Élettan és Neurobiológia Ph.D. program

DEBRECEN

2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke	4
Kulcsszavak.....	5
Keywords	5
Bevezetés	6
Irodalmi háttér	6
A vázizom felépítése és élettana	6
A Ca^{2+} -homeosztázis, és jelentősége a sejtekben.....	8
A sejtek Ca^{2+} -raktára, az endoplazmatikus / szarkoplazmatikus retikulum (ER/SR)	9
Az inozitol triszfoszfát (IP_3) útvonal.....	10
Az IP_3 útvonal jelentősége a vázizomban	12
Az IP_3R struktúrája, szabályozása és előfordulása.....	13
A triadin izomfehérjék	16
A 32 kDa-os vázizom triadin (Trisk 32)	19
A raktár által vezérelt kalciumbelépés (SOCE)	21
A kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornák 1. altípusa (TRPC1).....	23
A sztrómális kölcsönható molekula 1 (STIM1)	27
Az Orai1 csatorna.....	28
Célkitűzések	29
A Trisk 32 funkciójának vizsgálata.....	29
A TRPC1 funkciójának vizsgálata	30
Anyagok és módszerek.....	31
Sejttenyésztés és transzfekció	31
L6.G8 patkány myoblastok	31
C2C12 egér myoblastok és izomcsövek.....	32
Liposzóma-mediált stabil transzfekció.....	32
Polimeráz láncreakció (PCR).....	33
Immuncitokémia.....	34
Fehérjeminták és sejtmagfrakciók készítése	35
Ko-immunoprecipitáció	36
Western-blot analízis.....	37
Apoptózis vizsgálata	38
Életképesség vizsgálata	38
A proliferációs ráta és a fúziós index meghatározása	39
A proliferáció mértékének meghatározása ^3H -timidin beépüléssel	39
NFAT riporter rendszer, X-Gal festés.....	40
Egyedi sejteken történő fluoreszcens, intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -mérés	40
Az intracelluláris kalciumkoncentráció és a kalciumfluxus kiszámítása	43
Konfokális mikroszkópos mérések	43
Adatelemzés és statisztika.....	45
Eredmények	46
I. A Trisk 32 funkciójának vizsgálata	46
Sejttenyésztés és transzfekció	46
A Trisk 32 és az IP_3 receptor kapcsolódása	48
Az IP_3 útvonalban részt vevő membránreceptorok kimutatása.....	49
A Trisk 32 overexpressziójának hatása az IP_3R működésére	49
A Trisk 32 overexpressziójának hatása a SOCE-ra	53
A Trisk 32 overexpressziójának hatása a RyR működésére	55

II. A TRPC1 overexpressziójának hatásai.....	57
Sejttenyésztés és transzfekció	57
Apoptózis és életképesség vizsgálata	58
A TRPC1 túltermeltetésének hatása a SOCE-ra és a Ca^{2+} -homeosztázisra.....	59
A Ca^{2+} -homeosztázisban részt vevő egyéb fehérjék expressziójának és funkcionális aktivitásának változása	62
A kontroll és a TRPC1-et túltermelő sejtek differenciálódásának összehasonlítása	66
Megbeszélés.....	69
I. A Trisk 32 overexpressziója fokozza az IP_3R működését	69
II. A TRPC1 overexpressziója felerősíti a SOCE-t.....	73
Összefoglalás.....	78
Summary.....	81
Irodalomjegyzék.....	83
Közlemények listája	94
Előadások, poszterek listája	96
Idézhető, angol nyelvű absztraktok.....	96
Angol nyelvű előadások.....	96
Magyar nyelvű előadások.....	96
Angol nyelvű poszterek.....	97
Magyar nyelvű poszterek	97
Köszönetnyilvánítás	99

Rövidítések jegyzéke

7TM receptor: 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptor	MARCKS: myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
[Ca ²⁺] _e : extracelluláris kalciumkoncentráció	MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid
[Ca ²⁺] _i : intracelluláris kalciumkoncentráció	NFAT: nuclear factor of activated T-cells (aktivált T-sejtek nukleáris faktora)
AM: acetoxi-metilészter	NTY: normál Tyrode-oldat
AU: arbitrary unit (önkéntes egység)	OAG: 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
AVP: arginin-vazopresszin	PBS: phosphate-buffered saline (foszfát puffer-oldat)
BCA: bicinchoninic acid	PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
BK: bradykinin	PIP ₂ : phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát)
BSA: borjúsérum albumin	PKC: proteinkináz C
CAD: CRAC-aktiváló domén	PLC: phospholipase C (foszfolipáz C)
CaM: calmodulin (kalmodulin)	PMCA: plazmamembrán Ca ²⁺ -ATPáz
CCCP: carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenyl hydrazone	PTI: Photon Technology International
CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid	PV _{max} : a Ca ²⁺ -pumpa maximális transzportkapacitása
CICR: calcium-induced calcium release (kalcium-indukált kalciumfelszabadulás)	RCAN: regulator of calcineurin (a calcineurin szabályozófehérjeje)
CIF: Ca ²⁺ influx faktor	ROI: region of interest (releváns tartomány)
CMF-PBS: Ca ²⁺ -Mg ²⁺ free phosphate-buffered saline (Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -mentes foszfát puffer oldat)	RT-PCR: reverz transzkripció polimeráz láncreakció
CRAC: Ca ²⁺ release activated Ca ²⁺ channel (Ca ²⁺ -felszabadulás által aktivált Ca ²⁺ -csatorna)	RyR: ryanodine receptor (rianodinreceptor)
CRACM: CRAC modulátor	RyR1: ryanodine receptor type1 (rianodinreceptor 1. altípusa)
CREB: cAMP response element-binding protein	SCID: severe combined immunodeficiency (súlyos kombinált immunhiány)
CSQ: calsequestrin	SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (Na ⁺ -dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis)
CT1, CT2, CT3: cardiac triadin 1, 2, 3 (szívizom triadin 1, 2, 3)	SE: standard error (standard hiba)
DAG: diacylglycerol	SERCA: szarko- endoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole	siRNS: kis interferáló RNS
DHPR: dihidropiridin-receptor	SOAR: STIM1 Orai-aktiváló régiója
DMD: Duchenne muscular dystrophy (Duchenne-féle izomdisztrófia)	SOCE: store-operated calcium-entry (raktár által vezérelt kalciumbelépés)
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Dulbecco által módosított Eagle-féle médium)	SOC: store-operated channel (raktár által vezérelt csatorna)
DTT: dithiothreitol	SR: szarkoplazmatikus retikulum
ECC: excitation-contraction coupling (elektromechanikai csatolás)	STIM1: stromal interaction molecule 1 (sztrómális kölcsönható molekula 1. altípusa)
ECL: enhanced chemiluminescence (megnövelt kemilumineszcencia)	TG: thapsigargin
ER: endoplazmatikus retikulum	TM: transzmembrán
ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (extracelluláris szignál szabályozta kináz 1 és 2)	Trisk 32: triadin skeletal 32 kDa (triadin vázizomfehérje 32 kDa-os izoformája)
FBS: foetális borjúsérum	TRP: tranziens receptorpotenciál
FITC: fluoreszcein-izotiocianát	TRPC: transient receptor potential canonical (kanonikus tranziens receptorpotenciál csatorna)
G-protein: guanin nukleotid kötő protein	TRPC1: transient receptor potential canonical type 1 (kanonikus tranziens receptorpotenciál csatorna 1. altípusa)
GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz	XesC: Xestospongine C
GDP: guanozin-difoszfát	
GTP: guanozin-trifoszfát	
HRP: horse-radish peroxidase (tormaperoxidáz)	
HS: horse serum (lósérum)	
IP ₃ : inozitol 1,4,5-triszfoszfát	
IP ₃ R: inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor	
IP ₃ R-I/II/III: inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor I./II./III. altípusa	
KO egér: knockout egér	

YM-58483: 4-methyl-40-[3,5-bis(trifluoromethyl)-
1Hpyrazol-1-yl]-1,2,3-thiadiazole-5-

carboxanilide

Kulcsszavak

Vázizom, szarkoplazmatikus retikulum, IP₃ receptor, raktár által vezérelt kalciumbelépés (SOCE), TRPC1, triadin, Trisk 32, Fura-2, egyedi sejten történő Ca²⁺-mérés, kalciumtranziens

Keywords

Skeletal muscle, sarcoplasmic reticulum, IP₃ receptor, store-operated calcium-entry, TRPC1, triadin, Trisk 32, Fura-2, single cell Ca²⁺-measurement, calcium transient

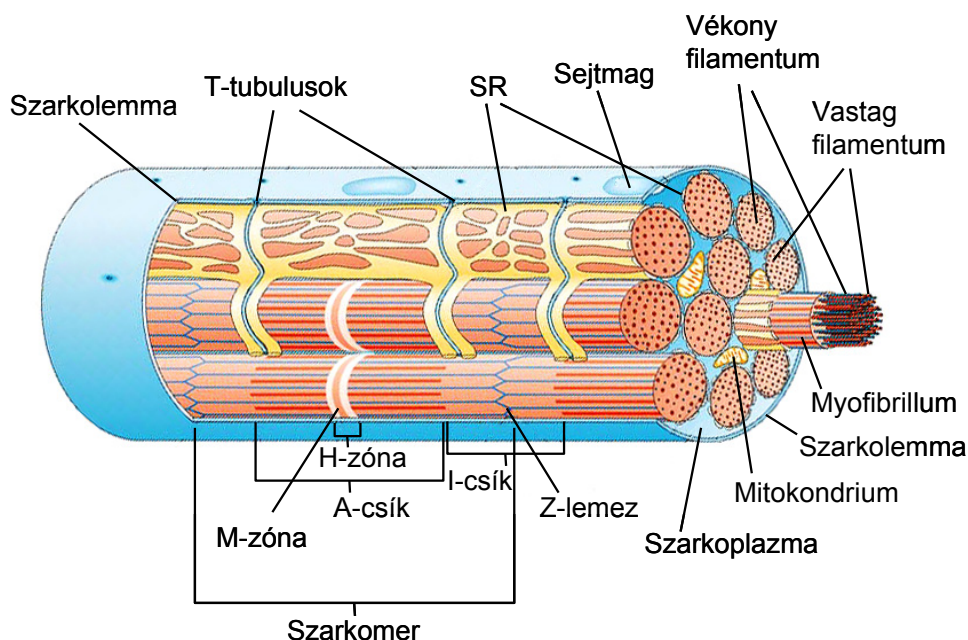
Bevezetés

Irodalmi háttér

A vázizom felépítése és élettana

Gerincesekben a vázizom a csontok egymáshoz képest történő elmozdítására szolgál, felnőtt emberben a testtömeg kb. 40-45%-át teszi ki. Az egyedfejlődés során a kezdetben különálló izomsejtek (myoblastok) többmagvú izomcsövekké (myotubulusokká), majd hosszú, henger alakú, nem elágazó óriássejttekké, izomrostokká fuzionálnak, melyek átmérője 10-100 μm , hossza akár 30-40 cm is lehet. Az izomrostok sejtmembránját szarkolemmának, citoplazmáját szarkoplazmának nevezzük. Az intracelluláris térben található az izomösszehúzódásban résztvevő kontraktilis elemek, a myofibrillumok, melyek myofilamentumokból állnak: a főként miozint tartalmazó vastag filamentumokból, és az aktint és szabályozó fehérjét (tropomiozin, troponin) tartalmazó vékony filamentumokból (Fonyó 1999, Davies & Novak 2006, Röhlich 2006).

A vázizomrostok jellemző sajátossága a harántcsíkolat, ami a rostok hossz tengelye mentén szabályosan váltakozó sötétebb, vastag és vékony filamentumokat egyaránt tartalmazó (anizotrop, A-csík), és világosabb, csak vékony filamentumokat tartalmazó (izotrop, I-csík) szakaszok váltakozásából ered (1. ábra). Az A-csík közepén van a keskeny, világosabb H-zóna, a közepén az M-zónával (itt a vastag filamentumok között fehérjékből álló, hálózatos összeköttetés alakul ki). Az I-csíkok közepén található a Z-lemez, mely vázként szolgál, hozzá kapcsolódnak a vékony aktin filamentumok. A két Z-lemez közötti részt nevezzük szarkomernek. Izomösszehúzódáskor az I-csík vékony filamentumai becsúsznak az A-csík vastag filamentumai közé, így a szarkomer megrövidül. Ezt a folyamatot csúszófilamentum-mechanizmusnak nevezzük, melynek molekuláris alapját az képezi, hogy a miozin feji régiója hozzákötődik az aktin filamentumhoz (kereszt hidakat képez), konformációváltozás következtében begömbül, ezzel az aktin filamentumot kissé elcsúsztatja, majd leválik az aktinról és visszatér eredeti konformációjába. Az így végzett munkához energia szükséges, amelyet a miozin ATP-bontásból nyer. Az elcsúszás következtében a két filamentum együttes hossza megrövidül (Cooke 1997, Fonyó 1999, Davies & Novak 2006).



1. ábra. A vázizom felépítése. A képen egy harántcsíkolt izomrost vázlatos rajza látható a fontosabb sejtalkotókkal, a myofilamentumokkal, és a harántcsíkolat magyarázatával. (Davies & Novak 2006 alapján)

A myofilamentumokat a szarkoplazmatikus retikulum (SR) membránrendszere veszi körül, melynek a hosszanti elhelyezkedésű csövei az L-tubulusok, az A és I-csík határánál található, kiszélesedő végei a terminális ciszternák. A terminális ciszternák között a felszíni membrán a myofibrillumokra merőlegesen, mélyen betüremkedik az izomrost belsejébe, ezeket nevezzük transzverzális tubulusoknak (T-tubulusok). A T-tubulus, és a hozzá két oldalról csatlakozó terminális ciszternák alkotják a triádot (Fonyó 1999, Röhlich 2006, Sorrentino 2011).

A triádban történik meg az elektromechanikai csatolás (ECC), melynek során a motoneuronról érkező akciós potenciál a szarkolemmán végigterjedve bejut a T-tubulusokba, itt aktiválja a vázizom feszültségérzékelőit, az L-típusú Ca^{2+} -csatornákat vagy dihidropiridin-receptorokat (DHPR), melyek a konformációjuk megváltozásával előidézik az SR terminális ciszternájában található Ca^{2+} -csatornák, a rianodinreceptorok (RyR) megnyílását, és az SR-ben tárolt Ca^{2+} felszabadulását (pl. Schneider 1994, Franzini-Armstrong & Protasi 1997). A felszabaduló Ca^{2+} újabb RyR-okat nyithat meg (Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás – CICR segítségével), ami tovább fokozza az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedését. A kiáramló Ca^{2+} a vékony filamentum felszínén található szabályozó fehérjéhez, a troponin-C-hez kötődik, ami a tropomiozin elmozdulását és ezzel az aktin és a miozinej kötődését idézi elő, miáltal beindul az aktin és miozin egymáshoz viszonyított elcsúszása, és bekövetkezik a vázizom

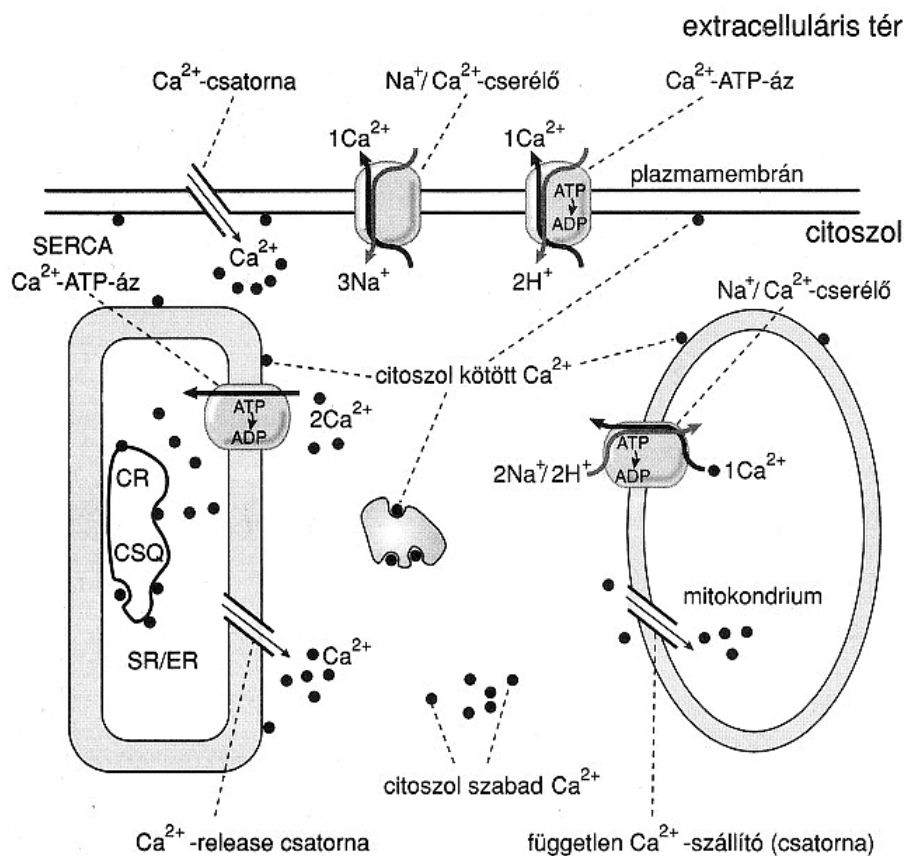
kontrakciója. A nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -szintet ezután az SR Ca^{2+} -pumpája (SERCA) állítja vissza (Fonyó 1999, Endo 2006, Röhlich 2006).

A Ca^{2+} -homeosztázis, és jelentősége a sejtekben

Gerinces élőlényekben a legnagyobb mennyiségben előforduló kation a Ca^{2+} (emberben 20-30 g/kg), melynek legnagyobb része a csontokban raktározódik hidroxipapatit formában megkötve. A Ca^{2+} a többi sejtben is nagyrészt fehérjékhez vagy membránhoz kötött formában található meg, csak egy kis része van szabad ionos formában (Pozzan et al. 1994, Szabó 2004). Az extracelluláris tér szabad Ca^{2+} -koncentrációja ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) kb. 1,2 mM, míg a citoszolé a legtöbb sejtben 100-200 nM között van. Ez a koncentráció több nagyságrenddel kisebb, mind az extracelluláris, mind a sejtorganellumokban található Ca^{2+} -koncentrációnál. Az alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ energetikailag kedvezővé teszi az ion másodlagos hírvivőként való felhasználását: viszonylag kis mennyiségű ion energiaigényes mozgatása nagy $[\text{Ca}^{2+}]$ változásokat eredményez. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) megváltozása kritikus fontossággal bír számos sejt folyamat irányításában, mint például a sejtmozgás, sejtosztódás, differenciálódás, kontrakció, szekréció, apoptózis, szenzoros érzékelés és a neuronális jelátvitel (Berridge 1993, Yoshida & Imai 1997, Vermassen et al. 2004). Az extracelluláris Ca^{2+} belépése és az endoplazmatikus retikulumban (ER) tárolt Ca^{2+} felszabadulása változatos és komplex Ca^{2+} -jelek kialakulását teszi lehetővé, amelyek nélkülözhetetlenek az előbb felsorolt folyamatok specifikus szabályozásához.

Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szabályozásához és alacsonyan tartásához ezért nagyon hatékony rendszerek szükségesek (2. ábra). A plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz (PMCA) szinte minden szövettípusban megtalálható, nagy affinitású (működési tartománya a normál $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tartományban van) és kis kapacitású (az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban bekövetkező kis változások finom szabályozására alkalmas) ionpumpa, ami az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkenését okozza. A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -antiport ideg- és szívizomsejtekben található, kis affinitású (a normál $[\text{Ca}^{2+}]_i$ többszörösénél aktiválódik) és nagy kapacitású (nagy mennyiségű Ca^{2+} eltávolítására alkalmas) transzporter. A Ca^{2+} az extracelluláris térből, különböző ioncsatornákon keresztül, a koncentrációgradienst kihasználva, szabályozottan juthat be a sejtbe. Ezek a csatornák lehetnek feszültségvezéreltek, vagy ligandok és másodlagos hírvivők által vezéreltek. A sejtben belül a Ca^{2+} az ER Ca^{2+} -raktáraiban található meg a legnagyobb koncentrációban. E raktárak Ca^{2+} -felvételét a szarko- endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz (SERCA) biztosítja, amely a nagy affinitású, nagy kapacitású transzporterekhez tartozik. A SERCA pumpák jelentősége olyan nagy, hogy vázizomban az SR membránfehérjéinek több mint 90%-át ők alkotják. Az ER-ből a Ca^{2+} -

felszabadulás az inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptoron (IP₃R) és a rianodinreceptoron (RyR) keresztül történhet. Az ER-en kívül a mitokondriumok is jelentős, nagy kapacitású, de csekély affinitású Ca²⁺-raktárak (Berridge et al. 2003, Szabó 2004).



2. ábra. A sejtek Ca²⁺-homeosztázisában részt vevő főbb transzportmechanizmusok. Az [Ca²⁺]_i megnövelése az extracelluláris térből különböző Ca²⁺-csatornákon keresztül, vagy az SR/ER-ből történő Ca²⁺-felszabadulással valósulhat meg. A Ca²⁺ eltávolításáért a SERCA, a Na⁺/Ca²⁺-cserélő, és a plazmamembrán Ca²⁺-ATPáz felelős (Szabó 2004). A rövidítések magyarázata: CR: kalretikulin, CSQ: calsequestrin, SR/ER: szarko-/endoplazmatikus retikulum, SERCA: szarko- endoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATPáz.

A sejtek Ca²⁺-raktára, az endoplazmatikus / szarkoplazmatikus retikulum (ER/SR)

A legtöbb eukarióta sejt egy összefüggő, lipid kettős réteggel határolt, elsősorban lapos ciszternákból álló membránrendszert tartalmaz, melyet endoplazmatikus retikulumnak (ER) nevezünk. Az ER membránja folytonos a magmembrán külső lemezével, ezért a magmembrán két rétege közötti tér és az ER lumene egy összefüggő üregrendszert alkot. Az ER-nek két fő típusát különböztetik meg, a durva felszínű ER-t (DER), és a sima felszínű ER-t (SER). A durva ER a felszínén található nagyszámú riboszómáról kapta a nevét, és a fehérjék szintézisében és poszttranszlációs módosításában vesz részt. A sima ER részt vesz a detoxifikációban, a lipidszintézisben és a Ca²⁺-raktározásban. A Ca²⁺-raktározásra specializálódott sima ER-t a vázizom esetében szarkoplazmatikus retikulumnak (SR) nevezzük (Szabó 2004, Sorrentino 2011).

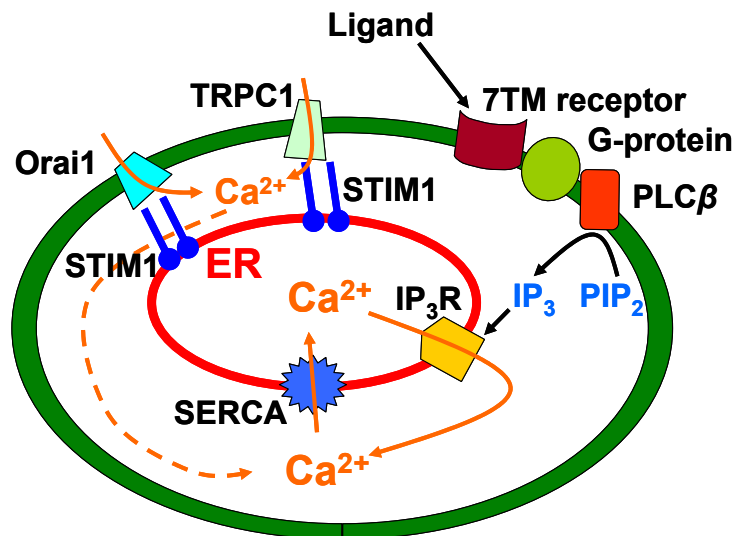
Az ER/SR lumenében található Ca^{2+} egy része szabad marad, többsége azonban Ca^{2+} -ot raktározó fehérjékhez kötődik. Ezek közül a legfontosabbak a calsequestrin (CSQ) és a kalretikulin, melyek nagyszámú, csekély affinitású, nem specifikus Ca^{2+} -kötő hellyel rendelkeznek (20-50 Ca^{2+} /molekula, $K_d=1-4$ mM). A CSQ szinte kizárólag izomsejtekben található meg, míg a kalretikulin minden sejttypusban előfordul. A fő feladatuk a Ca^{2+} -raktárakban a Ca^{2+} -tárolás biztosítása, és az ER/SR lumenében a $[\text{Ca}^{2+}]$ változások pufferolása. Az ER-ben a teljes $[\text{Ca}^{2+}]$ kb. 10 mM, amiből a szabad (ionizált) $[\text{Ca}^{2+}]$ néhány mM-t tesz ki. Ezt tartják állandó értéken a Ca^{2+} -kötő fehérjék. A stabil lumenális $[\text{Ca}^{2+}]$ az ER egyéb funkcióiban is fontos szerepet játszik, pl. számos fehérje harmadlagos struktúrájának fenntartásában (Szabó 2004, Royer & Ríos 2009). Az SR felszínén nem csak Ca^{2+} -csatornák, hanem nagy permeabilitású K^+ és Cl^- csatornák is találhatóak, amelyek a Ca^{2+} -felszabadulás és -visszavétel során létrejövő feszültségkülönbségeket ki tudják egyenlíteni a rajtuk keresztül mozgó ionok kompenzáló mozgásával. Így az SR membránon keresztüli Ca^{2+} -mozgás nem generál membránpotenciál-változásokat (Fonyó 1999).

Az inozitol triszfoszfát (IP_3) útvonal

A sejtek működésében fontos szerepe van az ER-ből történő Ca^{2+} -felszabadulásnak, ami a legtöbb sejttypus esetében az IP_3R -on keresztül valósul meg. Az IP_3R működésével és az aktivációjában részt vevő jelátviteli útvonalakkal számos cikk foglalkozik (összefoglalók pl. Yoshida & Imai 1997, Vermassen et al. 2004, Foscett et al. 2007). A sejtet érő stimulusok – mint például neurotranszmitterek, hormonok, és növekedési faktorok – különféle, a plazmamembránban található, 7 transzmembrán doménnel rendelkező (7TM), guanin nukleotid kötő proteinhez (G-protein) kötött, illetve tirozinkináz aktivitással rendelkező receptorokat aktiválhatnak, melyek ezután a foszfolipáz C (PLC) enzimet aktiválják. A PLC a plazmamembránt alkotó foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfátot (PIP_2) hidrolizálja, aminek következtében inozitol 1,4,5-triszfoszfát (IP_3) és diacilglicerol (DAG) keletkezik (Yoshida & Imai 1997). Az IP_3 – egy kis, vízben jól oldódó, a citoszolban könnyen diffundáló molekula – másodlagos hírvivőként fontos szerepet játszik az IP_3 receptor megnyitásán keresztül az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadításban (Berridge & Irvine 1984) (3. ábra), míg a DAG a membránhoz kötve marad és a proteinkináz C-t (PKC) aktiválja.

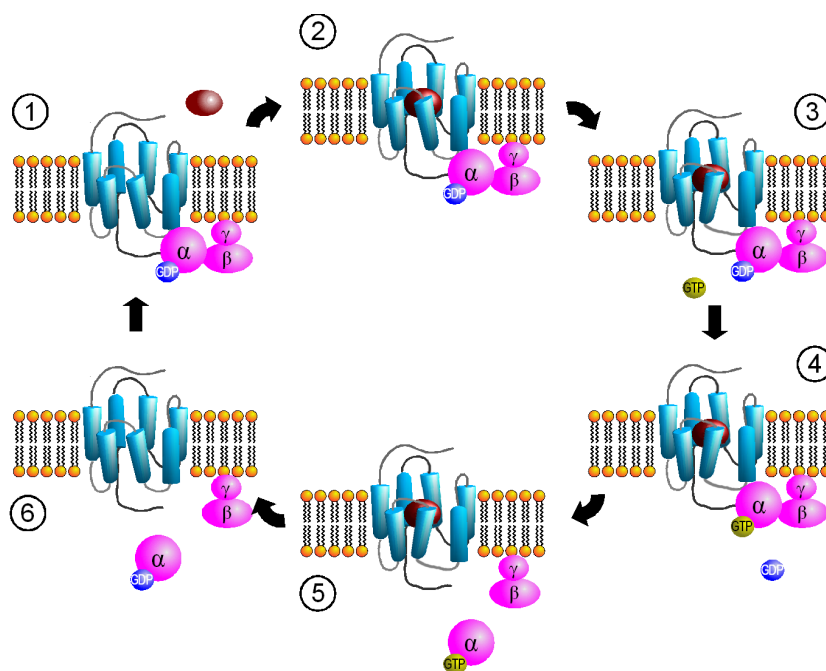
Az IP_3R megnyílására bekövetkező $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés kétfázisú folyamat (Berridge & Irvine 1984, Putney 1986). Az ER Ca^{2+} -raktárának kiürülése beindít egy olyan jelátviteli útvonalat, amely a Ca^{2+} plazmamembránon keresztüli belépéséért, így többek között a raktárak újratöltéséért felelős. A folyamatnak ezt a második felét kapacitativ, vagy raktár által

vezérelt Ca^{2+} -belépésnek (SOCE) nevezzük (Parekh & Putney 2005, Bird et al. 2008). A SOCE mechanizmusról és a benne résztvevő fehérjékről a Bevezetés későbbi alfejezeteiben található további információ.



3. ábra. Az IP_3 útvonal egyik lehetséges változata. Miután egy ligand a sejtfelszíni receptorához kötődött, egy G-proteinen keresztül aktiválja a PLC-t. A PLC a plazmamembránban található PIP_2 -t IP_3 -má konvertálja, ami az IP_3R -on keresztül az ER/SR Ca^{2+} -raktárából Ca^{2+} -felszabadulást vált ki. A raktár újratöltése a SOCE mechanizmussal valósul meg, a STIM1, Orai1, és TRPC1 molekulák segítségével. (A rövidítések magyarázata a szövegben.)

Két olyan fontosabb jelátviteli útvonal van, ami a PLC-t aktiválhatja. Az egyik ezek közül a tirozinkináz aktivitású receptorok, a másik a 7 transzmembrán doménnel rendelkező, G-proteinhez kötött receptorok (pl. B1, B2 bradykinin, V1a, V1b vazopresszin, H1 hisztamin receptorok, stb.) közreműködésével valósul meg. Ez utóbbi receptorok G-proteinek segítségével $\text{PLC}\beta$ izoformákat aktiválnak (Yoshida & Imai 1997). A G-proteinek három polipeptidből épülnek fel: egy α alegységből mely köti és hidrolizálja a guanozin-trifoszfátot (GTP), valamint egy β és egy γ alegységből, melyek dimert képeznek és csak akkor disszociálnak le egymásról, ha a fehérje denaturálódik (ezáltal funkcionális monomert alkotnak). Inaktív állapotban az α a $\beta\gamma$ alegységgel asszociálódva heterotrimert képez, guanozin-difoszfátot (GDP) köt, és a 7TM receptorhoz kapcsolódik. Ha a receptor aktiválódik és megváltozik a konformációja, a GDP-t kötő α alegység konformációja is megváltozik, így csökken az affinitása a GDP iránt, a GDP ledisszociál, helyette GTP kötődik be. Ekkor az α alegység aktiválódik, és ledisszociál a receptorról és a $\beta\gamma$ alegységről. A szabad α és $\beta\gamma$ alegységek különböző $\text{PLC}\beta$ izoenzimeket aktiválnak, de eközben az α alegység a saját GTPáz aktivitásával a kötött GTP-t GDP-vé hidrolizálja. Ennek hatására az α és $\beta\gamma$ alegységek újra asszociálódnak, inaktiválódnak, és visszakötődnek a receptorukhoz, lehetővé téve a receptor újabb aktiválódását (4. ábra) (Neer 1995).



4. ábra. A G-proteinek aktivációs ciklusa. (1) a receptor, és a hozzá kapcsolódó G-protein inaktív állapotban vannak, a G_α alegység GDP-t köt. (2) A receptorhoz kötődik a ligandja, ezáltal megváltozik a konformációja. (3-4) Az α alegység konformációja is megváltozik, így GDP helyett GTP-t fog kötni. (5) Az α alegység ledisszociál a receptorról és a $\beta\gamma$ alegségről, aktiválja a PLC-t. (6) Az α alegység GDP-vé hidrolizálja a GTP-t, így újra bekötődik a receptorról. (forrás: S. Jähnichen, Wikipedia)

Az IP_3 útvonal jelentősége a vázizomban

Az IP_3 útvonal a vázizom Ca^{2+} -homeosztázisának szabályozásában is jelentős szerepet tölt be (Powell et al. 2001). Vázizom esetén, ha Ca^{2+} -jelekről van szó, először általában az elektromechanikai csatolásra (ECC) és a DHPR-ok és a RyR-ok szerepére gondolunk, ami létfontosságú az izomkontrakció kiváltásában. A vázizom-differenciálódás kezdeti stádiumában (myoblastok) azonban az ECC-hez szükséges összetett struktúra még nem alakul ki, helyette az IP_3 R-ok töltnek be jelentősebb szerepet az ER-ből történő Ca^{2+} -felszabadításban (pl. De Smedt et al. 1991). Ugyanakkor a Ca^{2+} a kontrakció mellett más életfolyamatokat is szabályoz, így valószínű, hogy e Ca^{2+} -jelek kinetikája, sejten belüli lokalizációja, és az őket létrehozó csatornák típusa is különbözik az ECC-ben résztvevőktől. Vázizomban az IP_3 útvonal összes fontos résztvevőjét kimutatták: a foszfatidilinozitol-4-kinázt, a foszfatidilinozitol-4-foszfát-5-kinázt, a PLC-t, az inozitolfoszfát foszfatázokat, az IP_3 kinázt, a G-proteineket, valamint az IP_3 R-t. Azt is megfigyelték, hogy a T-tubulusrendszer depolarizációja – felnőtt izomrostban is – a PLC aktiválódásán keresztül IP_3 felszabaduláshoz vezethet (Jaimovich et al. 2000, Billups et al. 2006), ami az IP_3 R-on keresztüli Ca^{2+} -felszabadulást aktiválja. Ezt bizonyítja a sejtek depolarizációja által kiváltott gyors Ca^{2+} -tranzienst követően megfigyelhető lassabb tranzienst, melynek jól elkülönülő sejtmagi

komponense is van. Vázizomban az IP₃R a magmembrán közelében is elhelyezkedhet, ami a génátíró folyamatokban játszott szerepére utalhat. Ezek az extracelluláris szignál-szabályozta kináz (ERK1/2) és a „cAMP response element binding protein” (CREB) transzkripció faktor foszforilációjának megváltozásával mennek végbe (Powell et al. 2001).

Az izom-differenciálódás során az IP₃ útvonal jelentősége a RyR jelentőségéhez képest egyre csökken. Ezt azzal bizonyították, hogy a differenciálódás előrehaladtával az IP₃R által felszabadítható Ca²⁺, és a hisztaminra reagáló sejtek száma csökken, ezzel szemben a RyR-on keresztül felszabadítható Ca²⁺, és a RyR agonista koffeinre reagáló sejtek aránya nő (De Smedt et al. 1991). Azt is kimutatták, hogy a differenciáltabb sejtekben az IP₃- és koffeinérzékeny Ca²⁺-raktárak nem, vagy csak részben fednek át (Stiber et al. 2005).

A dolgozatban ismertetett kísérletekben az IP₃ útvonalat a B2 bradykinin receptorokon és a V1 vazopresszin receptorokon keresztül aktiváltuk. A bradykinin egy nonapeptid, amely számos biológiai folyamatban részt vesz: vazodilatációban, a kapilláris-permeabilitás növelésében, simaizom relaxációban/kontrakcióban, gyulladásos folyamatokban, és a glükózmetabolizmus szabályozásában. A szövetekben fiziológiásan megtalálható bradykinin koncentráció 0,2-3,5×10⁻¹⁰ mol/l közé tehető. Funkcionális mérések bizonyítják, hogy bradykinin adagolásakor vázizomban is megnő az [Ca²⁺]_i, amely a receptorok jelenlétére és működőképességére utal. A B2 bradykinin receptorok jelenlétét kimutatták tengerimalac és kutya izompreparátumokból, patkány hátsó végtagjából izolált harántcsíkt izom sejtekből, L6 és L8 patkány myoblastokból (Figuerola et al. 1996, Rabito et al. 1996, Miyata et al. 1998).

Az arginin-vazopresszin (AVP) egy nonapeptid, mely hatékony vazokonstriktor, antidiuretikus hormon és neurotransmitter. A sejtekben kétféle receptoron hathat. A V1 receptor az IP₃ útvonalat aktiválja, míg a V2 receptor az adenilátcikláz útvonallal van kapcsolatban. Simaizomban, és vese glomeruláris mezangiális sejtekben az AVP proliferációt, sejt kontrakciót, és prosztaglandin I₂ szintézist indukál. Vázizomban részt vesz a szénhidrát metabolizmusban, valamint a pH szabályozásában, és a vázizom differenciálódásban is. Az elterjedtebb vázizom sejtvonalak egy része nem rendelkezik működőképessé V1 receptorokkal (pl. C2C12, L6.H2), míg más részük igen (pl. L6, L6.A4, L6.C5, L5, stb.) (Teti et al. 1993, Naro et al. 1997).

Az IP₃R struktúrája, szabályozása és előfordulása

Az IP₃ receptorok 220-260 kDa-os molekulatömegű glikozilált proteinek. Legalább háromféle altípusuk létezik emlősökben, valamint találtak egy IV. és egy V. típusú IP₃R-t is, melyek nagymértékben homológok a II. altípussal. Az IP₃R kb. 2700 aminosavból áll, a

három főbb altípus szekvenciája erősen konzervált, azonosságuk 60% feletti. (Blondel et al. 1993, Yoshida & Imai 1997). Az IP₃R szerkezete nagyban hasonlít a másik fő intracelluláris Ca²⁺-felszabadításért felelős csatorna, a RyR szerkezetére (Berridge 1993, Szabó 2004). Ugyan a RyR kb. kétszer olyan nagy, mégis a szekvenciájuk C-terminális részén szignifikáns homológia figyelhető meg, és az általános szerkezetük is igen hasonló. Nagyméretű alegységekből felépülő tetramer molekulák, az ER/SR membránjába horgonyzott C-terminussal és a citoplazmába karfiolszerűen kitüremkedő N-terminussal. A receptorok homológ, membránba ágyazott része a Ca²⁺-csatorna-funkcióért, a citoszolba betüremkedő ligandkötő és coupling domén pedig az aktivációt biztosító szignál felvételéért és a csatornapapuzásért felelős. Az IP₃R tetramerként képez funkcionális Ca²⁺-csatornát. A sejtekben jelenlévő többféle altípus miatt nem csak homotetramer, hanem heterotetramer formában is előfordul. Mivel a különböző altípusok különböznek a szabályozhatóságukban és a csatornafunkciójukban, a heterotetramereknek is nagy a funkcióbeli diverzitása (Yoshida & Imai 1997).

A coupling domén az IP₃ kötés jelét vezeti át a Ca²⁺-csatorna doménre, és a csatornát szabályozó szignálok célpontjául is szolgál. Sokféle szabályozómolekula kötőhelye megtalálható rajta, ilyenek pl. az ATP, a Ca²⁺, és a kalmodulin (CaM). Ezen felül számos proteinkináz is foszforilálhatja, pl. a PKA, a PKG, a PKC, és a Ca²⁺/kalmodulin-függő proteinkináz II (CaMKII). Ez mind arra utal, hogy az IP₃R-ok megnyílása igen komplex módon szabályozott folyamat. A három IP₃R altípus között a coupling domén homológiája a legkisebb, emiatt a különböző altípusok eltérően szabályozhatók. Az FK506-kötő fehérje 12 (FKBP12) közvetlenül kapcsolódik mind az IP₃R-hoz, mind a RyR-hoz, és a leválása serkenti a receptor működését. A kalcineurin – egy Ca²⁺-függő proteinfoszfataz –, az FKBP12-n keresztül kötődik az IP₃R-hoz, és a receptor foszforilációs állapotának szabályozásában vehet részt (Yoshida & Imai 1997). Az IP₃R az ankyrin nevű adapter fehérjén és a 4.1 proteineken keresztül az aktin citoszkeletonhoz is kapcsolódik, melynek az IP₃-függő Ca²⁺-raktárak rögzítésében, és átrendeződésében lehet szerepe. Az IP₃R közvetlenül és a homer nevű horgonyzó fehérjén keresztül is kapcsolódik a kanonikus tranziens receptorpotenciál 1 (TRPC1) csatornához, ezáltal köze lehet a SOCE mechanizmushoz is (Vermassen et al. 2004).

Az IP₃R három altípusa különbözik a szöveti előfordulásuk alapján. Az IP₃R-I a leggyakoribb, általánosan elterjedt altípus, ami az egész agyban előfordul, nagy számban van jelen a simaizomban, és viszonylag kisebb mennyiségben a többi szövettípusban. Az IP₃R-II és az IP₃R-III elterjedése korlátozottabb, és általában az IP₃R-I-nél kisebb mennyiségben

fordulnak elő. Az IP₃R-II aránylag magasabb szinten expresszálódik a májban, pankréaszban, tüdőben, herékben, lépben, és sokkal kevesebb van belőle az agyban. Az IP₃R-III aránylag magasabb szinten expresszálódik a pankréaszban, bélben, tüdőben, vesében és az agyban. Általában mindhárom altípus előfordul – eredettől függetlenül – a sejtvonalakban, bár minden sejtvonalnak megvan a saját, jellemző expressziós mintázata (Yoshida & Imai 1997, Vermassen et al. 2004). Vázizomban mindhárom típusú IP₃R kimutatható, melyek közül az IP₃R-II a legjelentősebb. C2C12 myoblastokban és izomcsövekben az IP₃R-III a leggyakoribb altípus (De Smedt et al. 1997).

A sejten belül az IP₃R az ER-en kívül más intracelluláris organellekben is megtalálható, pl. a Golgi-apparátusban, a szekréciós vezikulumokban és a magmembránban. Az IP₃R-ok elrendeződése azonban nem statikus, számos sejttypusban megfigyelték az IP₃R és/vagy az IP₃-érzékeny Ca²⁺-raktárak átrendeződését. Ez leginkább a sejtek érési és differenciálódási folyamatai során, vagy agonisták általi stimuláció hatására következik be. Többféle sejttypusban megfigyelték, hogy az IP₃R-ok a magkörüli régióból kiindulva a teljes citoplazmában szétterjedtek, például hosszú távú vazopresszin kezelés, a SERCA gátló thapsigargin, illetve a PKC és TRPC agonista OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol) hatására (Vermassen et al. 2004).

Az IP₃R-I egyetlen ismert fiziológiás aktivátora az IP₃, 0,2 µM-os EC₅₀ értékkel. A csatorna maximális aktivációjához 1 µM IP₃ szükséges. Az IP₃ az IP₃R N-terminális ligandkötő doménjének egyetlen kötőhelyére tud bekötődni. Így egy tetramer formában létező receptor összesen 4 db IP₃ molekulát köthet. Az IP₃ kötés nem kooperatív, a Hill-koefficiense 1 körüli. A kötés erősen specifikus a D-myo-inozitol 1,4,5-triszfoszfátra, és az affinitása is nagy (a K_d értéke 2-100 nM közötti). A heparin az IP₃R hatékony kompetitív antagonistája, de – mivel az IP₃ képződését is gátolja, és a RyR-t is aktiválja – intakt sejteken kevéssé használható a receptor vizsgálatára. Az ausztrál *Xestospongia* szivacsból nyerhető Xestospongin C szintén hatékony, membránpermeabilis, de nem teljesen szelektív IP₃R gátlószer, mivel a SERCA-t is gátolja. A gátlás mértéke nem függ az IP₃ és a Ca²⁺ koncentrációjától (De Smet et al. 1999, Oka et al. 2002). Az Adenophostin A és B hatékony, a metabolizmusnak ellenálló IP₃R agonisták, amelyek strukturálisan különböznek az IP₃-tól, mégis 10-100-szor erőteljesebben aktiválják az IP₃R-t, és a hatásuk gátolható heparinnal (Yoshida & Imai 1997). Az IP₃R másik, elterjedten használt agonistája a thimerosal, mely a receptor IP₃ iránti affinitását, a csatorna konduktanciáját és átlagos nyitvatartási idejét növeli. Azonban irodalmi adatok alapján az IP₃R III-as altípusára nem hat (Bultynck et al. 2004).

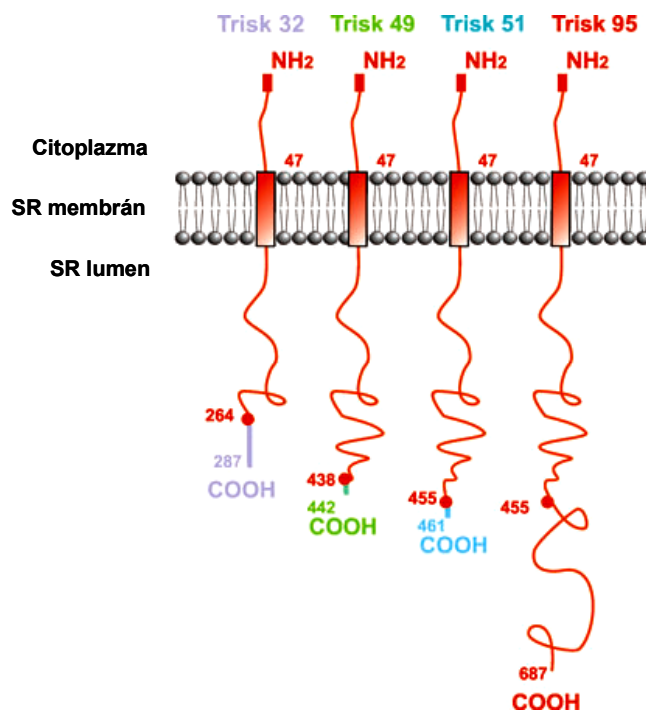
Amikor az IP₃R megnyílik, mind a négy alkáliföldfém kationt át tudja engedni, a következő sorrendben csökkenő konduktanciával: Ba²⁺>Sr²⁺>Ca²⁺>Mg²⁺. A csatorna a kétértékű kationokra szelektív az egyértékűekkel szemben, de a szelektivitása jóval kisebb, mint pl. a plazmamembrán L-típusú Ca²⁺-csatornájáé. Ezek alapján az IP₃R nem specifikus kationcsatornának tekinthető, amely a Ca²⁺-ra és a monovalens kationokra is permeábilis (Bezprozvanny & Ehrlich 1994, Yoshida & Imai 1997). A receptor Na⁺- és K⁺-konduktanciája hasonló nagyságú, nagyobb, mint a Ba²⁺-konduktanciája (Stehno-Bittel et al. 1995). Fiziológiás körülmények között az IP₃R-on keresztül folyó egyedi Ca²⁺-áram 0,5 pA-re tehető, a nyitvatartási ideje 3,7 ms. A csatorna minden megnyílásakor kb. 5400 Ca²⁺-iont szabadít fel, ami kb. huszadannyi, mint amennyi a RyR-on keresztül szabadul fel (Bezprozvanny & Ehrlich 1994). Az [Ca²⁺]_i kétfázisúan, haranggörbe-szerűen szabályozza a receptor működését. A kezdeti Ca²⁺-felszabadulás pozitív visszacsatolással fokozza a Ca²⁺ kiáramlását a raktárból (IP₃-függő CICR). A legnagyobb Ca²⁺-felszabadulás 300 nM [Ca²⁺]_i-nál történik, ugyanakkor megállapították azt is, hogy az ennél magasabbra emelkedő [Ca²⁺]_i már negatív visszacsatolással, az IP₃-kötés mértékének csökkentésével gátolja az IP₃R megnyílását (Yoshida & Imai 1997, Szabó 2004). A Ca²⁺ – az IP₃R coupling doménjén található Ca²⁺-kötő helyen keresztül – közvetlenül a receptorra hat, így mind az aktiváló, mind a gátló hatása nagyon gyors. Sok sejt az IP₃ útvonal aktiválódására ismétlődő Ca²⁺-tüskékkel (Ca²⁺-oszcilláció), vagy a sejt citoplazmáján tovaterjedő Ca²⁺-hullámokkal válaszol. E jelenségek kialakulásához fontos az IP₃R haranggörbeszerű Ca²⁺-függése (Yoshida & Imai 1997).

A triadin izomfehérjék

A RyR a triádban több különböző fehérjével is kölcsönhatásban áll, többek között a calsequestrinnel, a junctate-tal, a junctinnal, a JP45-tel, a mitsuguminokkal és a triadinnal (összefoglaló pl. Treves et al. 2009). Az SR membránfehérjék e csoportjából először a triadint fedezték fel 1990-ben. Elsőként nyúl vázizom triádjából mutatták ki, 95 kDa-os molekulásúlyú glikoproteinként (Brandt et al. 1990, Kim et al. 1990). 1994-ben szívizomban is igazolták a jelenlétét (Peng et al. 1994). Alternatív splicinggal többféle molekulásúlyú izoformája jöhet létre mindkét izomtípusban (Guo et al. 1996, Marty et al. 2000, Hong et al. 2001, Vassilopoulos et al. 2005), ugyanakkor más szövettípusban eddig nem találták meg. A vázizom triadinoknak (Trisk) eddig négy izoformáját klónozták patkányból, míg a szívizom triadinnak (CT) három változata ismert nyúlból, és ezeken kívül még egy, egérből. Minden izoforma azonos, rövid citoplazmatikus N-terminális szegmentummal, transzmembrán α-

hélixszel, és változatos hosszúságú, egyedi luminális C-terminális résszel rendelkezik (Marty 2004, Vassilopoulos et al. 2005). A triadinról először azt feltételezték, hogy a DHPR RyR-ral való összekötéséért, ezáltal az ECC-ért felelős. Manapság azonban már tudjuk róla, hogy a Ca^{2+} -felszabadulás szabályozásában vesz részt vázizomban és szívizomban egyaránt (Marty et al. 2009).

A rágsáló vázizomban megtalálható triadinokat a molekulásúlyuk alapján nevezték el (5. ábra). A Trisk 95 (95 kDa molekulásúlyal), és rövidebb változatai, a Trisk 51 (51 kDa; Marty et al. 2000), a Trisk 49 (49 kDa), és a Trisk 32 (32 kDa; Vassilopoulos et al. 2005), lassú típusú izomrostokban kisebb mennyiségben expresszálódnak, mint gyorsban. A triadin izoformák – a Trisk 32 kivételével – hiányoznak a proliferáló szatellitasejtekből, és csak a myotubulussá történő differenciálódás során jelennek meg (Marty et al. 2000, Vassilopoulos et al. 2005). A funkciójuk felderítésére létrehozott triadin knockout (KO) egér gyengébb volt, a gyors típusú izomrostjaiban a DHPR expressziója megnőtt, a CSQ expressziója és az SR teljes Ca^{2+} -mennyisége lecsökkent, és a triádok orientációja is abnormális volt. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a triadinoknak fontos szerepe van a vázizomfunkció és -struktúra fenntartásában, és hiányukban myopátia alakulhat ki (Oddoux et al. 2009).



5. ábra. A patkány vázizom triadin izoformái. Minden izoforma azonos citoplazmatikus N-terminális régióval és egyedi luminális C-terminális régióval rendelkezik. (Marty et al. 2009)

Az emberi triadin gén 420 kb hosszú, amiből a leghosszabb, vázizomban előforduló izoforma, a Trisk 95, csak 2,2 kb-t tesz ki. Erősen töredezett, 41 exonból épül föl (Marty 2004). 687 aminosavból áll, SDS-PAGE-n futtatva 77,2 kDa méretnél, dupla sávként

mutatható ki, ami poszttranszlációs módosításra, befejezetlen glikozilációra utal. A vázizomban a triadin mennyiségének kb. 40%-át teszi ki (Marty et al. 2000, 2009). Az SR-ben, a triádokban található meg, és a RyR-ral és a CSQ-nel asszociálódik, ezáltal a Ca^{2+} -felszabadulásban részt vevő fehérjekomplexum fontos alkotója. Myoblastokban, szatellitasejtekben nem mutatható ki. A differenciálódás során, a myotubulusokban kezd erősebben expresszálni, és harántcsíkolt festődést mutat (Vassilopoulos et al. 2005). Az overexpressziója csökkenti, a kiütése fokozza a RyR-on keresztüli spontán, elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket (Fodor et al. 2008), valamint az overexpressziója a SOCE amplitúdóját is csökkenti (Vassilopoulos et al. 2007). A Trisk 95-expresszió bármilyen irányú módosítása csökkenti a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -felszabadulást. Ezeknek az eredményeknek a magyarázata az lehet, hogy a triadin összeköti az SR-t és a Ca^{2+} -felszabadító komplexet a mikrotubulus hálózattal, ezáltal az SR és a triád struktúrájának fenntartásában is szerepe lehet, és a RyR-ra gyakorolt szabályozó szerepét e strukturális funkción keresztül fejtheti ki. Így a triadin expresszióváltozása az SR felbomlásához, és a RyR és a DHPR szétválásához vezethet (Marty et al. 2009).

A Trisk 51 egy 461 aminosavból álló fehérje, ami 51,3 kDa molekulásúlynál, dupla sávként mutatható ki poliakrilamid gélen futtatva (Marty et al. 2000). A Trisk 95-höz hasonlóan, az SR-ben, a triádban helyezkedik el, a RyR-ral és a CSQ-nel asszociálódik, és a Ca^{2+} -felszabadításért felelős komplexum része. Ez az izoforma sem található meg myoblastokban, és ez is a differenciálódó myotubulusokban kezd erősebben expresszálni, harántcsíkolt mintázatot mutatva (Vassilopoulos et al. 2005). Patkányban és egérben a Trisk 51-ből és a Trisk 95-ből azonos mennyiség van jelen, ami a teljes triadinmennyiség kb. 40-40%-a, míg a maradékot a Trisk 32 teszi ki. Emberben kb. 60% a Trisk 51, és 40% a Trisk 95 aránya (Marty et al. 2009).

A Trisk 49 egy 442 aminosavból álló fehérje, 49,5 kDa elméleti molekulásúllyal. SDS-PAGE-n futtatva kb. 60 kDa molekulásúlynál mutat sávot. Az emberi triadin első 20 exonja utáni alternatív splicinggal keletkezik, és 4 aminosavból álló egyedi C-terminális véggel rendelkezik. A két nagyobb izoformához hasonlóan myoblastokban nem mutatható ki, a differenciálódás előrehaladtával, a myotubulusokban kezd erősebben expresszálni. Nevével ellentétben nem a triádban, hanem az SR longitudinális tubulusában helyezkedik el, és a titinnel (mely egy több mint 1 μm hosszú óriásmolekula, ami a Z-lemeztől az M-zónáig húzódik, és a szarkomer elrendeződéséért és rugalmasságáért felelős) kolokalizál az A és I csíkok határán. Nem kolokalizál a RyR-ral, a CSQ-nel, a Trisk 95-tel, a Trisk 51-gyel, és a DHPR-ral. Így a Trisk 49 valószínűleg a titinnek vagy más szarkomer-alkotó fehérjének az

SR triádközei részéhez való kikötéséért, ezáltal az SR struktúrájának kontrakció közben való megtartásáért lehet felelős (Vassilopoulos et al. 2005).

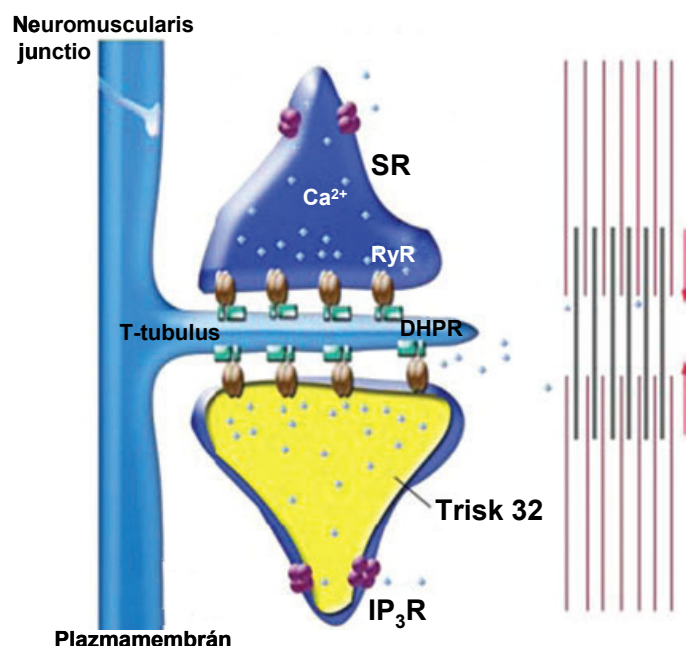
A Trisk 32-ről, a negyedik vázizom triadin izoformáról, kutatásunk egyik fő tárgyáról a következő részfejezetben lesz bővebben szó.

A szívizom triadinnak három fajtáját ismerik nyúlból (CT1, CT2, CT3, rendre 35, 40 és 92 kDa molekulatömegűvel), ezen felül egérből a nyúl CT1 és CT2-nek megfelelő 35 és 40 kDa-os változat mellett egy 35,5 kDa-os változatot is klónoztak (Vassilopoulos et al. 2005). A szívizomban a legnagyobb mennyiségben jelenlévő – az összes izoforma 95%-át kitevő – triadin a CT1 (vagy triadin 1; Kobayashi & Jones 1999) egy kisméretű fehérje, amely az SR junctionális részén, a diádokban található, és a RyR2-vel, a junctinnal és a CSQ2-vel alkot fehérjekomplexumot. A triadin KO-egérben a diád szerkezetének megváltozása, és a CT1-gyel kapcsolatban álló fehérjék (RyR2, CSQ2, junctin, junctophilin 1 és 2) expressziócsökkenése volt megfigyelhető, ami az ECC hatékonyságát csökkentette, és arrhythmiaokat okozott (Chopra et al. 2009). A CT1-et overexpresszáló egérben enyhe kardiális hipertrófia alakult ki, emellett itt is megfigyelhető volt a RyR2 és a junctin expressziócsökkenése (Kirchheifer et al. 2001). Funkcióját tekintve a CT1 részt vehet a diád struktúrájának fenntartásában, a CSQ2 kihorgonyzásában, és a RyR2-n keresztül Ca^{2+} -felszabadulás közvetlen szabályozásában. A legújabb eredmények alapján a CT1 azonos a vázizomban megtalálható Trisk 32-vel (Marty et al. 2009).

A 32 kDa-os vázizom triadin (Trisk 32)

A Trisk 32 egy 287 aminosavból álló fehérje, 32,1 kDa-os elméleti molekulatömegűvel. SDS-PAGE-n futtatva három darab, kb. 37 kDa-os sávot ad, ami poszttranszkripciós módosulásokra, pl. glikozilációra utalhat. Az emberi triadin első nyolc exonja utáni alternatív splicinggal keletkezik, és 23 aminosavból álló, egyedi C-terminális véggel rendelkezik. A mérete hasonló a legnagyobb mennyiségben előforduló szívizom triadinéhoz, a CT1-éhez. A felfedezésekor azt feltételezték róla, hogy a C-terminális végében különbözik a CT1-től (Vassilopoulos et al. 2005), azonban újabb irodalmi adatok szerint a két fehérje azonos (Marty et al. 2009). Ebben az esetben ez az egyetlen olyan izoforma, amely mindkét izomtípusban megtalálható. A Trisk 32 a többi izoformával ellentétben már myoblastokban is expresszálódik, differenciált izomcsövekben pontozott festődést mutat. Egérben és patkányban az összes triadinmennyiség 20%-át teszi ki, emberben nem kimutatható. Nagyrészt nem a triádban, hanem az SR longitudinális tubulusában lokalizálódik – a Z-lemeznél összpontosul, azon a részen, ahol az IP_3R és a mitokondriumok is megtalálhatóak –,

de kisebb mennyiségben az egész SR-ben megtalálható (6. ábra). Ezáltal nem kolokalizál a CSQ-nel, a Trisk 95-tel, a Trisk 51-gyel, és a DHPR-ral. Kolokalizál a Ca^{2+} -ATPázsal, a dezminnel és az IP_3R -ral.



6. ábra. A Trisk 32 elhelyezkedése. A Trisk 32 (sárgával jelölve) főként az SR longitudinális tubulusában található meg, és az IP_3R -hoz kapcsolódik (Marty et al. 2009 alapján).

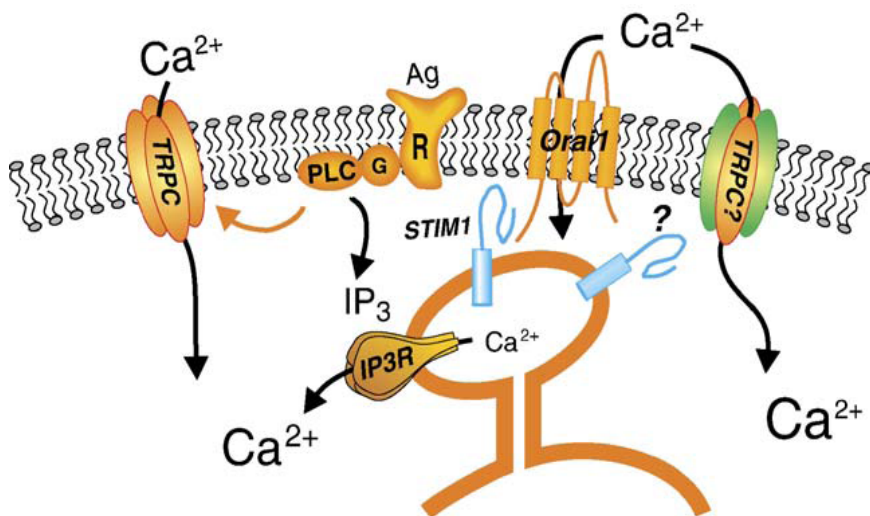
A szívizom- és a nagyobb vázizom triadin izoformákról már ismert, hogy a RyR szabályozásában vesznek részt, azonban a Trisk 32 expressziója időben megelőzi a RyR-ét a vázizom-differenciálódás során (Vassilopoulos et al. 2005). Az expressziójának ez az egyedi időzítése számos kérdést vet fel. Először is, egy olyan fehérjecsalád tagja, amit eredetileg a RyR szabályozójaként írtak le, miért expresszálódik olyankor, amikor a RyR még nincs jelen? Másodszor lehet-e a Trisk 32-nek a RyR szabályozásán kívül valami más funkciója a vázizomban? A RyR és az IP_3R strukturális és funkcionális hasonlósága ellenére csak kevés olyan fehérjét írtak le, amelyek az IP_3R -ral specifikus kölcsönhatásban vannak, és módosítják annak a működését. Mivel vázizomban a Trisk 32-ről kimutatták, hogy a longitudinális SR-ben helyezkedik el, és az IP_3R -III-hoz kapcsolódik – az összes triadin izoforma közül egyedül –, felvetődött a lehetőség egy, a Trisk 32-t is magában foglaló, triádon kívüli Ca^{2+} -felszabadítási komplexum létezésére, ahol a Trisk 32 funkciója valószínűleg az IP_3R -on keresztüli Ca^{2+} -felszabadulás szabályozása lehet. Ebben az esetben a közvetlen szabályozó szerep mellett, a citoszkeletonhoz horgonyozhatja, és fenntarthatja e komplexum struktúráját is. Ezen kívül a Trisk 32 részt vehet kontrakció közben a szarkomerstruktúra fenntartásában, és a mitokondrium Ca^{2+} -raktározásában is (Vassilopoulos et al. 2005). Kutatásainkban a Trisk 32 IP_3R -ra gyakorolt közvetlen szabályozó hatását vizsgáltuk.

A raktár által vezérelt kalciumbelépés (SOCE)

Mind az IP₃R, mind a RyR működése csökkenti az SR Ca²⁺-tartalmát. A felszabaduló Ca²⁺ egy részét a SERCA pumpák visszajuttatják az SR-be, más része kipumpálódik a sejtből. Ez egy idő után az SR teljes kiürüléséhez vezetne, ha nem lenne olyan mechanizmus, amely az extracelluláris térből Ca²⁺-ot juttat be a raktár újrafeltöltéséhez. Ez a mechanizmus a raktár által vezérelt Ca²⁺-belépés (SOCE). A SOCE feladata nem merül ki az intracelluláris Ca²⁺-raktárak újra feltöltésében, ugyanis szerepet játszik az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció megemelkedésével járó jelátviteli útvonalakban, és a Ca²⁺-oszcillációk amplitúdójának fenntartásában is. A SOCE mechanizmus modelljét először James W. Putney Jr. írta le több mint két évtizede (Putney 1986), és azóta mind ingerelhető, mind nem-ingerelhető sejteken igazolták a létezését (összefoglaló cikkek pl. Feske 2007, Leung et al. 2008), és bebizonyították, hogy alapvető szerepet játszik e sejtek Ca²⁺-homeosztázisában.

A SOCE főbb részvevőinek felderítése azonban nem volt zökkenőmentes. Az 1990-es évek elején elektrofiziológiai módszerekkel sikerült kimérni egy, a raktár által vezérelt csatornán (SOC) keresztül folyó Ca²⁺-áramot, a CRAC-áramot (I_{CRAC}, Ca²⁺-felszabadulás által aktivált Ca²⁺-áram). Ez egy nem feszültségfüggő, nagy Ca²⁺-szelektivitású (P_{Ca}/P_{Na} ~ 1000), erősen befele irányító, erősen pozitív reverzál potenciálú, alacsony konduktanciájú (<0,1 pS; ~10⁴ Ca²⁺-ion másodpercenként) Ca²⁺-áram volt (Clapham 2003, Hogan & Rao 2007). A kutatók először a kanonikus tranzien receptorpotenciál (TRPC) fehérjecsalád tagjairól, és ezek közül is legfőképp a TRPC1-ről feltételezték, hogy a CRAC-áram ioncsatornáját alkotja (Beech et al. 2003), de az elektrofiziológiai méréseik alapján a TRPC1-en keresztül folyó, raktárürülés által kiváltott Ca²⁺-áram nem egyezett meg minden tulajdonságában a CRAC-árammal. Az a megfigyelés, hogy a TRPC1 géncsendesítésével a SOCE is csökkenthető volt, tovább bonyolította a kérdést, ugyanis arra utalt, hogy a TRPC1 mégis egyike a SOC csatorna komponenseinek (Liu et al. 2007). Ez legalább kétféle raktár által vezérelt csatorna létezését feltételezte: az egyik, amelyiken keresztül a nagy Ca²⁺-szelektivitású CRAC áram valósul meg, és egy másik, amin a jóval kisebb mértékben Ca²⁺-szelektív SOC áram. A válasza az utóbbi évekig várni kellett, amikor végül felfedezték a STIM1-et (sztrómális kölcsönható molekula 1; Liou et al. 2005, Roos et al. 2005), az ER Ca²⁺-szenzorát, és az Orai1-et (Feske et al. 2006, Vig et al. 2006, Zhang et al. 2006), a CRAC csatorna pórusképző alegységét. Ezek alapján a CRAC áram az Orai1-en, míg a SOC áram a TRPC és más, raktár által vezérelt csatornákon keresztül valósul meg (pl. Cheng et al. 2008, Salido et al. 2009), bár az elnevezések – különösen a korábbi cikkekben – nem konzekvensek.

A CRAC csatorna aktiválódásának molekuláris mechanizmusa nem-ingerlékeny sejteken manapság már jól ismert (7. ábra). Nyugalmi állapotban (amikor az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak tele vannak) a STIM1 fehérjék monomerekként diffúzan helyezkednek el az ER felszínén. Ilyenkor az EF-hand doménjük Ca^{2+} -ot köt, ami olyan konformációban tartja a fehérjét, ami meggátolja az aggregálódásukat. Raktárürüléskor leválik a Ca^{2+} az EF-handról, emiatt a STIM1 oligomerizálódik, aggregálódik, és az ER plazmamembrán-közeli régióiban (10-25 nm-re a plazmamembrántól) határozott ún. ponttákká rendeződik. Ezután az Orai1 molekulák is összeszedődnek ezekbe a ponttákká. A STIM1 erősen konzervált C-terminális CRAC-aktiváló doménja (CAD) vagy a STIM1 Orai-aktiváló régiója (SOAR) kapcsolatba lép az Orai1 C-terminális coiled-coil régiójával, aminek hatására a CRAC csatorna megnyílik, és beengedi a Ca^{2+} -ot az extracelluláris térből. A beáramló Ca^{2+} a raktár újrafeltöltésére szolgál, és különböző jelátviteli útvonalakban is részt vehet. Az még nem tisztázott, hogy a CRAC csatorna aktivációjához 2 vagy 4 db STIM1 molekulára van-e szükség. Az a korábbi elmélet, hogy a CRAC aktivációhoz szükség van egy Ca^{2+} -influx faktorra (CIF) megdőlni látszik, amióta megállapították, hogy a STIM1 CAD vagy SOAR régiója elég az Orai1 csatornák megnyitásához (Dirksen 2009).



7. ábra. A SOCE mechanizmus. Az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak ürülésekor az ER Ca^{2+} -szenzora, a STIM1, az ER felszíni membrán közeli régiójába rendeződik, és aktiválja a raktár által vezérelt csatornákat: az Orai1-et és feltehetően a TRPC1-et (Smyth et al. 2006).

Nem sokkal ezelőttig a vázizomban a SOCE jelenléte és fontossága ismeretlen volt. Azonban az utóbbi néhány év kísérletei felfedték, hogy a SOCE-ra a normál elektromechanikai csatolás (ECC) során is szükség van a raktárak feltöltéséhez. Vázizomban először felnőtt patkány *extensor digitorum longus* izomrostokban mutatták ki a jelenlétét (Kurebayashi & Ogawa 2001). Az itt megfigyelhető SOCE meglehetősen gyors (<1s), és az

SR Ca^{2+} -tartalma növekedésére gyorsan inaktiválódik. Ez annak köszönhető, hogy a membránban a raktár által vezérelt csatornák egyenletesen oszlanak el, valamint a STIM1 már nyugalmi állapotban is aggregált formában van jelen az SR plazmamembrán közeli régióiban, a SOCE potenciális helyszínén (Kurebayashi & Ogawa 2001, Launikonis & Rios 2007, Stiber et al. 2008a, Launikonis et al. 2009). A STIM1 vagy az Orai1 hiánya a SOCE csökkenéséhez és myopátia kialakulásához vezet (Stiber et al. 2008a, Dirksen 2009). Hasonló változások figyelhetők meg öregedő izmokban is, ahol azonban a SOCE csökkenése nem a STIM1 és az Orai1 expressziócsökkenése miatt következik be (Zhao et al. 2008). Ezek az ismeretek, a STIM1, Orai1, valamint a TRPC1 vázizomban való jelenlétének a kimutatásával együtt (pl. Vandebrouck et al. 2002, Stiber et al. 2008a) arra a következtetésre vezettek, hogy a SOCE, bár nem vesz részt közvetlenül az ECC-ben, működőképes és fontos lehet a vázizomban is.

A SOCE mechanizmusban résztvevő csatornákat többféle anyaggal is gátolhatjuk, bár ezek többsége nem specifikus. Az általunk is használt YM-58483 (más néven BTP2; 4-methyl-4'-[3, 5-bis(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-1,2,3-thiadiazole-5-carboxanilide) a TRP és SOC csatornák aspecifikus gátlószere (Qin et al. 2009). Nem hat az IP_3 útvonalra, az ER-ből történő Ca^{2+} -felszabadulásra, a Ca^{2+} -pumpák működésére, a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákra, ugyanakkor gátolja a SOCE-t, a TRPC1-et, a TRPC3-at, a TRPC5-öt, az NFAT-mediált transzkripciót, a sejtproliferációt, a bronchokonstriktációt és csökkenti az asztmát (Zitt et al. 2004, He et al. 2005, Yoshino et al. 2006, Várnai et al. 2009). A 2-aminoethoxydiphenylborane (2-APB) a STIM1 aggregáció, némelyik TRP csatorna, és a SOCE gátlása mellett gátolja az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulást és az L-típusú Ca^{2+} -csatornákat is (Olivera & Pizarro 2010). A SOCE-ra gyakorolt gátló hatása függ a különböző Orai izoformák jelenlététől, ugyanis ha a STIM1 mellett Orai2 is jelen van, akkor a gátló hatás csak részleges, valamint az Orai3-at, és kis mértékben az Orai1-et közvetlenül is megnyithatja (DeHaven et al. 2008). Kis, néhány μM -os koncentrációkban serkenti, nagyobb (100 μM -os) koncentrációban gátolja a CRAC áramot (Peinelt et al. 2008). A tyrphostin-A9 (Qin et al. 2009), az econazole, az SKF-96365 (Denys et al. 2004), a Ni^{2+} (5 mM), a La^{3+} (100 μM), a Gd^{3+} (1 μM) (Gutierrez-Martin et al. 2005) szintén használható a SOCE gátlására.

A kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornák 1. altípusa (TRPC1)

A tranziens receptor potenciál (TRP) csatornákat először *Drosophilában* írták le, ahol egy olyan mutánst találtak, melynek a fotoreceptor sejtjei a folyamatos fényre folyamatos válasz helyett tranziens válaszokat adtak (Cosens & Manning 1969). A TRP csatornák szinte az egész élővilágban megtalálhatók, és a különböző fajokban változatos funkciót töltenek be.

Emberben részt vesznek a hő- és ízérzékelésben, élesztőben az ozmolaritás érzékelésben, egerekben a feromonok érzékelésében, stb. (Clapham 2003). Emlősökben hat fehérjecsald tartozik a TRP csatornák közé: a kanonikus (TRPC), a vanilloid (TRPV), a melastatin (TRPM), az ankyrin (TRPA), a polycystin (TRPP), és a mucolipin (TRPML) TRP családok. Fonalféregben, muslicában, és halban találtak egy hetedik féle TRP családot is, a TRPN-t (no mechanoreceptor potential C; NOMPC) (Pedersen et al. 2005). A TRP fehérjék szekvencia homológiája legalább 20%. Minden TRP csatorna 6 transzmembrán hélixből álló alegységekből áll, amelyek homo- vagy heterotetramerekként képeznek kationpermeabilis csatornákat (Clapham 2003). Az $[Ca^{2+}]_i$ szabályozásában is részt vesznek Ca^{2+} -belépési útvonalakként, vagy ezek regulátoraként, és az intracelluláris organelumokból való Ca^{2+} -felszabadulásban is szerepük van.

A TRPC csatornáknak 7 típusa van, mindegyikük nem szelektív, Ca^{2+} -permeabilis kationcsatorna (a leginkább szelektív a TRPC5, melynek a szelektivitása $P_{Ca}/P_{Na} = 9$). Konzervatív régiók: a C-terminális végen a TRP box – mely kb. 50%-ig megegyezik a muslicában és az emberben –, az N-terminális végen 3-4 ankyrin repeat, és az IP₃R- és kalmodulin-kötőhely (CIRB). Szinte minden sejtípusban megtalálhatóak, sőt adott sejtípus többféle TRPC-t is expresszálhat (Pedersen et al. 2005). Aktiválódásuk receptor stimuláció és foszfolipáz-C aktiváció hatására történik, valamint legtöbbjükéről feltételezik vagy bizonyították, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak ürülésére is aktiválódnak.

A TRPC1 a TRPC család elsőként felfedezett tagja, 1995-ben sikerült a klónozása (Petersen et al. 1995, Wes et al. 1995). Szinte minden sejtípusban jelen van (Riccio et al. 2002, Kunert-Keil et al. 2006, Ambudkar et al. 2007). A sejtekben nagyrészt intracelluláris kompartmentekben található meg, de ahhoz, hogy működni tudjon, más TRPC proteinekkel, leggyakrabban a TRPC4-gyel és TRPC5-tel alkot heterotetramereket, és így helyeződnek ki a plazmamembránba. A TRPC1 funkciója szerteágazó. A neuronokban a metabotróp glutamát receptor (mGlu1) aktiválódásán keresztül részt vesz az EPSP (excitatórikus poszt-szinaptikus potenciál) létrehozásában. Endotélben, vérlemezkékben, simaizomban és B-limfocitákban fontos szerepe van az agonista-, növekedési faktor-, vagy PKC-indukált Ca^{2+} -belépésben. Petesejtben mechanoszenzitív kationcsatornaként működik, és a membrán feszülésére Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , ill. Mg^{2+} -áramokkal válaszol. Részt vesz a simaizom és az őssejtek proliferációjának szabályozásában, az endothelin által kiváltott vazokonstrikcióban, a nyálszekrécióban, stb. (Beech 2005).

Vázizomban a TRPC1 részt vesz a myoblastok differenciálódásának szabályozásában. Ez több módon is megvalósulhat. Megfigyelték, hogy a TRPC1 expresszióját kis interferáló

RNS-sel (siRNS) csökkentve, a myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) felhalmozódik a sejtekben, megköti az aktint, és meggátolja a myoblastok mozgását és fúzióját. Normális esetben a TRPC1, és a rajta keresztül megvalósuló SOCE a calpain aktivációját indukálja, ami beindítja a MARCKS lebontását, és lehetővé teszi a myoblastok migrációját, fúzióját, és differenciálódását (Louis et al. 2008). A másik elméletet arra a megfigyelésre alapozták, hogy a C2C12 myoblastok differenciálódásakor megnő a TRPC1 expressziója, különösen szfingozin-1-foszfát jelenlétében. A TRPC1 expresszióját siRNS-sel csökkentve csökken a differenciálódás. Az elmélet szerint a szfingozin-1-foszfát stresszrostok képződését segíti elő, ami a TRPC1 lipidraftokba tevődését segíti, ahol feszülés által aktivált csatornaként működik, és ez elősegíti a myoblastok differenciálódását (Formigli et al. 2009). Egy harmadik elmélet az aktivált T-sejtek nukleáris faktora (NFAT) aktivitásával hozza összefüggésbe a TRPC1 izomdifferenciálódásban betöltött szerepét. Az NFAT három izoformája vesz részt az izomdifferenciálódásban, mindegyiküket a kalcineurin (egy Ca^{2+} -függő proteinfoszfatáz enzim) szabályozza. Az NFAT2 (más elnevezés szerint: NFATc1) a gyors és lassú izomrostok közti átmenetben vesz részt, az NFAT1 (NFATc2) a myotubulusok fúziójáért, az NFAT4 (NFATc3) pedig az izomrostok tömegnövekedéséért felelős (Stiber et al. 2005). Nyugalmi állapotban az NFAT izoenzimek foszforilált formában, a citoplazmában találhatók. Amikor az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megemelkedik, a kalcineurin defoszforilálja az NFAT-t, ami ezután a sejtmagba vándorol, és különböző gének átírását aktiválja. Ha az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ visszacsökken a nyugalmi szintre, a kalcineurin inaktíválódik, az NFAT újra foszforilált állapotba kerül, és kijut a magból. Ez a folyamat megfigyelhető myoblastokban is, ahol a SOCE-n keresztül megvalósuló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés aktiválja az NFAT1-et, ami az izomdifferenciálódásért felelős (Horsley et al. 2001, Pavlath & Horsley 2003, Valdés et al. 2008). A folyamatban a TRPC1 a SOCE aktiválásán, és ezáltal a kalcineurin aktiválásához szükséges $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés biztosításán keresztül vesz részt. Ezt az is alátámasztja, hogy B-limfocitákban a TRPC1 expresszió csökkentése az NFAT aktivitás csökkenését eredményezi (Mori et al. 2002). Az előbbiekkal összhangban van az a megfigyelés is, hogy a TRPC1 KO-egérben az izomkeresztmetszet, az izomerő, és a myofibrillumok mennyisége csökken (Zanou et al. 2009). Mivel a TRPC1 mechanikai feszülés által is aktiválható (Maroto et al. 2005, Formigli et al. 2009), feltételezhető, hogy részt vesz a disztrofin nevű horgonyzófehérje hiánya által okozott Duchenne-féle izomdisztrofiában (DMD). A betegségben megfigyelték, hogy a TRPC1 expressziója megnő, és ez abnormálisan magas Ca^{2+} -belépést eredményez (Vandebrouck et al. 2002, Vandebrouck et al. 2007, Williams & Allen 2007, Gervasio et al. 2008). Ezt alátámasztja az is, hogy az expressziójának csökkentése *mdx* egerekben – a DMD

állatmodelljében – csökkenti mind a raktár által vezérelt, mind a feszülés által kiváltott Ca^{2+} -belépést (Vandebrouck et al. 2002).

Az előbbiekkal ellentmondásban van viszont az a megfigyelés, hogy izomrostokban, feszültség-clamp vizsgálatokkal nem sikerült kimutatni olyan befele irányuló áramot, ami ennek az útvonalnak az aktiválódásához lenne köthető (Allard et al. 2006, Berbey & Allard 2009), míg mostanában Berbey és mtsai. (Berbey et al. 2009) azt közölték le, hogy felnőtt vázizomrostok szarkolemmájában nem expresszálódik a TRPC1, azonban a longitudinális SR-ben igen, ahol szivárgó Ca^{2+} -csatornaként viselkedik.

A TRPC1 és a SOCE kapcsolata az ezzel foglalkozó nagyszámú cikk ellenére sem tisztázott, az eredmények egy része ellentmondásos. A TRPC1-KO egér nyálmirigysejtjeiben a SOCE 80%-kal csökken, ezáltal csökken a nyálszekréció (Liu et al. 2007), azonban a vérlemezkéiben a SOCE nem változik (Varga-Szabo et al. 2008). A különböző cikkekben arról is ellentmondásos információkat találhatunk, hogy a TRPC1 a STIM1-Orai1 rendszer része, vagy független attól (Liao et al. 2008). A legtöbb megfigyelés arra utal, hogy a TRPC1 funkciója szorosan kapcsolódik a másik két fehérjééhez. Kimutatták, hogy a STIM1 jelenléte szükséges, hogy a TRPC1 raktár által szabályozható legyen, ugyanis STIM1 jelenlétében a TRPC1 lipidraftokba integrálódik, ahol SOC csatornaként funkcionál, viszont STIM1 nélkül más TRPC csatornákkal asszociálódik, és receptor által vezérelten működik (Alicia et al. 2008). Azt is kimutatták, hogy a STIM1 és TRPC1 részvételével megvalósuló SOCE-hoz az Orai1 jelenlétére is szükség van. Ha HEK293 sejtekben csak a STIM1-et vagy csak az Orai1-et termeltetik túl, a SOCE nem nő meg. Ha csak a TRPC1-et overexpresszálják, az kis mértékben növeli a SOCE-t, azonban ha ezzel egyidőben a STIM1-et vagy a STIM1-et és az Orai1-et együttesen túltermeltetik, az még tovább fokozza a SOCE mértékét. Ha az Orai1 expresszióját siRNS-sel csökkentik, minden említett esetben csökken a SOCE (Cheng et al. 2008). Nyálmirigy sejtekben kimutatták, hogy a STIM1-Orai1-TRPC1 komplex ko-immunoprecipitál. Ha bármelyikük expresszióját csökkentik, akkor a SOCE is csökken, ha a TRPC1 expresszióját növelik, akkor a SOCE is nő (Ong et al. 2007). Arra is van bizonyíték, hogy a TRPC1 és az Orai1 heteromer komplexek formájában képeznek csatornát (Liao et al. 2008). A STIM1 C-terminális vége szabályozza a TRPC1-et (Huang et al. 2006, Worley et al. 2007), feltehetőleg a molekulák közti elektrosztatikus kölcsönhatással (Zeng et al. 2008). Más kutatócsoportok azonban HEK293 sejtekben a STIM1 expressziójának mindkét irányú módosításával, valamint TRPC agonisták alkalmazásával arra utaló bizonyítékokat találtak, hogy a TRPC1 a STIM1-től függetlenül aktiválódik (DeHaven et al. 2009). Kutatásunkban a

TRPC1 és a SOCE kapcsolatát vizsgáltuk, és megpróbáltuk tisztázni ezen ellentmondások egy részét.

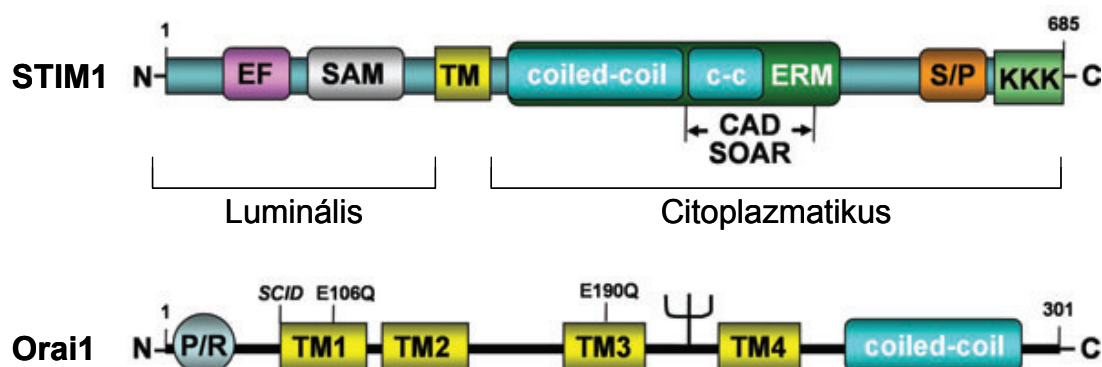
A sztrómális kölcsönható molekula 1 (STIM1)

Emberben két sztrómális kölcsönható molekula (STIM) homológ található meg (STIM1 és STIM2; Liou et al. 2005, Roos et al. 2005, Zhang et al. 2005). Mindkettőjük tartalmaz egy transzmembrán (TM), egy lumenális N-terminális és egy citoplazmatikus C-terminális domént (8. ábra, felső panel). A STIM1 túlnyomóan az ER-ben található meg, de kisebb mennyiségben a plazmamembránban is jelen van. Az ER-ben elhelyezkedő N-terminális régiója tartalmaz egy egyedülálló EF-hand-et ($K_d \sim 400 \mu\text{M}$) és steril- α -motif (SAM) doméneket. Ha Ca^{2+} kötődik hozzá, az EF-hand és a SAM domén olyan konformációban csukódik össze, ami meggátolja a STIM aggregációját. Ha a Ca^{2+} ledisszociál az EF-hand-ről, akkor a fehérje konformációja úgy változik meg, hogy az EF-hand és a SAM domén kibomlik, lehetővé téve a STIM molekulák aggregációját. A fehérjét a transzmembrán doménja horgonyozza ki az ER-be. A molekula nagy, C-terminális régiója egy ezrin-radixin moesin (ERM) doménen belül két szomszédos coiled-coil domént, ezen felül egy szerin-prolin- (S/P), és egy lizin-gazdag (KKK) domént tartalmaz. A második coiled-coil domén a STIM1 Orai-aktiváló régióján (SOAR) belül helyezkedik el, ami a STIM1 és az Orai1 C-terminális vége közti kapcsolatért, és az Orai csatornák megnyílásáért felelős. Az ERM doménen belül található az a régió is, amely a gyors, Ca^{2+} -függő inaktivációért felelős. A KKK doménnek összetett funkciója van. Részt vesz a STIM1 plazmamembránban való stabilizálásban, hatással van az Orai1 feszültségfüggésére amíg az Orai1 prolin-gazdag régiójával érintkezik, és ez a régió vesz részt a TRPC csatornák kapuzásában is, elektrosztatikus kölcsönhatás segítségével (Dirksen 2009, Lee et al. 2010).

A STIM1 szerepét a SOCE mechanizmusban több tanulmány is bizonyította. *Drosophilában* és emlős sejtekben a STIM1 expresszió gátlása lecsökkenti a CRAC áramot, az overexpressziója kis mértékben növeli. A STIM1 közös komponense a SOC és a CRAC csatornáknak (Roos et al. 2005). Raktárürülés során a STIM1 az ER plazmamembrán-közeli régiójába aggregálódik és aktiválja a SOCE mechanizmust, azonban ha az EF-hand doménján egy pontmutáció jön létre, akkor a mutációtól függően ez az aggregáció elmarad (Liou et al. 2005) vagy állandósul (Zhang et al. 2005).

A STIM2 szerepe a SOCE mechanizmusban kevésbé érzhető. A STIM1-nél kevésbé érzékeny az ER $[\text{Ca}^{2+}]$ változásaira. A fő szerepe inkább a nyugalmi Ca^{2+} -belépésben, és a

SOCE során elkezdődő Ca^{2+} -belépés fenntartásában van, a STIM1 inaktiválódása után (Oh-hora 2009).



8. ábra. Az emberi STIM1 (felső panel) és Orai1 (alsó panel) szerkezete. EF: Ca^{2+} -kötő EF-hand domén, SAM: steril- α -motif, TM: transzmembrán domén, c-c: coiled-coil domén, ERM: ezrin-radixin moesin domén, S/P: szerin-prolin-gazdag domén, KKK: lizin-gazdag domén, CAD: CRAC-aktiváló domén, SOAR: STIM1 Orai-aktiváló régiója, P/R: prolin-arginin-gazdag domén, SCID: súlyos kombinált immunhiány (Dirksen 2009 alapján)

Az Orai1 csatorna

Az Orai csatornákat a görög mitológiából az Olümposz kapujának őrzőiről nevezték el (korábban CRAC modulátorként, CRACM-ként is emlegették őket; pl. Vig et al. 2006). A CRAC csatornák pórusképző alegységét, és ezáltal a SOCE mechanizmus egyik fő Ca^{2+} -belépési útvonalát alkotják. Emberben három Orai homológ található meg (Orai1-3). Mindegyikük 4-4 konzervált transzmembrán (TM) doménnel, és citoszólikus C- és N-terminussal rendelkezik (8. ábra, alsó panel). Emellett az Orai1 tartalmaz egy N-terminális prolin-arginin-gazdag (P/R) domént, egy glikozilációs helyet a TM2 és TM3 szegmentumok között, és egy C-terminális coiled-coil fehérje interakciós domént, ami a STIM1-gyel való kapcsolódáshoz, a STIM1-Orai1 ponttác képződéséhez, és a csatorna aktivációhoz szükséges. Ismert, hogy az aktivált CRAC csatorna négy Orai1 alegység funkcionális tetramere, ellenben vitatott, hogy nyugalmi állapotban dimer vagy tetramer formában létezik-e a molekula (Dirksen 2009).

Az Orai1 SOCE-ban játszott kiemelkedően fontos szerepét több tanulmány is bizonyítja. *Drosophila* sejtekben túltermeltetve, a CRAC áram 3-szorosára, míg STIM1-gyel is kotranszfektálva 8-szorosára nő (Zhang et al. 2006). A fehérje géncsendesítése teljesen megszünteti a CRAC áramot (Vig et al. 2006). Az Orai1 hibája betegségek kialakulását is okozhatja. A súlyos kombinált immunhiány (SCID) egy örökletes betegség, ami a SOCE és a CRAC áram elégtelenségével jár. Ezekben a betegekben az Orai1 pontmutációja is

megfigyelhető volt, ráadásul a betegekből származó T-limfocitákban és fibroblasztokban a vad típusú Orai1-gyel végzett transzfekció helyrehozta a Ca^{2+} -belépés hibáját. Ezen felül a SCID betegeknél miopátiát is leírtak, ami az NFAT transzlokáció, és az ezt követő génátírás elégtelenségével magyarázható. Ezeket szintén okozhatja az Orai1 hibája (Feske et al. 2006). Az Orai1 funkciójának pontosabb tanulmányozására létrehoztak egy Orai1 KO egeret, aminek a SCID betegekéhez hasonló tünetei voltak. A testmérete kisebb volt az átlagosnál, szőr hullás és bőrirritáció is megfigyelhető volt nála. A T- és B-limfocitáiban a SOCE és a CRAC áram is erősen lecsökkent (Gwack et al. 2008).

Célkitűzések

A vázizomsejtek intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -jának megváltoztatása olyan fontos élettani folyamatokat szabályoz, mint a kontrakció és az izomdifferenciálódás. Ezekben a folyamatokban számtalan fehérje vesz részt, melyek közül soknak a szerepe még mindig nem pontosan tisztázott.

Kutatásaimban az intracelluláris Ca^{2+} -szint megnövelésében részt vevő két fontos jelátviteli útvonal szabályozó fehérjéit vizsgáltam. Az IP_3 útvonal a belső raktárból felszabaduló Ca^{2+} segítségével járul hozzá az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedéséhez. Eddig meglehetősen kevés olyan fehérjét írtak le, ami az IP_3R -t közvetlenül szabályozza, a Trisk 32-ről azonban feltételezték, hogy ezek egyike lehet. Az IP_3R vagy a RyR aktiválódása során az ER/SR Ca^{2+} -tartalma csökken. A raktár feltöltésére szolgáló SOCE mechanizmus a STIM1, Orai1 és TRPC1 fehérjék összehangolt működésével, az extracelluláris Ca^{2+} bejuttatásával növeli meg az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, és további jelátviteli útvonalakat is aktivál. Fő célomnak azt tűztem ki, hogy a Trisk 32 és a TRPC1 vázizomban betöltött szerepét felderítsem, a róluk eddig leírt információkat pontosítsam, és újabakkal egészítsem ki.

A Trisk 32 funkciójának vizsgálata

A vázizom triadin négy izoformája közül a Trisk 32 élettani szerepéről van szinte a legkevesebb információnk. A fehérjét felfedező kutatócsoport – az SR longitudinális tubulusában való lokalizációja és az IP_3 -receptorral való kapcsolódása alapján – az IP_3 -receptoron keresztüli jelátvitelben betöltött szerepét tartotta valószínűnek (Vassilopoulos et al. 2005).

- Kísérleteink első részeként célunk volt egy, a Trisk 32-t stabilan overexpresszáló L6 myoblast sejtvonal létrehozása, ami alkalmas a fehérje funkciójának vizsgálatára.

- Meg kívántuk vizsgálni a túltermelt és az endogén Trisk 32 expresszióját L6.G8 myoblastokban, valamint a kolokalizációjukat az IP₃-receptorral, hogy ezen a sejtvonalon is alátámasszuk a felnőtt izomrostokról és tranziensen transzfektált tenyészetekről már leírt adatokat.
- Fluoreszcens [Ca²⁺]_i mérésekkel és konfokális mikroszkóppal kívántuk vizsgálni a Trisk 32 túltermelésének hatását az IP₃-receptor működésére. Ennek érdekében többféle agonistával, különböző sejtfelszíni receptorokon keresztül kívántuk aktiválni az IP₃-útvonalat, és közvetlenül az IP₃R-t.

Kutatásunktól azt reméltük, hogy a kapott eredmények segítségével igazoljuk a Trisk 32 IP₃-receptor szabályozására gyakorolt feltételezett szerepét.

A TRPC1 funkciójának vizsgálata

A TRPC1 SOCE mechanizmusban betöltött szerepe – a témával foglalkozó számos cikk ellenére – még mindig ellentmondásos. Arról sem egyeznek meg a vélemények, hogy a fehérje milyen kapcsolatban van a SOCE jobban ismert másik két fő résztvevőjével, a STIM1 és Orai1 fehérjékkel. Kutatásunk során a TRPC1 differenciálódó myotubulusokban betöltött szerepének a tisztázását tűztük ki célul.

- Ehhez először egy TRPC1-et overexpresszáló C2C12 sejtvonalat kívántunk létrehozni, aminek segítségével a túltermelt fehérje funkciójára a kontroll tenyészetekkel való összehasonlítás után fény derülhet.
- Legfontosabb kérdésünk a TRPC1 túltermelésének a SOCE mechanizmusban betöltött szerepére vonatkozott, így következő lépésként funkcionális [Ca²⁺]_i mérésekkel kívántuk igazolni, hogy a TRPC1 raktár által vezérelt csatornaként viselkedik.
- A TRPC1 túltermeltetésének a Ca²⁺-homeosztázisban részt vevő többi fehérje expressziójára gyakorolt hatását is vizsgálni kívántuk, hogy ez által felfedhessük a köztük lévő kapcsolatot. Közülük is leginkább a STIM1 és az Orai1 expressziójának és működőképességének megváltozása érdekelt minket.
- Mivel a TRPC1-ről leírták, hogy szerepet játszik a vázizomsejtek differenciálódásában, meg kívántuk nézni, hogy ez az általunk használt tenyészetekben változik-e.

Eredményeinktől azt vártuk, hogy hozzájárulnak a TRPC1 SOCE mechanizmusban és a vázizom differenciálódásban betöltött szerepének, valamint a STIM1-Orai1 rendszerrel való kapcsolatának megértéséhez.

Anyagok és módszerek

Sejtenyésztés és transzfekció

A sejtenyészetek használatának számos előnyös tulajdonsága van az élettani tárgyú kísérletek elvégzéséhez. A sejtek növekedése, morfológiai változásai mikroszkóp segítségével folyamatosan nyomon követhetők. Lehetőség van olyan sejtenyészetek létrehozására, amelyek csak egyféle sejttípust tartalmaznak, sőt immortalizált, folyamatosan osztódó, genotípusosan azonos, klónozott sejtek nagy tömegét is elő lehet állítani, ami a kísérletek jó reprodukálhatósága szempontjából jelentős. A kísérletek így közel azonos preparátumokon, többször is megismételhetők. Egyes gének hatásai transzfekciós módszerekkel közvetlenül tanulmányozhatók. A kísérletekhez nincs szükség élő állatok feláldozására. Az *in vitro* vizsgálatok ezen felül a kísérletező számára is előnyösek, hiszen így elkerülhető az állattal szembeni allergia kialakulása is. Ezek miatt az előnyök miatt a sejtenyészeteket széles körben használják a molekuláris biológiai és sejtélettani kutatások során. Az *in vitro* sejtenyészetek használatának legjelentősebb hátránya, hogy mivel a fenntartásukhoz szükséges körülményeket mesterségesen biztosítjuk, nem biztos, hogy a használatukkal kapott eredmények pontosan modellezik az élő szervezet sokszorosán szabályozott, *in vivo* válaszait. Emiatt különösen fontos *in vivo* kísérleteket is végezni, főleg ha bizonyos vegyületek gyógyszerre fejlesztése a cél. Továbbá a hosszú ideig fenntartott tenyészetek tulajdonságai mutációk révén módosulhatnak (pl. a differenciálódási képesség csökkenése), ezért bizonyos passzázsszám elérése után célszerű a tenyészetet kisebb passzázsszámúra cserélni (Szabó 2004).

A kísérleteket két különböző típusú vázizom sejtvonalon végeztük, melyekben liposzóma-mediált transzfekcióval termeltettük túl a vizsgálni kívánt fehérjéket.

L6.G8 patkány myoblastok

A Trisk 32 funkciójának vizsgálatához L6.G8 patkány vázizom eredetű sejtvonalat használtunk. Az eredeti L6 sejtvonalat Yaffe és munkatársai 1968-ban hozták létre (Yaffe 1968) újszülött patkányok combjából izolált primer myoblastok immortalizálásával. Ennek a G8 szubklónja elvesztette azt a képességét, hogy myoblastokból izomcsövekké tudjon differenciálódni, így kiválóan alkalmas az IP₃ útvonal tanulmányozására.

A sejteket Dulbecco által módosított Eagle-féle médiumban (DMEM; Sigma, Budapest, Magyarország) tenyésztettük, melyet 10% foetális borjúsérummal (FBS), 2 mM

glutaminnal, valamint 50 U/ml penicillin, és 50 µg/ml streptomycin antibiotikumokkal egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, párásított termosztátban, 5% CO₂ és 95% O₂ jelenlétében inkubáltuk. Passzálás során a sejteket 1000-2000 sejt/cm² sűrűségben szélesztettük, majd a kirakás utáni 4. napon végeztük rajtuk a méréseket.

C2C12 egér myoblastok és izomcsövek

A TRPC1 ioncsatorna szerepét C2C12 egér vázizom eredetű sejtvonalban vizsgáltuk. A C2C12 a Yaffe és mtsai. (Yaffe & Saxel 1977) által 1977-ben létrehozott egér vázizom eredetű myoblast sejtvonal egyik szubklónja (Blau et al. 1983). A sejtek felnőtt C3H egértörzs lábának harántcsíktolt izomzatából nyert immortalizált myoblastok, melyek lószérum hatására myotubulusokat képeznek. A differenciáltatást 90%-os sejtsűrűségnél kell megkezdeni, ugyanis ezen mértékű denzitás biztosítja a sejtfúziót megelőző sejt-sejt interakció meglétét. A kontraktilis myotubulusok jellegzetes izomfehérjéket (disztrofin, különböző szarkolemmális illetve SR-hez kapcsolódó regulatórikus és csatorna-fehérjék) termelnek, ezért kiválóan alkalmasak az izomdifferenciálódás, valamint myogenezis vizsgálatára.

Ezeknek a sejteknek a tenyésztési körülményei nagyban hasonlítottak a már tárgyalt L6 sejtekéhez. A myoblast tenyészet fenntartásához és a proliferációjuk elősegítéséhez a DMEM tápoldatot 10% FBS-sel, 50 U/ml penicillinnel, és 50 µg/ml streptomycinnel egészítettük ki. A kísérleteinkhez a tenyészetet izomcsövekké differenciáltattuk, miután elérték az ehhez szükséges 80-90%-os konfluenciát. A differenciálódás elindítása a tápoldat összetételének módosításával történt, melynek során a 10% FBS-t – a többi összetevőt nem változtatva – 5% lószérumra (HS) cseréltük. A kísérleteket 5-6 napos differenciált myotubulusokon végeztük.

Liposzóma-mediált stabil transzfekció

A liposzóma-mediált transzfekció során a plazmidot egy liposzóma membránnal vesszük körül, majd ezt a transzfekciós elegyet tesszük a sejtekre. A liposzóma vezikulum a plazmamembránnal egyesül, és bejuttatja a plazmidot a sejtbe. Az L6 sejtek transzfekciójához pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eukarióta expressziós vektor EcoRI hasító helyére klónozott patkány Trisk 32 vázizomfehérje (Vassilopoulos et al. 2005), míg a C2C12 sejtek transzfekciójához pcDNA3.1 plazmidba klónozott humán TRPC1 teljes cDNS szekvenciáját használtuk. A plazmid transzfekciót csökkentett szérumtartalmú Opti-MEM tápoldatban, Lipofectamine 2000 reagenssel (Invitrogen) végeztük, 2,5 órán át, 37 °C-on. A sejteket ezután hagytuk, hogy a bevitt géneket 48 órán keresztül expresszálják, majd 1 mg/ml

geneticin tartalmú DMEM-ben szelektáltuk őket. Mivel a pcDNA3.1 plazmid geneticin rezisztenciát is kódol, ezért azok a sejtek, amelyek transzfektálódtak, életben maradtak ezen eukarióták számára mérgező antibiotikum jelenlétében is. 14-15 nap elteltével egyedi sejtklónokat izoláltunk, meghatároztuk, hogy melyek termelik túl a legnagyobb mértékben a vizsgálni kívánt fehérjét, majd a funkcionális méréseket ezeken a klónokon végeztük.

Ahhoz, hogy bizonyítsuk, hogy maga a transzfekció nem okoz változásokat a sejtek életfunkcióiban, ugyanezt a protokollt használva üres pcDNA3.1 vektorral transzfektáltunk L6.G8 és C2C12 sejteket. Ebben az esetben nem izoláltunk egyedi sejtklónokat, hanem a sejtek pool-jain végeztük a funkcionális méréseket.

A Trisk 32 és TRPC1 overexpresszió hatékonyságát mRNS szinten reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR), fehérje szinten immuncitokémia és Western-blot segítségével vizsgáltuk, melyekhez a fehérjék C-terminális vége ellen termeltetett specifikus antitesteket használtuk.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A TRPC1 és Trisk 32 mRNS szintű kimutatását reverz transzkripció PCR-ral (RT-PCR) végeztük. A C2C12 sejtenyészeteket 3-szor átmostuk jéghideg foszfát puffer-oldattal (PBS; 0,02 M NaH₂PO₄, 0,1 M NaCl), folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Az izomcsövek teljes RNS-ét Qiagen RNeasy® Mini Kit-tel izoláltuk a gyártó utasításai szerint (Qiagen, Budapest, Magyarország). A pozitív kontrollként használt egér vázizomból és egér agyból, valamint az L6 sejtekből Trizol reagens (Invitrogen) segítségével izoláltunk RNS-t a gyártó utasításai szerint. Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop (NanoDrop Technologies, Bio-Science, Magyarország) készülék segítségével ellenőriztük.

A reverz transzkripció reakcióhoz Omniscript kit-et használtunk (Qiagen). A reakcióelegy (20 µl végtérfogatban) 500 ng RNS-t, 0,25 µl RNáz inhibitor, 0,25 µl oligo (dT) primert, 2 µl dNTP-t (200 µM), 1 µl M-MLV RT enzimet tartalmazott 1×RT pufferben hígítva. A TRPC1-re ill. a Trisk 32-re specifikus cDNS szekvenciák amplifikációja specifikus primerekkel történt (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), melyeket az Interneten közölt humán és egér TRPC1 (GenBank Accession No.: NM_003304) ill. patkány Trisk 32 (GenBank Accession No.: AJ812276) nukleotid szekvenciák alapján terveztünk a Primer Premier 5.0 program (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) segítségével. Az így kapott TRPC1 forward primer szekvenciája 5'-GATGTGCTTGGGAGAAATGC-3', a reverz primeré pedig 5'-

GTCCAAACCAAACCGTGTTC-3' volt. A Trisk 32 forward primer szekvenciája 5'-TGAACGATGTTGTGGAGGAA-3', a reverz primeré 5'-CTCTGGCTTTCGGTGTTC-3' volt. A kontrollként használt GAPDH forward primer szekvenciája 5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG-3', a reverz primeré 5'-AATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3' volt. Az 50 µl végtérfogatú PCR-reakcióelegy a következő komponensekből állt: 2 µl forward és reverz primer, 1 µl dNTP (200 µM), és 0,5 µl Promega GoTaq® DNS polimeráz 1× töménységűre hígított pufferben. A PCR reakciót programozható termosztátban (Eppendorf Mastercycler, Netheler, Hinz GmbH, Hamburg, Németország, ill. Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad, Budapest, Magyarország) a következő beállításokkal hajtottuk végre: 2 perc 95 °C a kezdeti denaturációra, amit ismétlődő denaturációs ciklusok követtek 94 °C-on 1 percig, ezután a primerek anellációja 1 percig a primer számára optimális hőmérsékleten, majd végül az elongáció 72 °C-on 1 perc, 30 s-ig. Az utolsó ciklus után egy további elongációs lépés következett 10 percig, 72 °C-on. A PCR-termékeket 2%-os agarózgélben futtattuk meg, etídium-bromiddal ill. EZ-Vision Three reagenssel (Amresco, Solon, USA) jelöltük, Gel Logic 1500 előhívó rendszerrel előhívtuk, majd analizáltuk. Az eredmények kvantitatív elemzését ImageJ programmal végeztük.

Immuncitokémia

A sejtekben található különböző fehérjék lokalizációjának vizsgálatához immuncitokémiát használtunk. A tenyészeteket jéghideg PBS-sel mostuk le, majd -20 °C-os 100%-os metanollal vagy 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 15 percig, utána PBS-ben oldott 0,1%-os Triton X-100-zal permeabilizáltuk 10 percig. Ezután az aspecifikus kötőhelyeket PBS-ben oldott 1%-os borjúsérum albuminnal (BSA) blokkoltuk 30 percig, szobahőmérsékleten. A blokkolás után a sejteket egész éjszakán keresztül inkubáltuk 4 °C-on, a blokkoló oldatban (BSA) oldott elsődleges antitestekkel, melyek a következők voltak:

- A patkány Trisk 32 C-terminális végét felismerő, nyúlban vagy tengerimalacban termeltetett elsődleges antitesteket 1:500 hígításban alkalmaztuk (Dr. Isabelle Marty ajándéka; Vassilopoulos et al. 2005).
- Az IP₃ receptor I, II, III altípusainak a C-terminális 2402-2701 aminosav szekvenciájú epitópját felismerő, nyúlban termeltetett poliklonális antitestet 1:50 hígításban használtuk (Santa-Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Németország).
- A B2 bradykinin receptor C-terminális végét felismerő, nyúlban termeltetett elsődleges antitestet 1:100 arányban hígítottuk (Sigma).

- Az arginin-vazopresszin (AVP) receptor V1a altípusának C-terminális 349-418 aminosavait felismerő, nyúlban termeltetett poliklonális elsődleges antitestet 1:50 hígításban használtuk (Santa-Cruz).
- A TRPC1 intracelluláris 557-571 aminosav szekvenciáját felismerő, nyúlban termeltetett elsődleges antitestet 1:100 arányban hígítottuk (Alomone Labs Ltd. Jeruzsálem, Izrael).
- A STIM1 56-69 aminosavait felismerő, nyúlban termeltetett elsődleges antitestet 1:50 arányban hígítottuk (Alomone).
- Az Orail 288-301 aminosavait felismerő, nyúlban termeltetett elsődleges antitestet 1:50 hígítási arányban használtuk (Sigma).

Az egész éjszakás inkubációt követő, PBS-sel történő mosás után fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) vagy Cy3-mal jelölt, a nyúlban termeltetett elsődleges antitestet felismerő másodlagos antitestet (PBS-ben hígítva 1:500, ill. 1:800 arányban), vagy FITC-cel konjugált, a tengerimalacban termeltetett elsődleges antitestet felismerő másodlagos antitestet (1:500 arányban) alkalmaztunk – az elsődleges antitestet termelő fajnak megfelelően – 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A sejtmagok láthatóvá tétele Vectashield DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindole) történt (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

A megfestett tenyészetekről LSM 510 META konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket (Zeiss, Oberkochen, Németország).

Fehérjeminták és sejtmagfrakciók készítése

A tenyészeteket jéghideg PBS-sel mostuk, majd homogenizációs pufferben (összetevői: 20 mM Tris-Cl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride, 20 μ M leupeptin, pH 7,4; minden a Sigma-tól) szedtük fel. A mintákat folyékony nitrogénes gyorsfagyasztás után a felhasználásig -70 °C-on tároltuk. A minták feltárását jégen, 5-ször 10-10 másodpercig történő szonikálással végeztük (Branson Sonifier, Danbury, USA).

A sejtmagfrakciók izolálását intézetünk egy korábbi cikkében leírt módszer szerint végeztük (Pocsai et al. 2006). Ennek során a sejteket 4 °C-os CMF-PBS-ben felszedtük, majd 10 percig 4 °C-ra hűtött centrifugában 1000 g-vel centrifugáltuk. A sejtpelletet puffer A-ban (10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0,5 mM fenilmetilszulfonil-fluorid, pH 7,4) szuszpendáltuk, majd 20 perc elteltével Dounce-homogenizátorban 0,5% Nonidet-P40 (Sigma) hozzáadásával homogenizáltuk. Ezután 10 percen keresztül, 4 °C-on, 770 g-vel centrifugáltuk a mintákat. Az

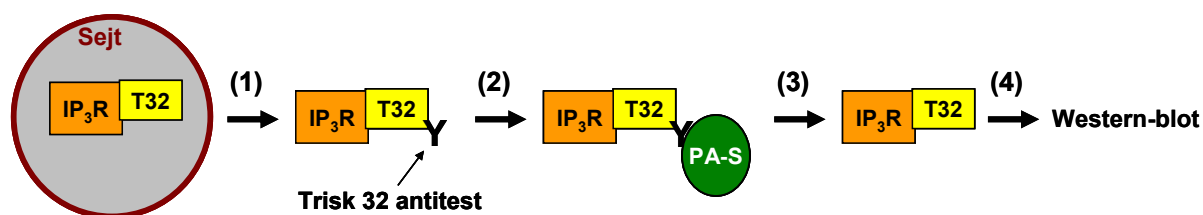
üledéket 2,2 M szacharózt tartalmazó puffer A-ban felvéve, 90 percig, 4 °C-on, 40000 g-vel centrifugáltuk. Az ezután kapott üledéket 0,25 M szacharózt tartalmazó puffer A-val lemostuk, majd beoldottuk, és szonikálással feltártuk.

A minták fehérjekoncentrációját módosított BCA (bicinchoninic acid) protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg, melynek során BSA-t használtunk standardként.

A Trisk 32 kimutatását célzó Western-blot kísérletekhez pozitív kontrollként használt, patkányból izolált könnyű-SR vezikulum frakciót Dr. Jóna Istvántól kaptuk ajándékba (Almassy et al. 2008).

Ko-immunoprecipitáció

A Trisk 32 és IP₃R kölcsönhatásának kimutatására a ko-immunoprecipitációs vizsgálatokat francia kollaborációs partnerünk, Sarah Oddoux végezte a munkacsoportjuk által már korábban leírt módon (Marty et al. 1994).



9. ábra. A ko-immunoprecipitáció lépései. (1) sejt lizátum készítése, a Trisk 32 antitest hozzáadása. (2) a komplex kikötése Protein A-Sepharose-hoz. (3) mosás, a komplex megtisztítása. (4) a minták vizsgálata Western-blottal.

Ennek során a tőlünk kapott kontroll és Trisk 32-t overexpresszáló L6 sejteket szolubilizálták egy szolubilizáló pufferben, amely a következő összetevőkből állt: 1,6% (wt/vol) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid (CHAPS), 0,9 M NaCl, 0,1% foszfolipid (tojás totál foszfátid kivonat, Avanti Polar Lipids), 100 µM CaCl₂, 50 µM EGTA, 20 mM Pipes (pH 7,1), proteáz inhibitorok (10 µM leupeptin, 2 µM pepsztatin, 1 mM diizopropil fluorofoszfát, és 100 µM fenilmetánszulfonil fluorid). A szolubilizált fehérjemintákat ezután PBS és víz 1:1 arányú keverékével hígították. A protein A-Sepharose-hoz történő aspecifikus kötődések elkerülésére a szolubilizált fehérjéket 30 percig, 4 °C-on inkubálták Sepharose 4B-CL jelenlétében, majd a Sepharose-t centrifugálással távolították el. A felülúszót ezután 2 órán keresztül 4 °C-on inkubálták a Trisk 32 elleni elsődleges antitesttel, majd további 2 órán keresztül reagáltatták a protein A-Sepharose-zal 4 °C-on, rázatás mellett. Háromszori PBS-es mosást követően az immunkomplexekeket Laemmli-mintapufferrel

disszociálták a protein A-Sepharose-ról. Az immunoprecipitált fehérjéket ezután Western-blottal vizsgálták Trisk 32 és IP₃R-III elleni antitestekkel (9. ábra).

Western-blot analízis

A teljes sejt lizátumokat, sejtmag frakciókat, immunoprecipitált mintákat, valamint a könnyű-SR vezikulum frakciókat Western-blot analízissel vizsgáltuk. 1/5 térfogatú, 5-szörös töménységű elektroforézis mintapuffert (310 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS, 50% glicerol, 100 mM DTT, 0,01 % brómfenol-kék) adtunk a sejt-lizátumokhoz, majd 5 percig 80 °C-on főztük őket. Azonos mennyiségű, 50-100 µg fehérjét választottunk szét 7,5 vagy 10%-os nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) gélen a vizsgált fehérjék immunológiai detektálásához. Ezután a fehérjéket elektroforézis segítségével transzferáltuk nitrocellulóz membránra (BioRad, Bécs, Ausztria). Az aspecifikus kötőhelyeket PBS-ben oldott 5%-os sovány tejporral blokkoltuk, majd 4 °C-on, egész éjszakán keresztül inkubáltuk az immuncitokémia fejezetben nagyrészt már tárgyalt elsődleges antitestekkel, melyeket a következő arányokban hígítottunk a tejporos blokkoló oldatban: nyúlban termeltetett Trisk 32 antitest 1:5000, TRPC1 antitest 1:200, STIM1 antitest 1:500, Orai1 antitest 1:500. Az immuncitokémia fejezetben nem említett antitestek a következők voltak:

- Az IP₃R I. típusának 1894-1973 aminosavait felismerő, nyúlban termeltetett poliklonális elsődleges antitestet 1:200 arányban hígítottuk (Santa-Cruz).
- Az IP₃R II. Típusának C-terminális végét felismerő, kecskében termeltetett poliklonális elsődleges antitestet 1:200 arányban hígítottuk (Santa-Cruz).
- Az IP₃R III. típusának 22-230 aminosavait felismerő, egérben termeltetett monoklonális elsődleges antitestet 1:200 arányban hígítottuk (BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix-Cedex, Franciaország).
- A calsequestrin 282-389 aminosavait felismerő, egérben termeltetett monoklonális elsődleges antitestet 1:200 arányban hígítottuk (BD Transduction Laboratories, USA).
- A rianodinreceptor (RyR) 1. és 2. altípusát felismerő, egérben termeltetett monoklonális elsődleges antitestet 1:2500 hígításban alkalmaztuk (Affinity BioReagents, USA).
- A SERCA-t felismerő, nyúlban termeltetett elsődleges antitestet 1:1000 hígításban alkalmaztuk (Dr. Zádor Ernő ajándéka).

- Az aktivált T-sejtek nukleáris faktorának 1. típusát (NFAT1) felismerő, nyúlban termeltetett poliklonális elsődleges antitestet 1:1000 hígításban alkalmaztuk (Abcam, Cambridge, UK).
- Az aktin C-terminusát felismerő, nyúlban termeltetett poliklonális elsődleges antitestet 1:200 hígításban alkalmaztuk (Santa-Cruz).

Ezután 3-szor 10 perc PBST-vel (PBS kiegészítve 0,1% Tween 20 reagenssel) történő mosás következett, majd a membránokat 1 órán keresztül inkubáltuk a másodlagos antitestekkel. Másodlagos antitestként az elsődleges antitestet termelő faj (nyúl vagy egér) ellen kecskében termeltetett, tormaperoxidázzal (HRP) konjugált IgG-t (BioRad) használtunk 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben 1:1000 arányban hígítva. A jeleket megnövelt kemilumineszcens (ECL) reakcióval (Thermo Scientific, Budapest, Magyarország) hívtuk elő, az intézetünkben rendelkezésünkre álló Gel Logic 1500 előhívó rendszerrel.

Apoptózis vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál megszűnése az apoptózis egyik legkorábbi markere (Green & Reed, 1998). A folyamat nyomon követéséhez kontroll és TRPC1-et overexpresszáló C2C12 izomcsövek membránpotenciálját határoztuk meg MitoProbe DiIC₁(5) Assay Kit (Invitrogen) segítségével, a gyártó utasításai szerint. Az alkalmazott koncentrációban a festék felhalmozódik a sejtben, és a magas membránpotenciállal rendelkező mitokondriumokban jelentős fluoreszcenciát mutat. Az apoptotikus folyamatok esetén a sejtek mitokondriális membránpotenciálja lecsökken, így a festék által kibocsátott fluoreszcencia intenzitása is csökkenő tendenciát mutat.

Kontroll és transzfektált C2C12 sejteket tenyésztettünk egy 96 lyukú, fekete oldalú, átlátszó aljú tenyésztőedény (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Németország) 9-9 tenyésztőlyukában. További 3-3 tenyésztőlyukban az apoptózis pozitív kontrolljaként carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) nevű protonofórral kezeltünk sejteket mindkét sejttípusból. A sejtekről az oldatok eltávolítása után DiIC₁(5) munkaoldattal inkubáltuk a tenyészeteket (100 µl/tenyésztőlyuk). A DiIC₁(5) fluoreszcenciáját FLIPR készülékkel mértük 630 nm-es gerjesztő és 670 nm-es emissziós hullámhosszokon (Dobrosi et al. 2008; Tóth et al. 2009).

Életképesség vizsgálata

A sejtek életképességének meghatározását MTT assay-vel mértük, melynek alapja, hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzime a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazólium bromid (MTT; Sigma-Aldrich) tetrazólium gyűrűjét oldhatatlan, színes formazánná alakítja, így annak mennyisége kolorimetriásan meghatározható.

Kontroll és TRPC1-et overexpresszáló C2C12 sejteket 24 lyukú tenyésztőedény 8-8 lyukában tenyésztettünk, majd izomcsövekké differenciáltattunk. Az izomcsöveket 2 órán keresztül 0,5 mg/ml MTT-vel inkubáltuk, majd a formazán kristályok koncentrációját kolorimetriásan, 570 nm-es hullámhosszon határoztuk meg, a gyártó utasításai szerint. A formazán mennyisége az élő sejtek számával arányos.

Kontroll, üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált, és Trisk 32-t overexpresszáló L6 myoblastokat 96 lyukú tenyésztőedény 10-10 lyukában tenyésztettünk, majd a fenti protokollt alkalmaztuk az életképességük meghatározására.

A proliferációs ráta és a fúziós index meghatározása

Kontroll és TRPC1-et overexpresszáló C2C12 sejteket tenyésztettünk műanyag Petri-csészékben (Nunc, Naperville, IL, USA) azonos körülmények között. A tenyésztés minden napján képeket vettünk fel minden Petri-csésze 10-10 véletlenszerűen kiválasztott látóteréről. A kísérlet kezdetekor a sejtek száma gyakorlatilag megegyezett ($p > 0,2$). A proliferációs ráta kiszámításához minden nap megszámoltuk a sejtmagokat és elosztottuk az előző nap során számoltakkal. A fúziós index kiszámításához a differenciáltatás elindítása után a többmagvú izomcsövekben található magok számát osztottuk el az összes sejtmag számával. A kísérleteket megismételtük 3-3 különálló tenyészetben.

A proliferáció mértékének meghatározása ^3H -timidin beépüléssel

Az L6 sejtek osztódóképességét a DNS egyik alapvető építőelemének számító timidin radioaktív trícium (^3H) izotóppal jelölt formájának beépülésével vizsgáltuk. A timidin a 16 órás inkubációs idő alatt a DNS szintézissel (és a sejtproliferációval) arányos mértékben beépül a sejtek örökítőanyagába.

Kontroll, üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált, és Trisk 32-t túltermelő L6 myoblastokat tenyésztettünk egy speciális, fehér belsejű, 96-lyukú tenyésztőedény (Wallac, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) 10-10 tenyésztőlyukában. 1 $\mu\text{Ci/mL}$ ^3H -timidin tartalmú tápoldatot (metil- ^3H -timidin törzsoldatból kihígítva; 185 GBq/mmol, Amersham Biosciences, Budapest, Magyarország) adtunk a tenyésztőlyukakhoz 16 órára. PBS-sel történő mosás után a szolubilis fehérjét 5%-os triklórecetsavval csaptuk ki, majd újra lemostuk PBS-sel. A tenyészeteket ezután 2 napig szárítottuk foszfor-pentoxidot tartalmazó exsikkátorban, majd szcintillációs folyadékot (MaxiLight; Hidex, Finnország)

helyeztünk rájuk. A radioaktivitást Chameleon liquid scintillation counter készülékkel (Chameleon, Hidex Ltd., Turku, Finnország) mértük, folyadék-szcintillációs üzemmódban.

NFAT riporter rendszer, X-Gal festés

A β -galaktozidáz nevű bakteriális enzimet (lacZ gén) gyakran használják riporter génként. A jelenléte könnyen kimutatható lacZ festéssel, melynek során a mesterséges X-Gal szubsztrát a β -galaktozidáz által hasítva kékes színváltozást mutat. Az NFAT aktivitását kontroll és TRPC1-et túltermelő C2C12 myotubulusokban a Rosenberg és munkatársai (Rosenberg et al. 2004) által kifejlesztett HSP-NRE lacZ plazmid (Zádor E. ajándéka) segítségével vizsgáltuk. A pNFAT plazmid (Stratagene) NFAT kötő helyeit kivágták, PCR-ral felszaporították, majd hsp68-lacZ vektorba klónozták.

A plazmid transzfekciót a differenciálódás 2. napján, csökkentett szérumtartalmú Opti-MEM tápoldatban, Lipofectamine 2000 reagenssel (Invitrogen) végeztük, 2 órán át, 37 °C-on. A transzfektált sejtek az NFAT aktivitás függvényében β -galaktozidázt expresszáltak a plazmidról.

Az 5 napos, terminálisan differenciálódott myotubulusokat 4 °C-os 0,5%-os glutáraldehiddel (PBS-ben hígítva) fixáltuk, majd 3-szor mostuk PBS-sel. Ezután reakciópufferben (20 mM $K_4Fe(CN)_6$, 20 mM $K_3Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$ PBS-ben, pH 7,8) oldott 1 mg/ml X-Gal-t (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-B-D-galactoside; Invitrogen) helyeztünk a fedőlemezekre egész éjszakán keresztül. A sejtek a β -galaktozidáz aktivitással arányos mértékű kékes elszíneződést mutattak. A fedőlemezeket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, az eredeti nagyítás 10 $\times$ volt. Az elemzés során minden myotubuluson 5-5 ROI-t jelöltünk ki, majd a festődés intenzitását ImageJ programmal kvantifikáltuk.

Egyedi sejteken történő fluoreszcens, intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -mérés

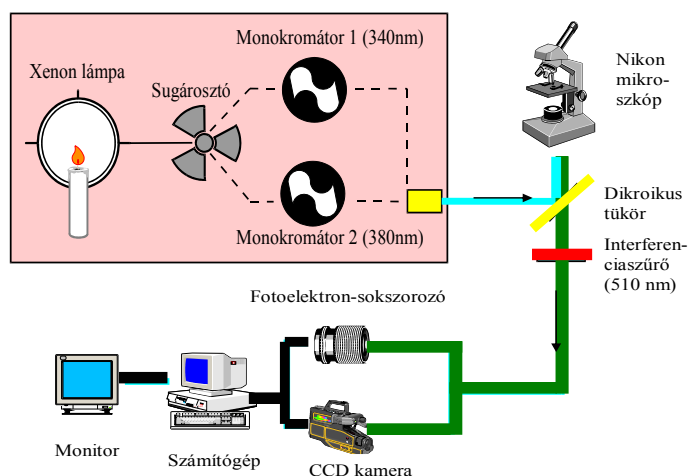
Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásának mérését a Photon Technology International (PTI) Delta ScanTM rendszer segítségével végeztük (10. ábra). A mérés alapelve, hogy a Ca^{2+} -ot kötött fluoreszcens festék abszorpciós maximuma (340 nm) eltér a Ca^{2+} -ot nem kötött festékétől (380 nm), így a két különböző abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon gerjesztve a sejtet, a két hullámhosszon való gerjesztést követően emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ kiszámolható (Grynkiewicz et al. 1985.). A fedőlemezen lévő sejteket kalciumérzékeny, fluoreszcens Fura-2 festék acetoximetilészter (AM) formájával inkubáltuk. Az extracelluláris észterázok gátlására neostigmint

alkalmaztunk. A festékkel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket fluoreszcens mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük.

A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a PTI Delta Scan kettős monokromátoros berendezés biztosította. Fényforrásként a rendszer xenonlámpája szolgál, melynek fényét egy forgótükrös sugárosztó két nyálábra osztja. A keletkező sugarak külön-külön monokromátoron haladnak 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 fotoelektronsokszorozó (PMT) 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 et al. 1985.) alapján számítottuk ki az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációkat:

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

ahol K_d a disszociációs állandó, 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.



10. ábra. A PTI Delta Scan mérőrendszer felépítése. A sejtekben lévő Ca^{2+} -érzékeny festéket 340 és 380 nm hullámhosszon gerjesztjük, majd az emissziót 510 nm-en detektálva, a hányadosukból az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kiszámítható.

Az $[Ca^{2+}]_i$ változásait Fura-2 kalciumkötő fluoreszcens festékkel mértük a laborunk által már korábban leírt módon (Szappanos et al. 2004). Kontroll és transzfektált L6 myoblastokat és C2C12 izomcsöveket műanyag Petri-csészékbe helyezett 30 mm átmérőjű fedőlemezekben (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) tenyésztettünk, majd 1 órán keresztül 10 μ M Fura-2 AM-mel inkubáltunk saját tápoldatukban (DMEM, 10% FBS-sel kiegészítve), termosztátban (37 °C, 5% CO₂). Az izomsejtek által a tápoldatba szekretált acetilkolin-észteráz gátlására – melyek az AM csoportot a festékről lehasítva megátolnák a Fura-2 sejtekbe történő bejutását – neostigmint alkalmaztunk. A Fura-2 AM-mel töltött sejteket egy speciális mérőkádban egy invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot; Nikon, Tokyo, Japan) tárgyasztalára helyeztük, majd 40×-es nagyítású olajimmerziós objektívvel vizsgáltuk. A vizsgálatokat normál (NTY; 137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 11,8 mM HEPES, 1 g/l glükóz, pH 7,4; minden a Sigma-tól) vagy kalciummentes (a CaCl₂-ot azonos mennyiségű MgCl₂-ra cseréltük, 5 mM EGTA hozzáadásával) Tyrode-oldatban végeztük. A sejteket folyamatosan perfundáltuk NTY vagy kalciummentes Tyrode-oldattal egy külső perfúziós rendszer segítségével. A mérőoldatokat közvetlenül a kiválasztott sejtekre juttattuk egy 250 μ m-es belső átmérőjű lokálperfúziós kapilláris tűn keresztül (Perfusion Pencil™; AutoMate Scientific, San Francisco, CA, USA) 0,35 ml/perc sebességgel, melynek az adagolását egy lokálperfúziós rendszerrel (Valve Bank™ 8 version 2.0, AutoMate Scientific) vezéreltük.

A kísérletekhez a következő mérőoldatokat használtuk:

- az IP₃ útvonal B2 receptorokon keresztül történő aktiválásához 20 μ M bradykinint (BK; Sigma), NTY és kalciummentes Tyrode-oldatban
- az IP₃ útvonal V1 receptorokon keresztül történő aktiválásához 0,1 μ M arginin-vazopresszint (AVP; Sigma), kalciummentes Tyrode-oldatban
- az IP₃R közvetlen aktiválásához 50 μ M thimerosalt (Sigma), kalciummentes Tyrode-oldatban
- a SOCE aktiválásához a SERCA-gátló thapsigargin (Sigma) 2-4 μ M koncentrációban, kalciummentes Tyrode-oldatban
- a SOCE gátlásához egy nem specifikus TRPC antagonistát, az YM-58483-t (Sigma) 1 μ M koncentrációban, kalciummentes Tyrode-oldatban
- a C2C12 izomcsövek depolarizálásához, ezáltal a RyR aktiválásához 120 mM KCl-ot NTY oldatban
- az L6 sejteken a RyR közvetlen aktiválásához 30 mM koffeint (Sigma) NTY oldatban

- a RyR gátlásához 10 μM rianodint (Sigma) NTY oldatban
- az IP₃R gátlásához 50 μM Xestospongin C-t (Merck, Budapest, Magyarország), 1 órás előkezelés formájában, NTY oldatban

A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A gerjesztő hullámhosszt 340 és 380 nm között váltogattuk egy kettős hullámhosszú monokromátor (Delta Scan, Photon Technology International, New Brunswick, NJ, USA) segítségével, míg az emissziót 510 nm-en detektáltuk egy fotoelektronsokszorozót használva. A mérési eredményeket egy, az intézetünkben fejlesztett program segítségével elemeztük ki.

Az intracelluláris kalciumkoncentráció és a kalciumfluxus kiszámítása

Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a fluoreszcenciaintenzitások arányából ($R = F_{340}/F_{380}$) számolható ki *in vivo* kalibrációt használva ($R_{\min} = 0.2045$, $R_{\max} = 8.315$, $K_d \times \beta = 1183 \text{ nM}$) a korábban leírtak szerint (Grynkiewicz et al. 1985). A Ca^{2+} -pumpa aktivitása és a Ca^{2+} -fluxus (a sejtekbe 1 másodperc alatt belépő Ca^{2+} mennyisége) meghatározásához a Ca^{2+} intracelluláris kötőhelyekhez történő kötődését és a sejtől történő eltávolítását modellezte laborunk, ahogyan erről már korábban beszámoltak (Szappanos et al. 2004; Sztretye et al. 2007). A fluxus (FI) számításához a következő képletet használtuk:

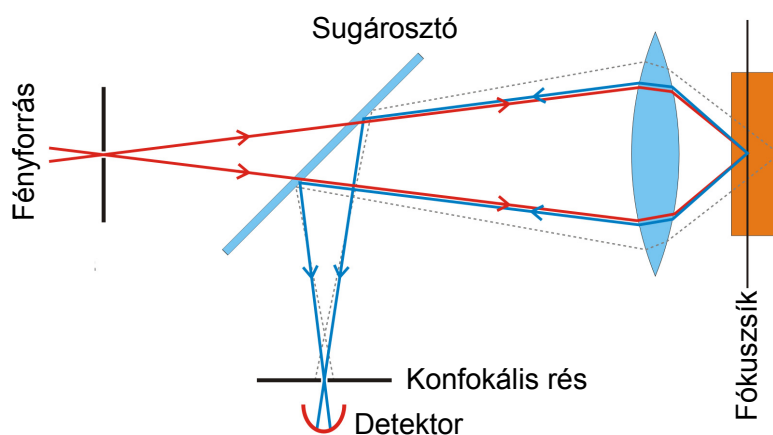
$$\text{FI} = d(\text{Ca}_{\text{tot}} + \text{Ca}_{\text{tran}})/dt$$

ahol Ca_{tot} a teljes myoplazmás Ca^{2+} mennyiség, Ca_{tran} pedig a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok által szállított Ca^{2+} . A modellben a Ca^{2+} intracelluláris helyekhez – SERCA pumpához, troponin C-hez, parvalbuminhoz és a festékhez – történő kötődését és az eltávolítását vettük figyelembe. A Ca^{2+} -pumpa maximális transzportkapacitása ($\text{PV}_{\max}$) a Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárára illesztett görbéből határozható meg, az intézetünk által kifejlesztett, a legkisebb négyzetek módszerét alapul vevő számítógépes program segítségével. A modell többi paraméterét állandóként kezeltük az irodalomból vett adatokat felhasználva (Schuhmeier et al. 2003).

Konfokális mikroszkópos mérések

A konfokális mikroszkópia nagy előnye, hogy jobb felbontású és kontrasztosabb képet ad a hagyományos fluoreszcens mikroszkópokhoz képest, és viszonylag vékony (1-2 μm) rétegekről alkothatunk vele képeket a minta felszeletelése nélkül, akár élőben is (Szabó 2004). A hagyományos mikroszkópiában gyakran jelent problémát, hogy nem csak a vizsgálni kívánt fókuszsíkból, hanem a minta ez alatti vagy e fölötti rétegeiből érkező fényt is detektáljuk, ami rontja a kép élességét. A konfokális mikroszkóp egyszerre csak a minta egy-egy pontját

világítja meg, és ezekből a képpontokból számítógépes adatfeldolgozás segítségével készül el a végső kép. Fényforrása egy nagyteljesítményű lézer fényforrás, ami egy dikroikus tükör segítségével a mikroszkóp objektív lencséjébe juttatja a fényt, ami azt a minta egy pontjára fókuszálja, és a minta által kibocsátott fluoreszcens fényt is összegyűjti. A minta egy adott síkjából jövő fény a mikroszkóp optikai rendszerén áthaladva a detektorba jut. A detektor előtt egy kis méretű lyukkal ellátott, a fényt nem áteresztő lemez található, ami azt a célt szolgálja, hogy a detektor csak akkor érzékelje a fényt, ha az pontosan a lyukba fókuszál. Így tehát a preparátum fókuszsíkon kívüli minden más síkjából érkező fény nagy része kirekesztődik a detektálásból (11. ábra). A mikroszkóp ezen a módon egyszerre csak egyetlen képpont rögzítését végzi el. A lézerfényt pásztázó tükrök segítségével mozgatva, meghatározott területen, soronként pásztázva, a kapott adatokat számítógépes program segítségével összegezve lehet kialakítani a végleges képet (Damjanovich & Mátyus 2000, Röhlich 2006).



11. ábra. A konfokális mikroszkóp működési elve. A berendezés lehetővé teszi, hogy a mintánk egy vékony optikai szeletéről készítsünk felvételeket, és ezáltal a hagyományos fluoreszcens mikroszkópoknál élesebb képet kapjunk.

Kísérleteink során a konfokális mikroszkópot kétféle üzemmódban használtuk. Kétdimenziós leképezés esetén a rendszer soronként végigpásztázza a vizsgált sejtet reprezentáló pixeleket, és az egyes fluoreszcencia-intenzitásokat x-y koordináta-rendszerben ábrázolja. Ilyen formában a sejtről a hagyományos fluoreszcens mikroszkóppal készített képekhez hasonló – de annál élesebb és kontrasztosabb – kétdimenziós képet kapunk. Ezt az üzemmódot leginkább az immuncitokémiai vizsgálatoknál alkalmaztuk. Amikor line-scan üzemmódban használtuk a mikroszkópot, akkor a sejtről felvett kétdimenziós x-y képen egy, a sejtet keresztben átvágó vonalat húztunk számítógépes program segítségével. A konfokális

mikroszkóp lézere ezután ezen a vonalon pásztázott az általunk megadott beállítási paraméterek szerint. Az így kapott kép az adott vonalon a mérés alatt végbement fluoreszcenciaintenzitás-változást mutatja be az idő függvényében. A line-scan üzemmódban készített felvételeket az $[Ca^{2+}]_i$ megváltozásának nyomon követésére használtuk.

Az $[Ca^{2+}]_i$ megváltozásának méréséhez LSM 510 META konfokális lézerpásztázó mikroszkópot (Zeiss, Oberkochen, Németország) használtunk, a korábban leírtak alapján (Szentesi et al. 2004).

Kontroll, üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált, és Trisk 32-t túltermelő L6 myoblastokat 10 μ M Fluo-4-AM kalciumkötő festékkel inkubáltunk 1 órán keresztül, 37 °C-on, neostigmin jelenlétében. A méréseket kalciummentes Tyrode-oldatban végeztük, hogy az extracelluláris közegből esetlegesen beáramló kalcium ne fedje el az IP_3 receptoron keresztüli Ca^{2+} -felszabadulás tranzienseit. A fluoreszcenciaintenzitás változásainak követésére line-scan felvételeket készítettünk, vonalanként 24 ms és 512 pixel felbontással, 63 $\times$ vízimmerziós objektívet használva.

A Fluo-4-et argonion lézerrel gerjesztettük 488 nm hullámhosszon, és a fluoreszcencia intenzitást 500-570 nm-es áteresztő szűrő segítségével detektáltuk. A sejteket kalciummentes Tyrode-oldattal folyamatosan perfundáltuk egy külső perfúziós rendszer segítségével. Az IP_3 receptorok aktiválásához a kalciummentes Tyrode-oldatban hígított 0,1 μ M AVP-t közvetlenül a kiválasztott sejtekre juttattuk egy 250 μ m-es belső átmérőjű lokálperfúziós kapilláris tűn keresztül (AutoMate). A méréseket szobahőmérsékleten (20-22 °C) végeztük. A felvételeket egy, az intézetünkben fejlesztett program (Szentesi et al. 2004) segítségével elemeztük ki. A felvételek fluoreszcenciáját (F) az alap fluoreszcenciára (F_0 ; a sejtek nyugalmi fluoreszcencia-intenzitása a tranziensek előtt) normalizáltuk, majd a tranziensek amplitúdóját $\Delta F/F_0$ -ként határoztuk meg.

Adatelemzés és statisztika

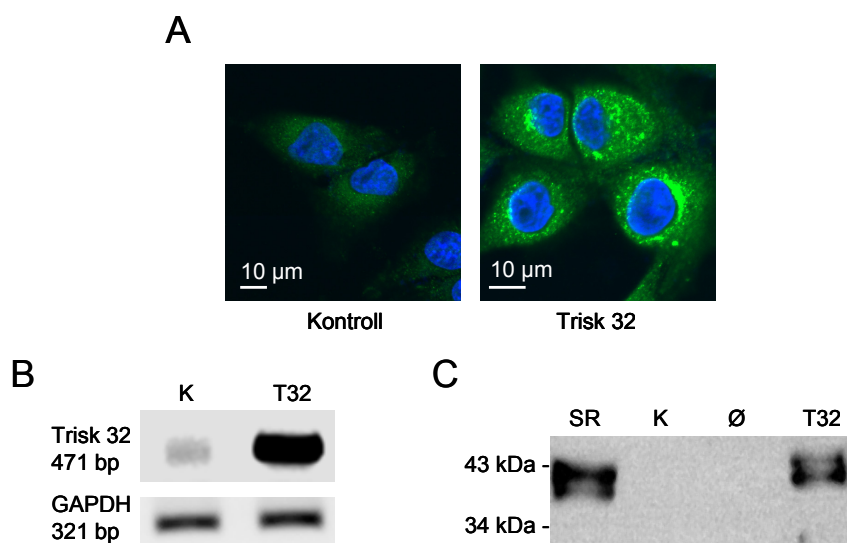
Minden értéket az átlagokkal $\pm$ az átlagok standard hibájával (SE) jellemeztünk. A statisztikai szignifikanciát Student-féle t -próbával számoltuk, $p < 0,05$ értékeket tekintve szignifikánsnak.

Eredmények

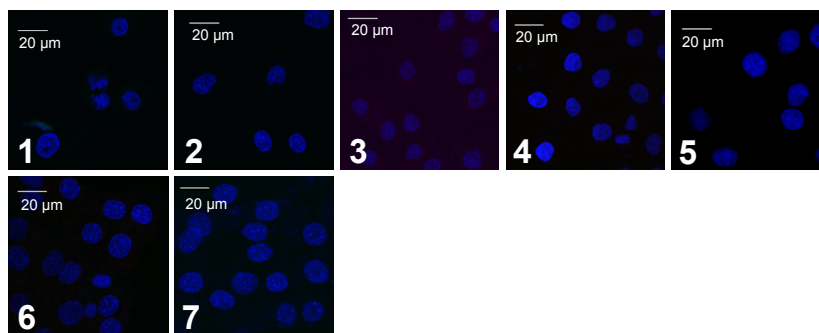
I. A Trisk 32 funkciójának vizsgálata

Sejtenyésztés és transzfekció

A Trisk 32 overexpressziójának hatását L6.G8 patkány vázizom eredetű sejtvonalon vizsgáltuk. A Trisk 32 fehérje szintézisét pcDNA3.1 plazmid-vektor rendszerrel erősítettük föl. A transzfekciót követő geneticines szelekció során 11 egyedi sejtklont izoláltunk, melyeket ezután egymástól elkülönítve tenyésztettünk tovább. A fehérjét a legnagyobb mértékben expresszáló transzfektált sejtklont RT-PCR, immuncitokémia (a dolgozatban bemutatott immunfestések negatív kontrolljai a 13. ábrán láthatók) és Western-blot segítségével választottuk ki (12A ábra, jobb panel, 12B ábra és 12C ábra). A további kísérletekhez ezt a sejtklont használtuk (a későbbi ábrákon Trisk 32-ként vagy T32-ként jelöltük). Transzfekciós kontrollként üres pcDNA3.1 vektorral transzfektáltunk L6.G8 sejteket. Sem ezekben a sejtekben, sem a transzfektálatlan kontrollban nem volt kimutatható az endogén Trisk 32 fehérje szintű jelenléte (12A ábra, bal panel, 12C ábra).

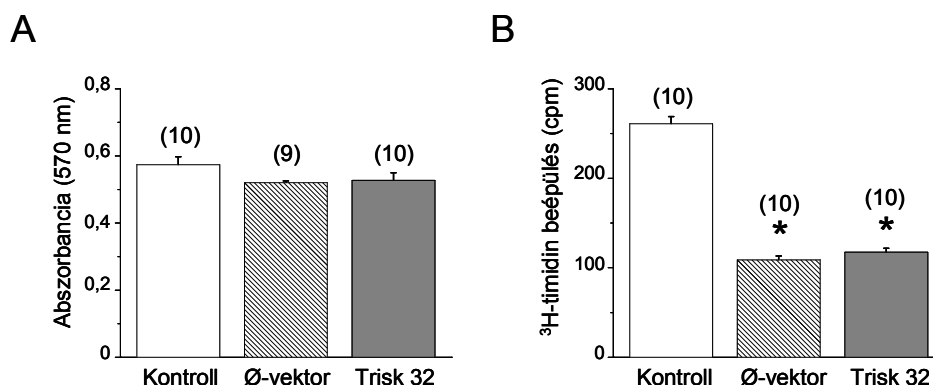


12. ábra. A Trisk 32 overexpressziója L6.G8 myoblastokban. (A) A Trisk 32 fehérje expressziója kontroll és Trisk 32-t túltermelő L6 sejtekben. A képeket 2 µm vastagságú optikai szeletekből vettük fel. Az eredeti nagyítás 40× volt. (B) Kontroll és transzfektált sejtekben a Trisk 32 mRNS-ét RT-PCR-al detektáltuk. GAPDH-t használtunk kontrollnak. (C) A Trisk 32 overexpressziójának fehérje szintű kimutatására Western-blot analízist használtunk. (SR – patkány könnyű SR frakció, K – kontroll L6 myoblastok, Ø – üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált myoblastok, T32 – Trisk 32-t túltermelő L6 myoblastok).



13. ábra. A dolgozatban bemutatott immunfestések negatív kontrolljai. (1) Kontroll és (2) Trisk 32-t túltermelő L6 myoblastok FITC-cel konjugált másodlagos antitesttel és DAPI-val jelölve (negatív kontroll a 12A ábrához). (3-4) Kontroll L6 sejtek Cy3-mal és DAPI-val jelölve (negatív kontroll a 17B-hez: 3, és 17A-hoz: 4). (5) Kontroll L6 sejtek FITC-cel, Cy3-mal és DAPI-val jelölve (negatív kontroll a 16A ábrához). (6) Kontroll C2C12 sejtek Cy3-mal és DAPI-val jelölve (negatív kontroll a 24A ábrához). (7) Kontroll C2C12 myotubulusok FITC-cel és DAPI-val jelölve (negatív kontroll a 30. és 31. ábrához).

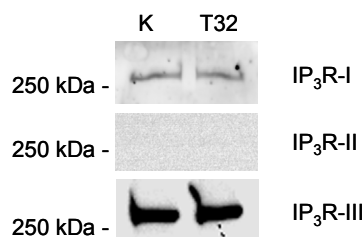
mRNS szinten a Trisk 32 nagyon kis mennyiségben kimutatható volt a kontroll sejtekben is (12B ábra). Ugyan a PCR reakcióhoz használt primerpár a többi triadin izoformát is kimutatja, mégis feltételezhető, hogy az L6 myoblastokból izolált mintákban csak a Trisk 32 volt jelen, mivel a többi izoforma csak az izomdifferenciálódás későbbi szakaszaiban jelenik meg. A Trisk 32-t overexpresszáló sejtekben jól megfigyelhető a Trisk 32 erősebb mRNS expressziója. A Western-blot eredményeken a Trisk 32 fehérje szintű expressziója kettős sávként figyelhető meg, ahogy ezt az irodalomban is leírták (Vassilopoulos et al. 2005). A kontroll és az üres vektorral transzfektált sejtekben az endogén Trisk 32 nem volt kimutatható (12C ábra). Az üres és a Trisk 32-t tartalmazó vektorral történő transzfekció nem befolyásolta a sejtek életképességét (14A ábra), azonban azonos mértékben, szignifikánsan csökkentette a myoblastok proliferációját (14B ábra). A funkcionális mérésekhez kontroll, üres vektorral transzfektált, és Trisk 32-t overexpresszáló L6.G8 myoblastokat használtunk.



14. ábra. A Trisk 32 overexpressziójának hatása az L6 myoblastok (A) életképességére és (B) proliferációs képességére. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált tenyésztőlyukak számát jelzik.

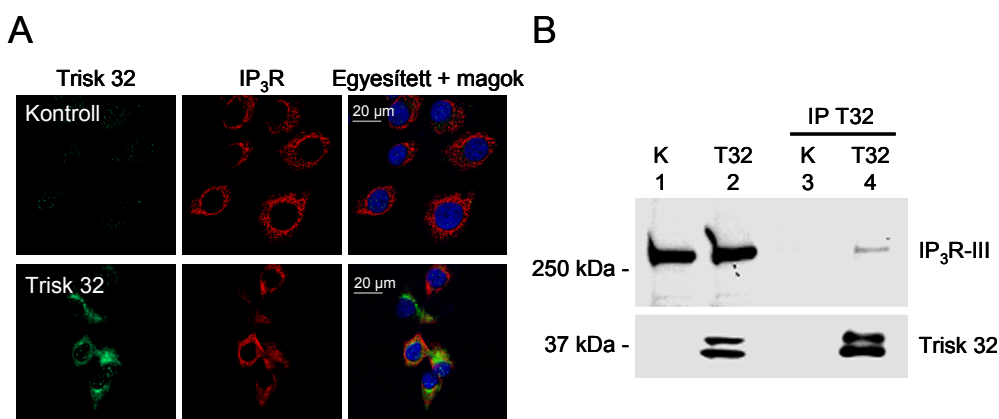
A Trisk 32 és az IP₃ receptor kapcsolódása

Az IP₃R-I, IP₃R-II, és IP₃R-III (15. ábra) jelenlétét a kontroll és a Trisk 32-t túltermelő myoblastokban Western-blottal mutattuk ki. Az IP₃R-I és III azonos mennyiségben volt megtalálható a kontroll és transzfektált sejtekben, míg az IP₃R-II egyikből sem volt kimutatható. A kapott eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az L6.G8 myoblastokban az IP₃R-III a fő izoforma.



15. ábra. Az IP₃R altípusainak kimutatása. Az IP₃R-I (felső panel), IP₃R-II (középső panel) és IP₃R-III (alsó panel) expresszióját kontroll és Trisk 32-t túltermelő sejtekben Western-blottal mutattuk ki.

Bár a Trisk 32 és az IP₃R kapcsolatát korábban már kimutatták a Trisk 32-t tranziensen overexpresszáló sejtekben (Vassilopoulos et al. 2005), fontos volt, hogy ezt az általunk készített, stabilan transzfektált sejtvonalon is bizonyítsuk. Stabil overexpresszió esetén ugyanis az exogénen bejuttatott fehérje elméletben olyan helyeken is jelen lehet, ahol az endogén fehérje nem expresszálódik. A kettős fluoreszcens jelöléssel, immuncitokémiával kapott eredmények alátámasztották a feltételezést a két fehérje egymás melletti elhelyezkedéséről (16A ábra).

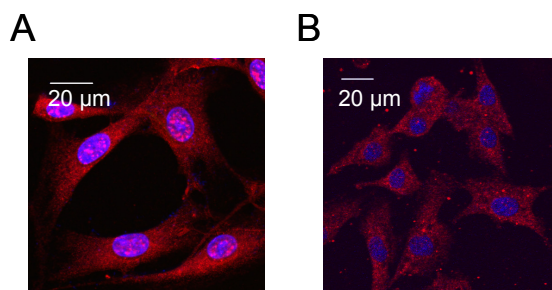


16. ábra. A Trisk 32 és az IP₃R kapcsolata. (A) A Trisk 32 (FITC – zöld) és az IP₃R (Cy3 – piros) kolokalizációját mutató kettős fluoreszcens jelölés kontroll és Trisk 32-t overexpresszáló sejtekben. A kontroll sejtekben a Trisk 32 nem volt detektálható. A képeket 1 µm vastagságú optikai szeletekből vettük fel. Az eredeti nagyítás 40× volt. (B) Az IP₃R-III és a Trisk 32 ko-immunoprecipitációja kontroll (K) és transzfektált (T32) sejtekben. 1. és 2. sáv: A Trisk 32 és IP₃R Western-blottal történő kimutatása a ko-immunoprecipitációhoz használt kontroll (1. sáv) és Trisk 32-t túltermelő (2. sáv) sejtekből készített mintákból. 3. és 4. sáv: a Trisk 32-ellenes antitesttel történő inkubáció és az azt követő disszociáció után az immunkomplexeket Western-blottal vizsgáltuk IP₃R-III és Trisk 32 ellen termeltetett antitestekkel. A kontroll sejtek immunoprecipitált mintáiban (3. sáv) sem a Trisk 32, sem az IP₃R nem volt jelen. A Trisk 32-t túltermelő sejtekben (4. sáv) jól látható a Trisk 32 immunoprecipitációja és ko-immunoprecipitációja az IP₃R III. altípusával.

Ezen eredmények további megerősítésére ko-immunoprecipitációs vizsgálatot végeztünk francia kollaborációs partnereink segítségével. A Trisk 32-elleni antitesttel történő immunoprecipitáció után az immunkomplexeket Western-blottal vizsgáltuk IP₃R-III és Trisk 32 ellenes antitestekkel. A Trisk 32 fehérje jelenléte csak a Trisk 32-t túltermelő sejtekből volt világosan kimutatható (16B ábra, 2. sáv). A kontroll sejtekben sem a Trisk 32, sem a hozzá kapcsolódó IP₃R nem volt kimutatható az immunoprecipitált mintákban (16B ábra, 3. sáv). A Trisk 32-t túltermelő sejtekből készített mintákban a Trisk 32 immunoprecipitációja, és a hozzá kapcsolódó és vele ko-immunoprecipitálódó IP₃R-III is jól megfigyelhető volt (16B ábra, 4. sáv).

Az IP₃ útvonalban részt vevő membránreceptorok kimutatása

Az irodalomból ismert, hogy az L6 sejteken megtalálhatók olyan sejtfelszíni receptorok, melyek az IP₃ útvonalat aktiválhatják (pl. Teti et al. 1993, Miyata et al. 1998), ám ezek a hivatkozások egyik esetben sem az L6.G8 altípusra vonatkoztak. Mielőtt belekezdtünk a funkcionális [Ca²⁺]_i mérésekbe, immuncitokémia segítségével igazoltuk, hogy az aktiválni kívánt V1a vazopresszin receptorok (17A ábra) és a B2 bradykinin receptorok (17B ábra) a rendelkezésünkre álló L6.G8 sejtvonalon is megtalálhatóak.

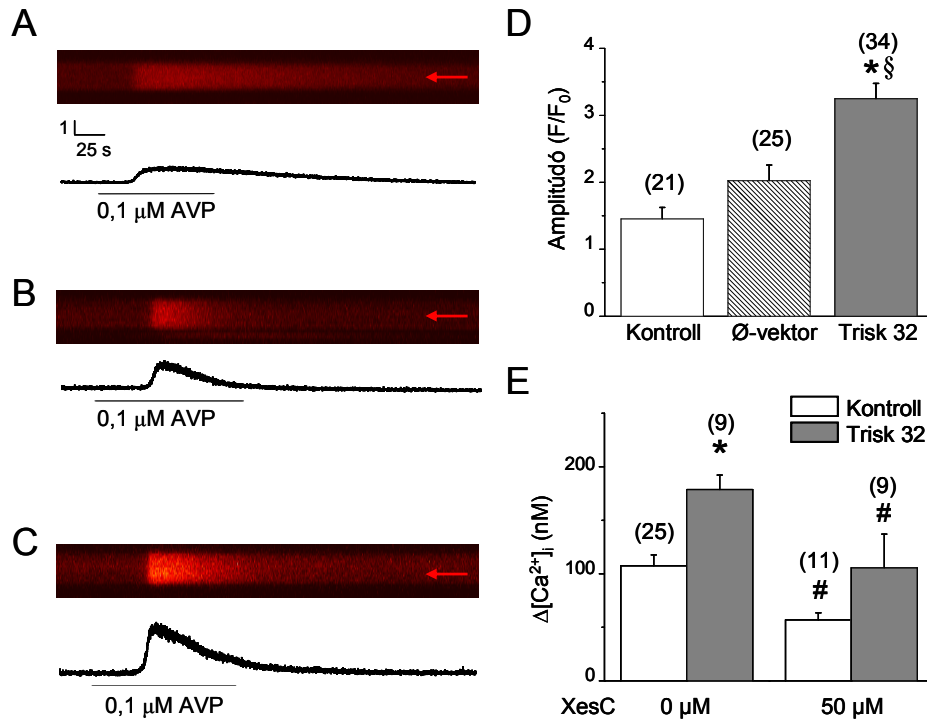


17. ábra. A bradykinin és AVP receptorok jelenlétének kimutatása. (A) Az AVP receptor V1a altípusa, és (B) a B2 bradykinin receptor jelenlétét kontroll L6 myoblastokon immuncitokémiával mutattuk ki. Az AVP és B2 receptorokat Cy3 (piros) másodlagos antitesttel tettük láthatóvá, a magokat DAPI-val jelöltük (kék). A képeket 2 μm vastagságú optikai szeletekből vettük fel. Az eredeti nagyítás 40× volt.

A Trisk 32 overexpressziójának hatása az IP₃R működésére

A Trisk 32 overexpresszióinak az IP₃R működésére, és a sejtek Ca²⁺-homeosztázisára gyakorolt szabályozó hatásának kimutatására konfokális mikroszkóppal készítettünk line-scan felvételeket. Az IP₃ útvonalat extracelluláris Ca²⁺ hiányában, 0,1 μM AVP lokális adagolásával aktiváltuk. Az AVP által kiváltott Ca²⁺-tranziensek amplitúdója (18D ábra) szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,01$) a Trisk 32-t túltermelő sejtekben ($3,25 \pm 0,23$, $n=34$, F/F₀-ként kifejezve; 18C ábra), mint a kontroll ($1,45 \pm 0,17$, $n=21$; 18A ábra) és az üres

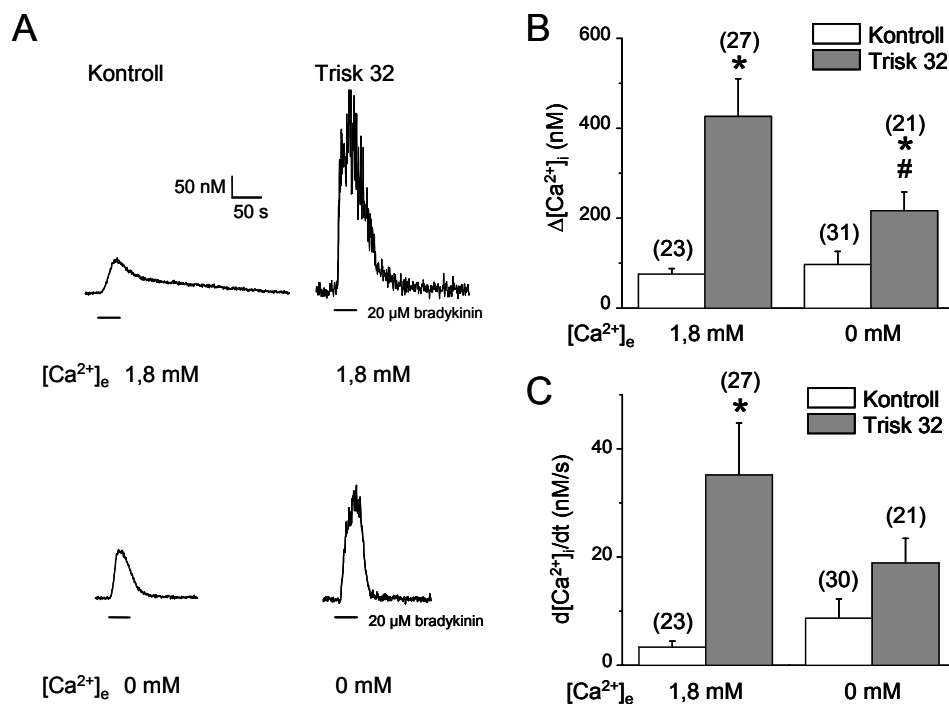
pcDNA3.1 vektorral transzfektált ($2,02 \pm 0,23$, $n=25$; 18B ábra) myoblastokban. A tranziensek amplitúdója nem különbözött szignifikánsan ($p > 0,05$) a kontroll és az üres vektorral transzfektált sejtek között (18D ábra). E kísérletek, valamint munkacsoportunk korábbi eredményei (Fodor et al. 2008) alapján megállapítottuk, hogy az üres vektorral történő transzfekció nem befolyásolja az IP_3 útvonalat, ezért a további kísérletek többségében csak a nem transzfektált sejteket használtuk kontrollnak.



18. ábra. A Trisk 32 és az IP_3R funkcionális kapcsolata I. $[Ca^{2+}]_e$ hiányában, 0,1 μM AVP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek line-scan felvételei (A) kontroll, (B) üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált, és (C) Trisk 32-t túltermelő myoblastokon. A képek alatti görbék a Fluo-4 fluoreszcencia változását jelzik a line-scan felvételeken nyilakkal jelzett vonalakban, a háttér-fluoreszcenciához (F/F_0) képest. A vízszintes és függőleges kalibrációk mindhárom ábrán azonosak. (D) A tranziensek amplitúdóinak összesített adatai. (E) 1 órán keresztül tartó, 50 μM Xestospongin C-vel (XesC) történő előkezelés hatása a 0,1 μM AVP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójára $[Ca^{2+}]_e$ hiányában. Itt és az összes ezt követő ábrán a csillag (*) a kontroll és a vizsgált fehérjét (jelen esetben a Trisk 32-t) túltermelő sejtek közti szignifikáns különbséget jelöli. Az adatok az átlagokat $\pm$ az átlagok standard hibáját (SE) mutatják. A paragrafusjelek (§) az üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált sejtekhez (az ábrákon Ø-vektorként jelölve) viszonyított szignifikáns különbséget jelölik. A kettős kereszt (#) szignifikáns ($p < 0,05$) változást mutat a XesC jelenlétében és hiányában nyert adatok között. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

Ahhoz, hogy igazoljuk, hogy az AVP által kiváltott Ca^{2+} -jelek valóban az IP_3 útvonalon keresztül jönnek létre, kontroll és Trisk 32-t túltermelő sejteket 1 órán keresztül előkezeltünk 50 μM Xestospongin C-vel (XesC; De Smet et al. 1999, Oka et al. 2002), az IP_3R gátlószerevel, majd fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ méréseket végeztünk 0,1 μM AVP lokális adagolásával, $[Ca^{2+}]_e$ hiányában. A XesC jelenléte szignifikánsan lecsökkentette az AVP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját a kezeletlen kontroll (107 ± 10 nM, $n=25$ XesC nélkül,

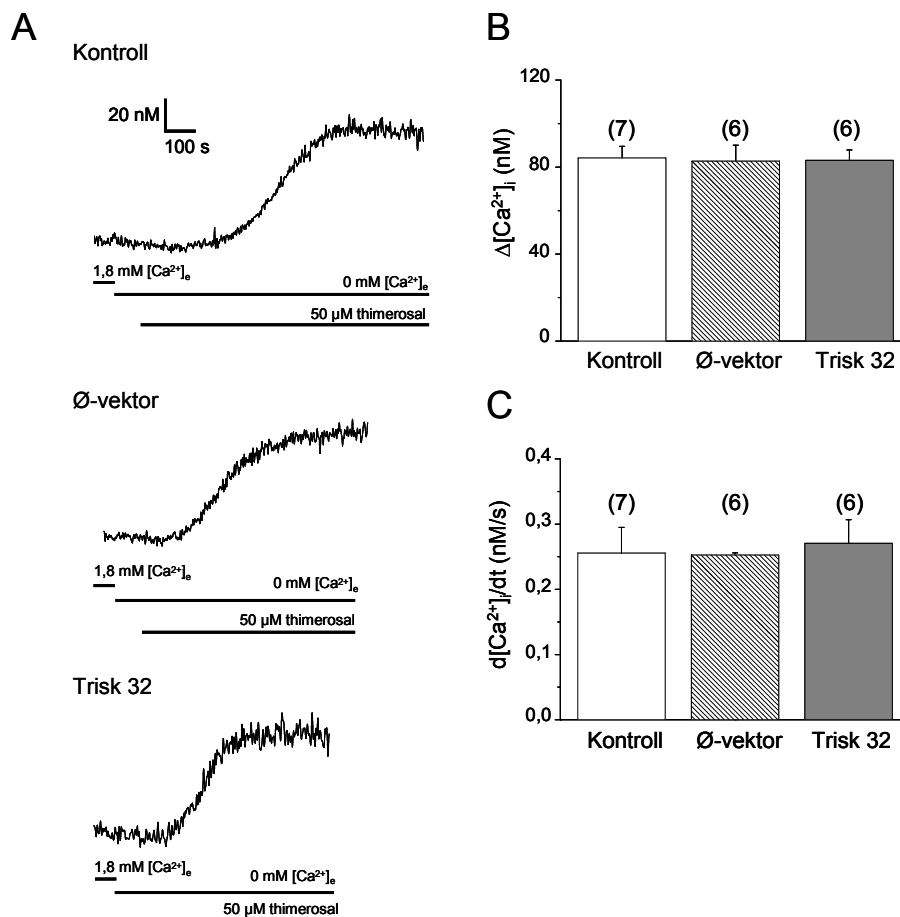
és 57 ± 7 nM, $n=11$ XesC jelenlétében, $p<0,01$; 18E ábra) és a kezeletlen Trisk 32-t túltermelő (179 ± 14 nM, $n=9$ XesC nélkül, és 106 ± 31 nM, $n=9$ XesC jelenlétében, $p<0,05$, 18E ábra) sejtekben megfigyelthez képest. Ez tisztán alátámasztja az IP_3R -ok részvételét az AVP által kiváltott Ca^{2+} -felszabadulásban.



19. ábra. A Trisk 32 és az IP_3R funkcionális kapcsolata II. (A) $20 \mu M$ bradykinin által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek reprezentatív görbéi $[Ca^{2+}]_e$ jelenlétében (felső panelek) és hiányában (alsó panelek) kontroll és Trisk 32-t túltermelő sejtekben. A tranziensek (B) amplitúdója, és (C) a felszálló szárak meredeksége. A kettős kereszt (#) szignifikáns ($p<0,05$) változást mutat az $[Ca^{2+}]_e$ jelenlétében és hiányában nyert adatok között. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

Azt bizonyítandó, hogy a Trisk 32-t túltermelő sejtekben megfigyelt nagyobb Ca^{2+} -tranziensek nem csak az AVP általi aktivációra következnek be, az IP_3 útvonal egy másik agonistájának hatásait is megvizsgáltuk. Ebben az esetben $20 \mu M$ bradykinint (BK) használtunk az IP_3 útvonal aktiválására kontroll és transzfektált myoblastokban. A mérések reprezentatív görbéit a 19A ábrán mutatjuk be. A kísérletek egy részében $1,8$ mM $[Ca^{2+}]_e$ -t használtunk a fiziológiához közelebb eső körülmények megteremtése érdekében, míg más kísérletekben 0 mM $[Ca^{2+}]_e$ -t használtunk, hogy az extracelluláris Ca^{2+} -belépés zavaró hatása nélkül tudjuk vizsgálni az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulást. Normál, $1,8$ mM Ca^{2+} -tartalmú Tyrode-oldatban szignifikáns különbség volt megfigyelhető a kontroll és Trisk 32-t túltermelő sejtek között mind a BK által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójában (76 ± 12 nM, $n=23$ kontrollban, és 426 ± 84 nM, $n=27$ Trisk 32-t túltermelő sejtekben, $p<0,01$, 19B ábra), mind a felszálló szárak meredekségében ($3,3 \pm 1,1$ nM/s kontrollban, és $35,1 \pm 9,6$ nM/s Trisk 32-t

túltermelő sejtekben, $p < 0,01$, 19C ábra). A két sejtípus között extracelluláris Ca^{2+} hiányában is megmaradt a szignifikáns különbség az amplitúdóban (97 ± 29 nM, $n=31$ illetve 217 ± 41 nM, $n=21$, $p < 0,02$; 19B ábra), azonban a felszálló szár meredekségében már csak az előző tendencia volt megfigyelhető ($8,7 \pm 3,5$ nM/s illetve $18,9 \pm 4,5$ nM/s, $p = 0,08$; 19C ábra). Megemlítendő, hogy ezek a különbségek nem a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedésének köszönhetőek, ugyanis az lényegében azonos volt a kontroll és transzfektált sejtekben (73 ± 2 nM, $n=31$ illetve 74 ± 2 nM, $n=21$, $p > 0,9$) $[\text{Ca}^{2+}]_e$ hiányában. Szintén említésre érdemes, hogy a BK és az AVP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója $[\text{Ca}^{2+}]_e$ -mentes körülmények között hasonló volt a kontroll (97 ± 29 nM, $n=31$ a BK, és 107 ± 10 nM az AVP által kiváltott tranziensek esetén, $n=25$, $p > 0,5$) és a transzfektált (217 ± 41 nM, $n=21$ a BK, és 179 ± 14 nM, $n=9$ az AVP által kiváltott tranziensek esetén, $p > 0,5$) sejtekben egyaránt.



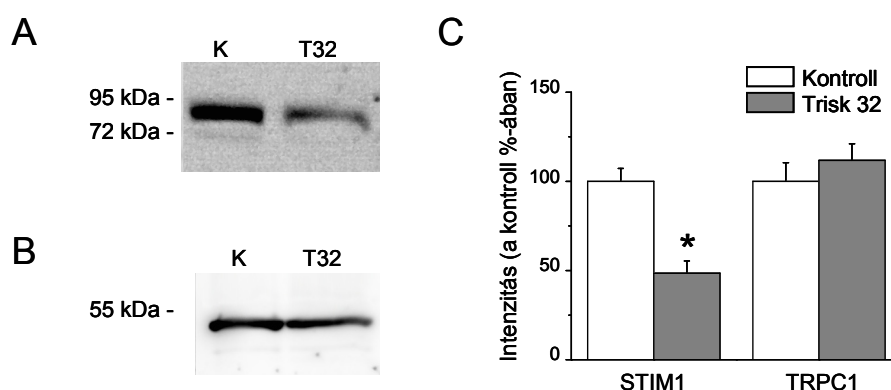
20. ábra. Az IP_3R -ok közvetlen aktiválása thimerosallal. **(A)** 50 μM thimerosal által, $[\text{Ca}^{2+}]_e$ hiányában kiváltott Ca^{2+} -tranziensek reprezentatív görbéi kontroll, üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált, és Trisk 32-t túltermelő sejtekben. A tranziensek **(B)** amplitúdója, és **(C)** a felszálló száruk meredeksége. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

Az AVP ill. BK által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek erősödését a Trisk 32-t overexpresszáló sejtekben az IP_3R megváltozott működése – fokozott csatorna konduktancia

vagy fokozott IP_3 -iránti érzékenység – és a raktárürülést kísérő módosult SOCE is magyarázhatja. Az IP_3R -ok konduktanciájának összehasonlításához a receptorokat $50\ \mu M$ thimerosal lokális adagolásával, közvetlenül aktiváltuk. A szer hatására az $[Ca^{2+}]_i$ számottevő látenciával, lassan emelkedett a kontroll, üres vektorral transzfektált és Trisk 32-t túltermelő sejtekben egyaránt (20A ábra). Az összesített adatok arra utaltak, hogy ezek a Ca^{2+} -tranziensek lényegében egyformák ($p>0,8$) voltak mind az amplitúdójukat ($84,2\pm5,4$, $82,7\pm7,4$, illetve $83,1\pm4,8$ nM; 20B ábra), mind a felszálló szárak meredekségét illetően ($0,26\pm0,04$ a kontroll, $0,25\pm0,01$ az üres vektorral transzfektált, és $0,27\pm0,04$ nM/s a Trisk 32-t túltermelő sejtekben; 20C ábra).

A Trisk 32 overexpressziójának hatása a SOCE-ra

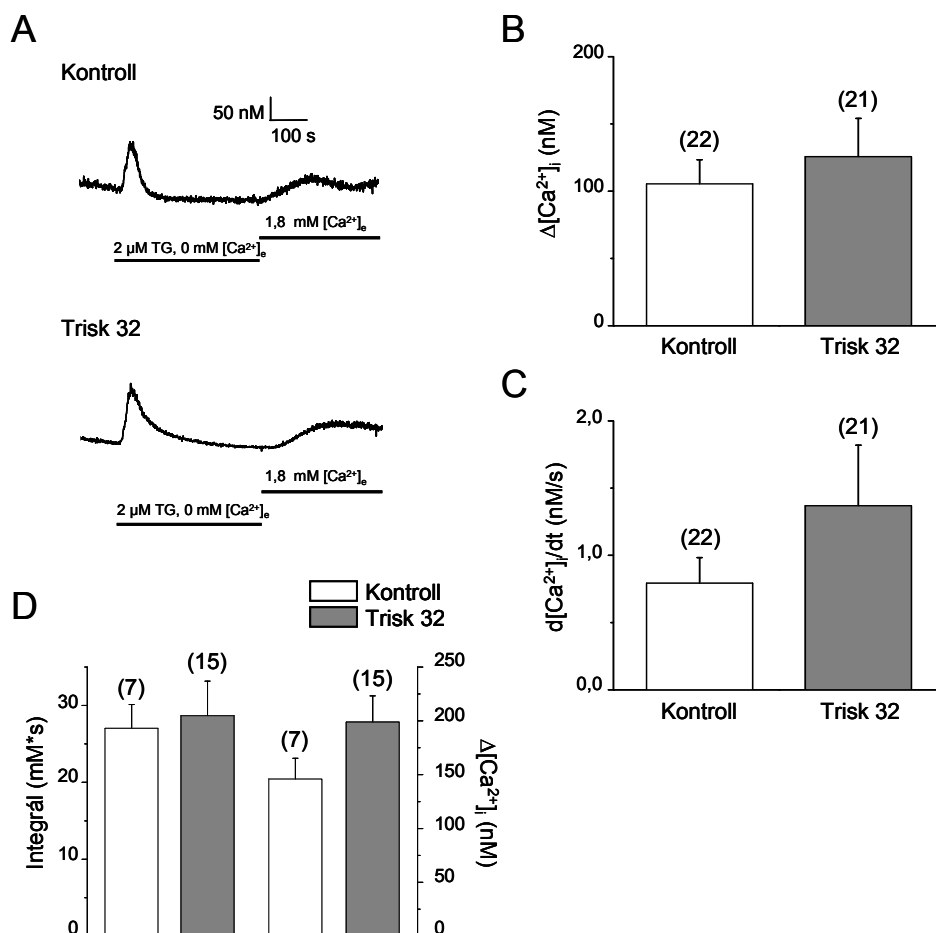
A Trisk 32 overexpresszió SOCE-ra gyakorolt hatását biokémiai és funkcionális vizsgálatokkal mutattuk ki. A SOCE főbb részvevőinek expresszióváltozását Western-blot segítségével vizsgáltuk. A STIM1 expressziója (21A ábra) a transzfektált sejtekben szignifikánsan ($p<0,01$), a kontroll $48\pm7\%$ -ára csökkent (21C ábra). A TRPC1 expressziója nem változott a Trisk 32 overexpresszió hatására (21B, C ábra).



21. ábra. A Trisk 32 túltermeltetés hatása a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépés (SOCE) fő résztvevőire. A (A) STIM1, és (B) TRPC1 fehérjék expressziójának kimutatása kontroll (K) és Trisk 32-t túltermelő (T32) sejtekben. 100-100 μg fehérjemintát használtunk a Western-blot kísérletek mindegyik sávjához. (C) A Western-blot eredmények kvantitatív elemzése (átlag $\pm$ SE).

A STIM1 expressziócsökkenésének és a Trisk 32 overexpressziójának a SOCE-ra gyakorolt hatását fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ méréssel vizsgáltuk, az irodalomban széles körben alkalmazott protokoll szerint (Bird et al. 2008). Ezek alapján a SERCA pumpákat kalciummentes közegben, $2\ \mu M$ thapsigarginnal (TG) gátoltuk. A belső raktárból a kalcium a RyR-on és az IP_3R -on keresztül “kicsorgott”, ezáltal az SR kalciumraktára kiürült, és a SOCE mechanizmus aktiválódott. Amikor a normál $1,8\ mM$ $[Ca^{2+}]_e$ -t visszaállítottuk, a SOCE mérhetővé vált. Méréseink alapján a kontroll (22A ábra, felső panel) és a transzfektált (22A

ábra, alsó panel) sejtekben a SOCE-t kísérő Ca^{2+} -tranziens amplitúdója ($p>0,4$; 105 ± 18 nM, $n=22$ és 126 ± 22 nM, $n=21$; 22B ábra), és felszálló szárának meredeksége ($p>0,2$; $0,8\pm 0,2$ nM/s és $1,4\pm 0,4$ nM/s; 22C ábra) nem különbözött szignifikánsan.

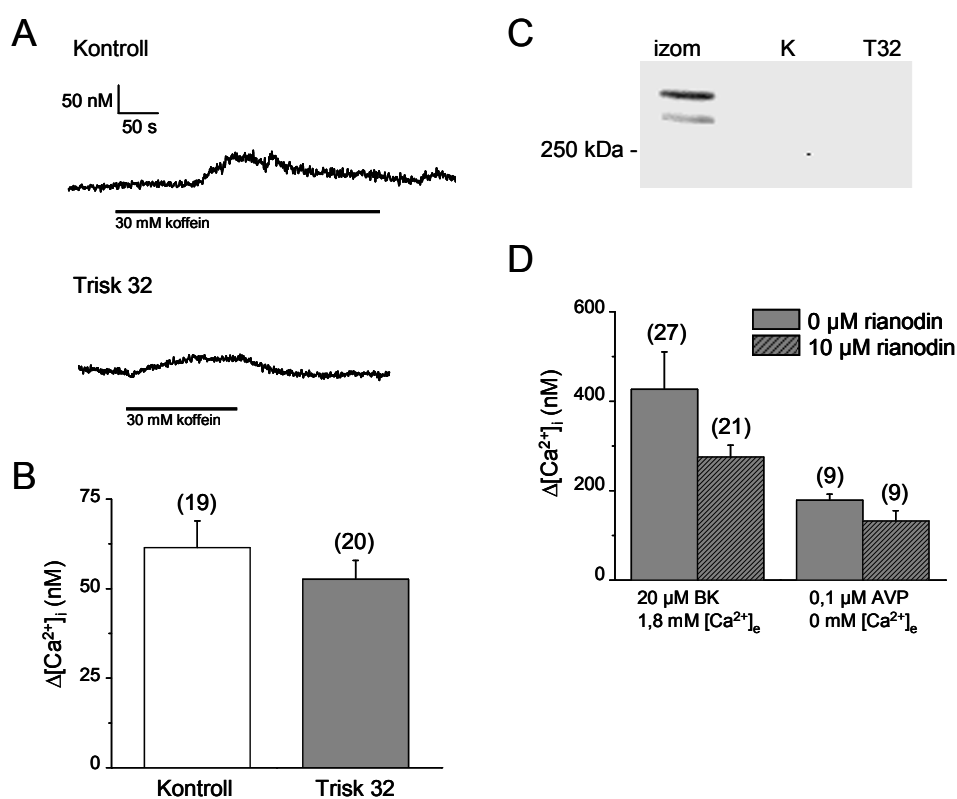


22. ábra. A Trisk 32 túltermeltetés funkcionális hatása a SOCE mechanizmusra. (A) 4-4 különálló tenyészet reprezentatív görbéi, amelyek a SOCE mechanizmus során bekövetkező $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásokat mutatják a normál (1,8 mM) $[\text{Ca}^{2+}]_e$ visszaállítását követően, kontroll és Trisk 32-t overexpresszáló sejtekben. A belső Ca^{2+} -raktárakat 2 μM thapsigargin (TG) segítségével ürítettük ki $[\text{Ca}^{2+}]_e$ hiányában. A SOCE-t kísérő Ca^{2+} -tranziens (B) amplitúdójának, és (C) felszállási meredekségének átlagai a külső Ca^{2+} visszaadása után. (D) A thapsigargin által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek görbe alatti területe és amplitúdója. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

Az előbbi mérések lehetőséget adtak az SR Ca^{2+} -tartalmának vizsgálatára is. Kontroll és Trisk 32-t túltermelő sejtekben összehasonlítottuk a TG által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek paramétereit. Sem a TG által kiváltott tranziensek integrálja ($p>0,8$; $27,0\pm 3,1$ mM·s, $n=7$ és $28,7\pm 4,5$ mM·s, $n=15$), sem az amplitúdója ($p>0,1$; 146 ± 19 , $n=7$ és 199 ± 25 , $n=15$) nem változott meg szignifikánsan az overexpresszió hatására (22D ábra).

A Trisk 32 overexpressziójának hatása a RyR működésére

Ahhoz, hogy kizárjuk a RyR-ok részvételét a fentebb leírt jelenségekben, 30 mM koffein adagolásával váltottunk ki a RyR-okon keresztül Ca^{2+} -felszabadulást (23A ábra). A sejteknek csak a 2/3-a reagált koffeinre (19 kontroll a vizsgált 31-ből, és 20 transzfektált a vizsgált 30-ból), emellett a RyR expressziója sem volt kimutatható Western-blot segítségével (23C ábra), ami arra utal, hogy csak minimális mennyiségű receptor volt jelen és működött ezeken a sejteken. A tranziensek amplitúdója – ahol ilyen tranziensek egyáltalán megfigyelhetők voltak – nem különbözött szignifikánsan a kontrollhoz képest a Trisk 32-t túltermelő sejtekben ($p>0,3$; 61 ± 7 nM, $n=19$ a kontrollban, és 53 ± 6 nM, $n=20$ a Trisk 32-t túltermelőben; 23B ábra).



23. ábra. A Trisk 32 overexpressziójának funkcionális hatása a rianodinreceptorokon (RyR) keresztül bekövetkező Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulásra (CICR). (A) A RyR agonista 30 mM koffein által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek reprezentatív görbéi kontroll és Trisk 32-t túltermelő L6 sejtekben. **(B)** A koffein által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdói a két sejtípusban. **(C)** A RyR expressziója pozitív kontrollként használt patkány négyfejű combizom SR frakciójában (1. sáv), kontroll L6 sejtekben (2. sáv), és Trisk 32-t túltermelő L6 sejtekben (3. sáv). **(D)** A Trisk 32-t túltermelő sejteken, 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ jelenlétében, 20 μM bradykinin által, illetve $[\text{Ca}^{2+}]_e$ hiányában, 0,1 μM AVP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdói a RyR antagonistá 10 μM rianodin hiányában és jelenlétében. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

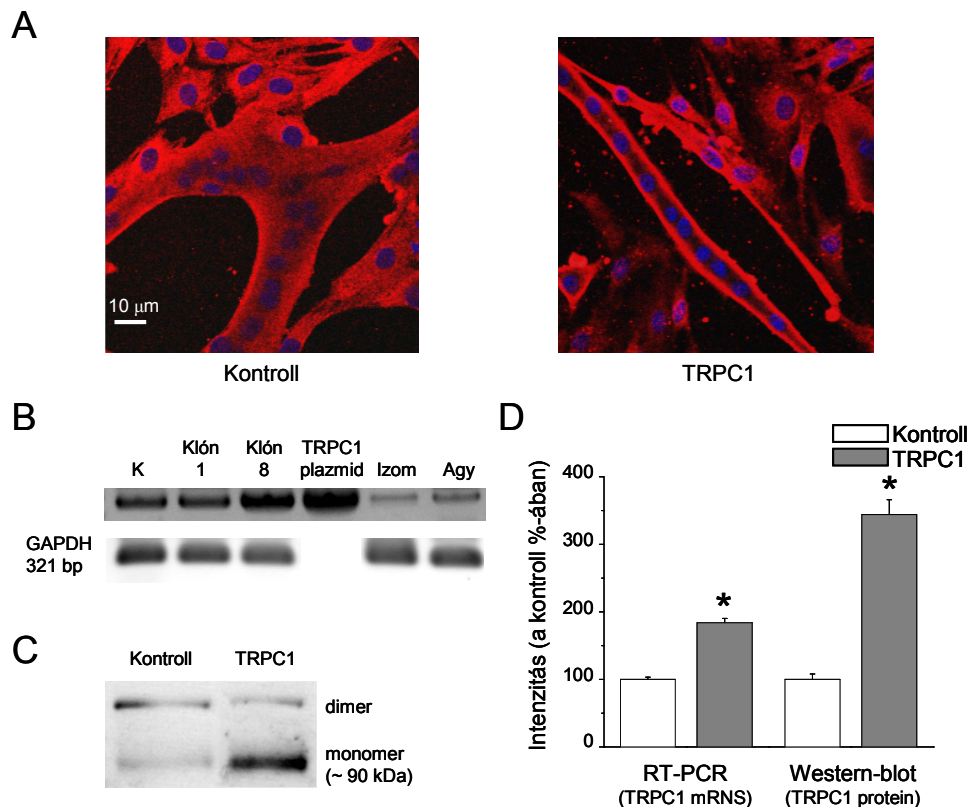
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy a bradykinin által, 1,8 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ jelenlétében kiváltott Ca^{2+} -tranziensekből mekkora részesedése van a RyR-okon keresztül megvalósuló Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulásnak (CICR), a RyR-okat 10 μM rianodinnal blokkoltuk, és

emellett 20 μM bradykinint adagoltunk lokálisan a Trisk 32-t overexpresszáló sejtekre, hogy az IP_3 útvonalat aktiváljuk. A bradykinin által kiváltott tranziensek amplitúdója rianodin jelenlétében alacsonyabb volt, mint az antagonistánélkül, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($p > 0,1$; $275 \pm 26 \text{ nM}$, $n=21$ rianodinnal, és $426 \pm 84 \text{ nM}$, $n=27$ rianodin nélkül, Trisk 32-t overexpresszáló sejteken; 23D ábra). Hasonló eredményeket kaptunk $[\text{Ca}^{2+}]_e$ hiányában is, amikor 10 μM rianodin adagolása után 0,1 μM AVP-vel váltottunk ki Ca^{2+} -tranzienseket. Habár a tranziensek amplitúdója ebben az esetben is kis mértékben alacsonyabb volt rianodin jelenlétében, mint a nélkül, a különbség itt sem bizonyult szignifikánsnak ($179 \pm 14 \text{ nM}$, $n=9$ rianodin nélkül és $132 \pm 23 \text{ nM}$, $n=9$ a jelenlétében, $p > 0,1$; 23D ábra).

II. A TRPC1 overexpressziójának hatásai

Sejtenyésztés és transzfekció

A TRPC1 overexpressziójának hatásait egér vázizom eredetű sejtvonalon vizsgáltuk. A csatorna endogén expresszióját kontroll C2C12 izomcsöveken RT-PCR-rel, immuncitokémiával, és Western-blottal is ki tudtuk mutatni (24A ábra, bal panel, 24B, C ábra).



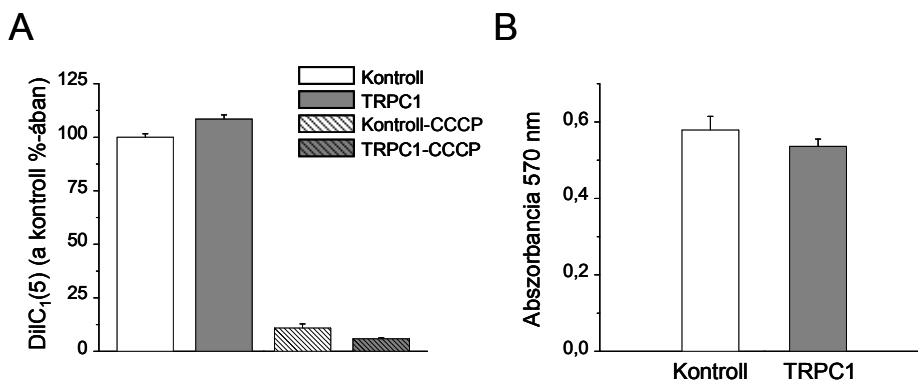
24. ábra. A TRPC1 overexpressziójának kimutatása C2C12 myotubulusokban. (A) A TRPC1 fehérje immuncitokémiai jelölése kontroll és TRPC1-et túltermelő C2C12 vázizom-tenyészetekben. A képeket 1 μ m vastagságú optikai szeletekből vettük fel. Az eredeti nagyítás 40 $\times$ volt. (B) A TRPC1 mRNS szintű expresszióját RT-PCR-rel mutattuk ki. Különböző transzfektált klónokból és szövetekből nyert mintákat hasonlítottunk össze (K – kontroll C2C12 sejtek, Klón 1 és Klón 8 – különböző mértékben transzfektált C2C12 sejtklónok, izom – egér vázizom, agy – egér agy). GAPDH-t használtunk kontrollként. (C) A TRPC1 overexpressziójának fehérje szintű kimutatására Western-blot analízist végeztünk. A stabil transzfekcióhoz használt plazmidról a 87 kDa-os humán izoforma expresszáldott. (D) A kontroll és transzfektált myotubulusokon kapott RT-PCR és Western-blot eredmények kvantitatív elemzése. Itt és az összes ezt követő ábrán a csillag (*) a kontroll és a vizsgált fehérjét (jelen esetben a TRPC1-et) túltermelő sejtek közti szignifikáns különbséget jelöli. Az adatok az átlagokat $\pm$ az átlagok standard hibáját (SE) mutatják.

A TRPC1 fehérje szintézisét pcDNA3.1 plazmid-vektor rendszer segítségével fokoztuk. A transzfekció után a sejteket geneticinnel szelektáltuk, és a 2 hetes szelekció végén 14 egyedi sejtklont izoláltunk. Az ezekből differenciáltatott izomcsövekben a fehérje stabil overexpresszióját immuncitokémiával ellenőriztük (24A ábra, jobb panel). A fehérje a

membrán közelében leginkább a transzfektált sejtekben, míg a citoplazmában mind a kontroll, mind a transzfektált sejtekben megfigyelhető volt. Az overexpresszió hatékonyságát mRNA (24B ábra) és fehérje (24C ábra) szinten is ellenőriztük azért, hogy ki tudjuk választani a fehérjét legnagyobb mértékben túltermelő sejtklont. Az RT-PCR reakciókat humán és egér TRPC1 mRNA szekvenciákat használva végeztük. Azonosítottuk a megfelelő méretű amplimereket, ami alapján a plazmidról történő overexpresszió jól felismerhető volt a 8. számú sejtklónban. A későbbi vizsgálatokhoz ezt a klont használtuk. Western-blot segítségével is megerősítettük a TRPC1 fehérje szintű overexpresszióját az említett sejtklónban. Az eredmények kvantitatív elemzése szignifikáns, 244%-os ($p < 0,01$) növekedést mutatott ki a TRPC1 fehérje expressziójában a nem transzfektált sejtekhez képest (24D ábra). A TRPC1 expresszió kisebb mértékű változtatásának hatását két másik sejtklónon (11. és 10. klón; 28A ábra) vizsgáltuk. A funkcionális mérésekhez kontroll és TRPC1-et overexpresszáló, differenciáltott, 5 napos izomcsöveket használtunk.

Apoptózis és életképesség vizsgálata

A TRPC1 overexpresszió apoptózis-indukáló hatásának kiderítéséhez egy 96 lyukú tenyésztőedény 9-9 lyukában kontroll és TRPC1-et túltermelő C2C12 izomcsövek mitokondriális membránpotenciálját határoztuk meg, MitoProbe DiIC₁(5) Assay Kit segítségével (25A ábra).



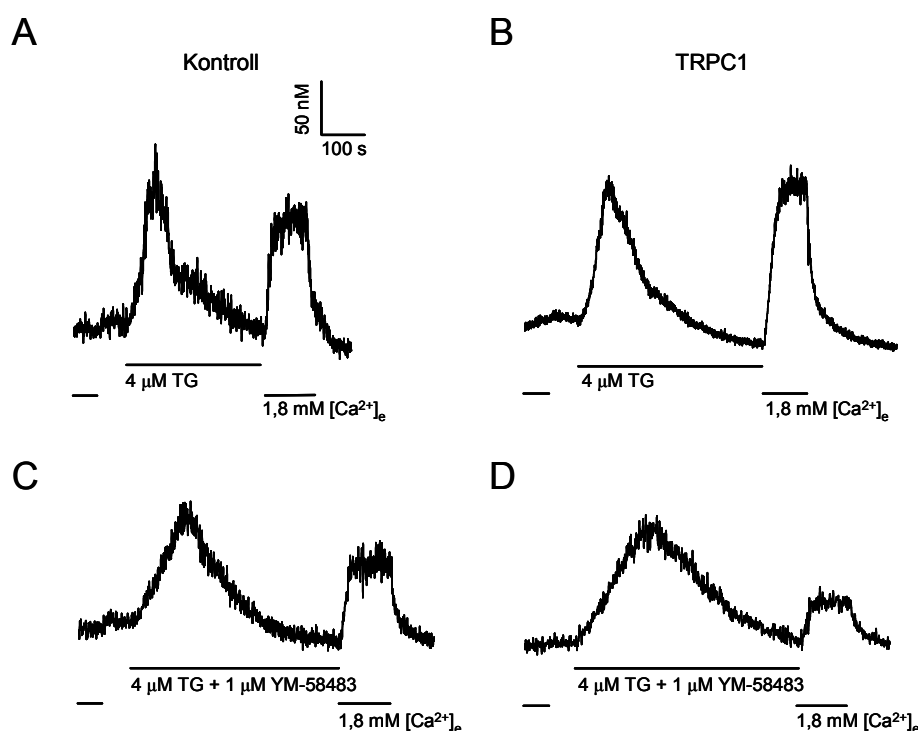
25. ábra. A TRPC1 túltermeltetés hatása a sejtek életképességére. (A) Az apoptózis mértékének vizsgálata a mitokondriális membránpotenciál megszűnésének mérésével. CCCP-t használtunk pozitív kontrollként. (B) A sejtek életképességének meghatározása. A kontroll és TRPC1-et túltermelő sejteket MTT assay segítségével hasonlítottuk össze.

Az apoptózis pozitív kontrolljaként mindkét sejtípusból további 3-3 tenyésztőlyukat CCCP nevű protonofórral kezeltünk. A TRPC1-et túltermelő myotubulusokban a mitokondriális membránpotenciál nem csökkent szignifikánsan a kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy a TRPC1 overexpressziója nem fokozza az apoptózis mértékét ezekben a

tenyészetekben. A sejtek életképességének meghatározásához MTT assay-t használtunk (25B ábra). 570 nm-es hullámhosszon mérve, az abszorbanciában mutatkozó különbség nem bizonyult szignifikánsnak a két sejttípus között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TRPC1 túltermeltetése nem befolyásolja a sejtek életképességét.

A TRPC1 túltermeltetésének hatása a SOCE-ra és a Ca^{2+} -homeosztázisra

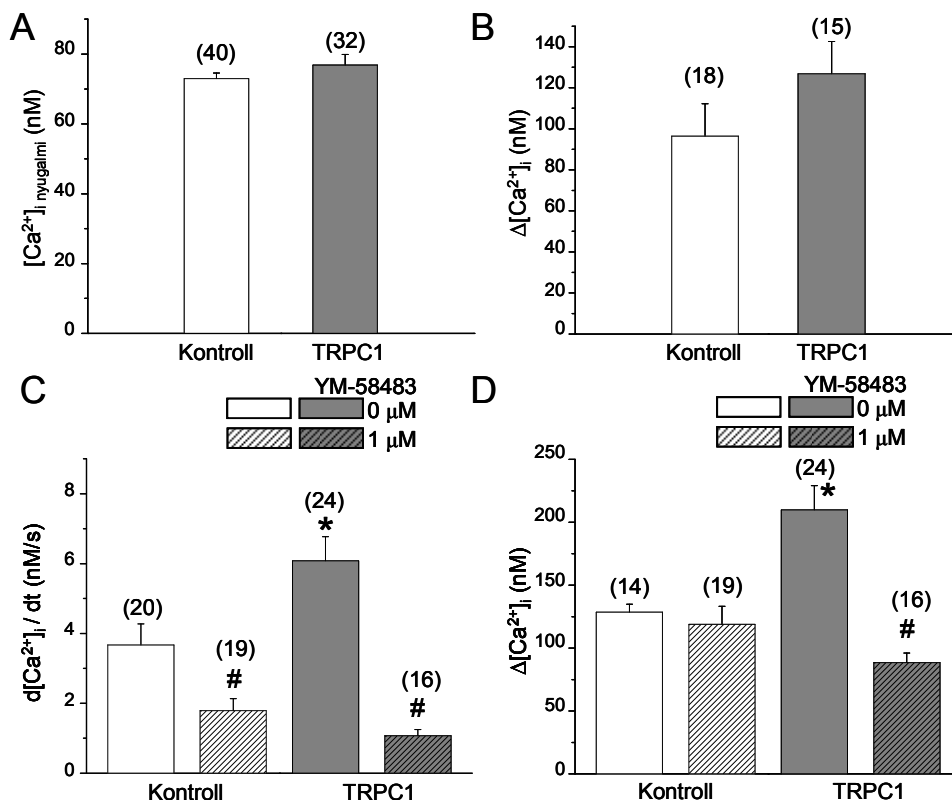
Funkcionális mérésekkel először azt vizsgáltuk, hogy a fehérje overexpressziója megváltoztatja-e az izomcsövek SOCE mechanizmusát. Ehhez a sejtek belső Ca^{2+} -raktárát Ca^{2+} -mentes Tyrode-oldatban 4 μM thapsigarginnal kiürítettük, majd a normál, 1,8 mM-os $[\text{Ca}^{2+}]_e$ visszaállítása után kontroll (26A ábra) és transzfektált (26B ábra) myotubulusokban mértük az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változását.



26. ábra. A SOCE funkcionális vizsgálata terminálisan differenciálódott C2C12 myotubulusokban. A sejtek belső Ca^{2+} -raktárát 4 μM thapsigargin (TG) segítségével ürítettük ki $[\text{Ca}^{2+}]_e$ hiányában. A normál (1,8 mM-os) $[\text{Ca}^{2+}]_e$ visszaállítása után a SOCE-t jelző $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásokat mértük **(A)** kontroll, és **(B)** TRPC1-et túltermelő myotubulusokban. 5-5 független tenyészetben végzett mérés reprezentatív görbéi. **(C)** Kontroll és **(D)** transzfektált C2C12 myotubulusokat thapsigargin adagolása közben egy TRPC gátlószerrel, YM-58483-mal kezeltünk elő, majd mértük a SOCE-t. 5-5 független tenyészet reprezentatív görbéi.

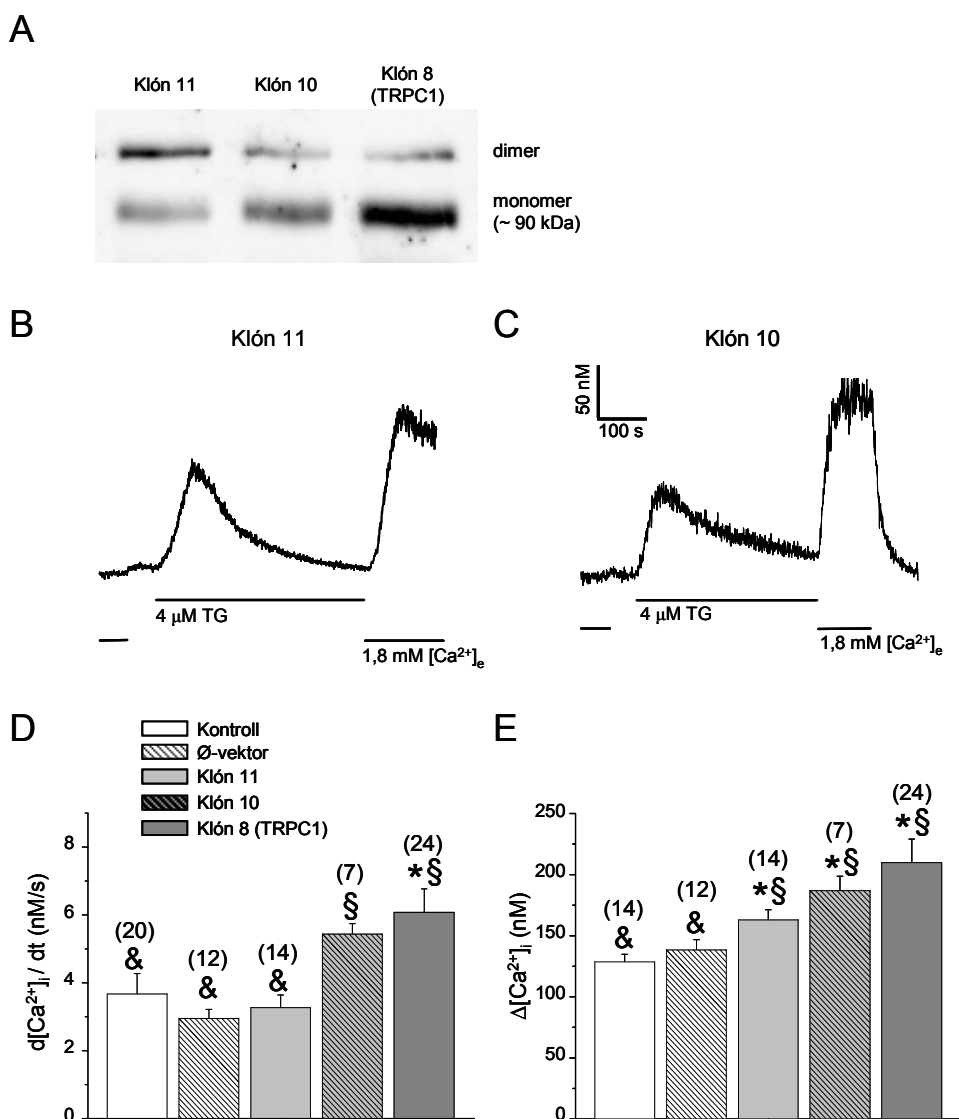
A TRPC1 overexpresszió következményeként a SOCE-t kísérő Ca^{2+} -tranziens amplitúdója (129 ± 6 nM, $n=14$ a kontroll, és 210 ± 19 nM, $n=24$ a TRPC1-et overexpresszáló sejtekben; 27D ábra) és felszálló szárának meredeksége ($3,7 \pm 0,6$ nM/s, $n=20$ a kontrollban, és $6,1 \pm 0,7$ nM/s, $n=24$ a TRPC1-et túltermelő sejtekben; 27C ábra) szignifikánsan nőtt a

transzfektált izomcsövekben. Ez azt bizonyíthatja, hogy több TRPC1 Ca^{2+} -csatorna áll a sejtek rendelkezésére az extracelluláris Ca^{2+} felvételéhez.



27. ábra. Az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ változások jellemző paraméterei kontroll és TRPC1-et túltermelő C2C12 myotubulusokban. (A) A nyugalmi Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i, nyugalmi}}$) értékei. (B) A thapsigargin által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójának összesített adatai $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}}$ hiányában. A SOCE-t kísérő Ca^{2+} -tranzienst (C) felszálló szárának meredeksége illetve (D) amplitúdója a normál (1,8 mM-os) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{e}}$ visszaállítása után. Az ábrákon az 1 μM YM-58483 jelenlétében nyert adatokat is feltüntettük. A kettős kereszt (#) szignifikáns ($p < 0,01$) változást mutat az YM-58483 jelenlétében és hiányában kapott adatok között. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

Ezzel ellentétben az üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált myotubulusokban a SOCE a kontrollhoz hasonló nagyságú volt ($3,0 \pm 0,3$ nM/s, $n=12$ a felszálló szár meredeksége, és 155 ± 10 nM, $n=13$ az amplitúdó; 28D, E ábra; $p > 0,3$). A TRPC1-et kisebb mértékben túltermelő sejtklónokban (11. és 10. klón; 28B, C ábra) a SOCE nagysága a TRPC1 expresszió mértékével korrelált. A 11-es klónban a SOCE-t kísérő Ca^{2+} -tranzienst felszálló szárának meredeksége hasonló volt ($3,3 \pm 0,4$ nM/s, $n=14$) az üres vektorral transzfektált sejtekben mértékhez, és szignifikánsan alacsonyabb volt a TRPC1-et túltermelő (8. klón) sejtekéhez képest. A 10. klónban ($5,4 \pm 0,3$ nM/s, $n=7$) másrészt nem különbözött szignifikánsan ($p > 0,05$) a TRPC1-et túltermelő sejtekéhez képest, ellenben szignifikánsan nagyobb volt, mint az üres vektorral transzfektált sejtekben (28D ábra).



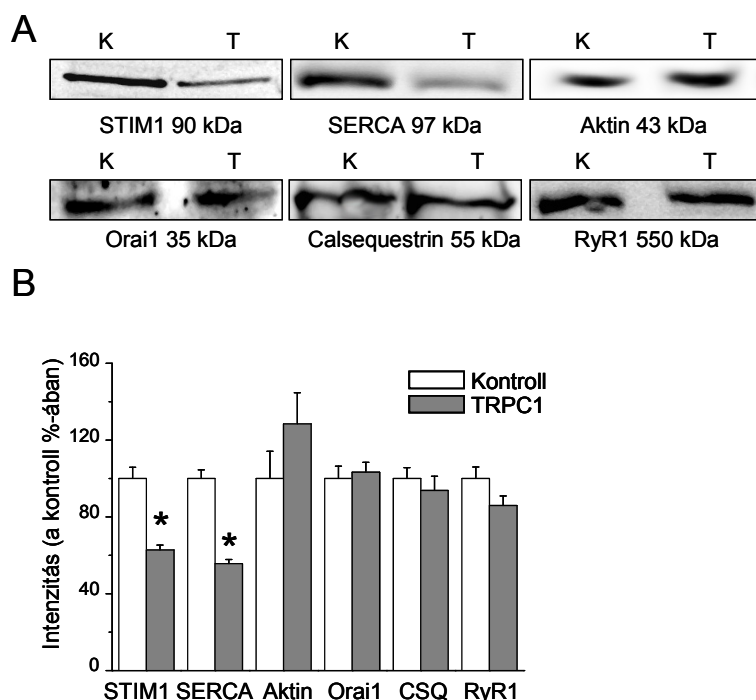
28. ábra. A TRPC1 különböző mértékű overexpressziójának hatása a SOCE mechanizmusra. (A) A TRPC1 expresszió Western-blottal történő kimutatása a transzfektált klónokban. A legnagyobb mértékű overexpressziót a 8. klónban figyelhetjük meg, így a dolgozatban ismertetett többi kísérletben ezt a klónt használtuk (a többi ábrán TRPC1-ként hivatkozunk rá). A 10. és 11. klónon végzett kísérletek eredményei ezen az ábrán kerülnek bemutatásra. A SOCE mechanizmussal együtt járó $[Ca^{2+}]_i$ változások reprezentatív görbéi a **(B)** 11. klónban és a **(C)** 10. klónban. A SOCE **(D)** felszállási meredeksége és **(E)** amplitúdója a TRPC1-et különböző mértékben túltermelő myotubulusokban. A csillagok (*) a szignifikáns különbséget ($p < 0,05$) jelölik a kontroll, a paragrafusjelek (§) az üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált (a jelmagyarázatban Ø-vektorként jelölve), az „and” jelek (&) a TRPC1-et túltermelő (8. klón) sejtekhez képest. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ a kontroll és TRPC1-et túltermelő sejtekben közel azonos ($p > 0,2$) volt ($73,0 \pm 1,6$ nM, $n=40$ a kontrollban, és $76,8 \pm 3,1$ nM, $n=32$ a TRPC1-et overexpresszáló sejtekben; 27A ábra). Ráadásul a thapsigargin által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójában sem volt szignifikáns különbség ($p > 0,1$; $96,4 \pm 15,9$ nM, $n=18$ a kontrollban, és $126,8 \pm 15,8$ nM, $n=15$ a TRPC1-et túltermelő izomcsövekben; 27B ábra), ami arra utal, hogy az SR Ca^{2+} -tartalma nem változott a TRPC1 overexpressziójának hatására.

Amikor a kontroll (26C ábra) és a transzfektált (26D ábra) izomcsöveket a thapsigargin adagolásával egy időben a TRPC inhibitor YM-58483-mal (4-methyl-40-[3,5-bis(trifluoromethyl)-1Hpyrazol-1-yl]-1,2,3-thiadiazole-5-carboxanilide) kezeltük, a SOCE tulajdonságaiban mutatkozó különbségek nem csak megszűntek, hanem a SOCE kialakulásának sebessége a TRPC1-et túltermelő izomcsövekben még a kontrollnál is alacsonyabb volt. A szer szignifikánsan lecsökkentette ($p<0,05$) a SOCE-t kísérő Ca^{2+} -tranziens felszálló szárának meredekségét mind a kontroll, mind a transzfektált sejtekben ($1,8\pm0,3$ nM/s, $n=19$ az előbbinél, és $1,1\pm0,2$ nM/s, $n=16$ az utóbbinál), és amplitúdóját a transzfektált sejtekben ($88,5\pm7,5$ nM, $n=16$) a nem kezelt sejtekhez viszonyítva. Az anyag jelenlétében a SOCE kis mértékben, de nem szignifikánsan, kisebb volt a TRPC1-et túltermelő sejtekben a kontrollhoz képest, ami ezekben a sejtekben a STIM1-Orai1 rendszer csökkent működésére utalhat (27C, D ábra).

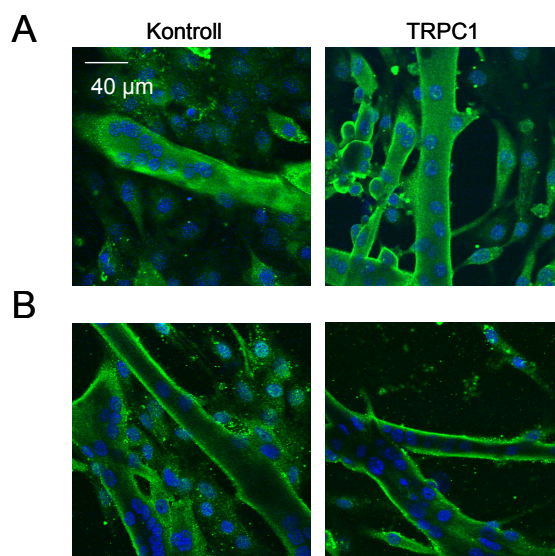
A Ca^{2+} -homeosztázisban részt vevő egyéb fehérjék expressziójának és funkcionális aktivitásának változása

Ahhoz, hogy az előző feltevést bizonyítsuk, a Ca^{2+} -függő jelátviteli útvonalakban részt vevő fontosabb fehérjék expresszióváltozását Western-blottal vizsgáltuk. Eredményeink alapján a STIM1 és a SERCA expressziója szignifikánsan csökkent, míg az aktin, az Orai1, a RyR és a calsequestrin expressziója nem változott (29A ábra). Ezt az eredmények kvantitatív analizisével is megerősítettük (29B ábra).

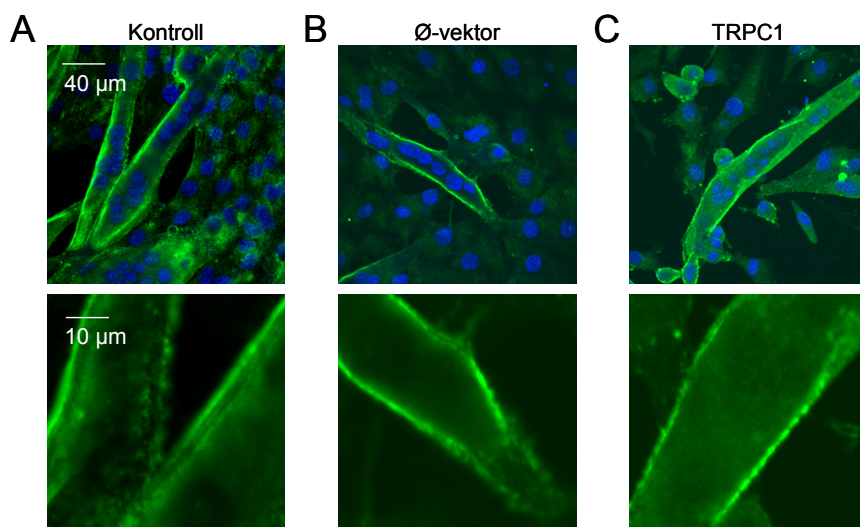


29. ábra. A Ca^{2+} -homeosztázisban résztvevő egyéb fehérjék kimutatása. (A) A Ca^{2+} -jelátvitelben résztvevő egyéb fehérjék expresszióját Western-blottal, teljes sejt lizátumokból (50 μg sávonként; K – kontroll, T – TRPC1-et túltermelő C2C12 myotubulusok) mutattuk ki. (B) A kontroll és transzfektált sejteken kapott Western-blot eredmények kvantitatív analízise (átlag $\pm$ SE).

A STIM1 (30A ábra) és az Orai1 (30B ábra) expresszióját, valamint a raktárürülés után a STIM1 aggregációját (31. ábra) immuncitokémiával is kimutattuk. A 31C ábrán jól látható, hogy TRPC1-et túltermelő sejtekben a csökkent mennyiségű STIM1 is képes ponttákkba rendeződni, és ezáltal a SOCE-t aktiválni.



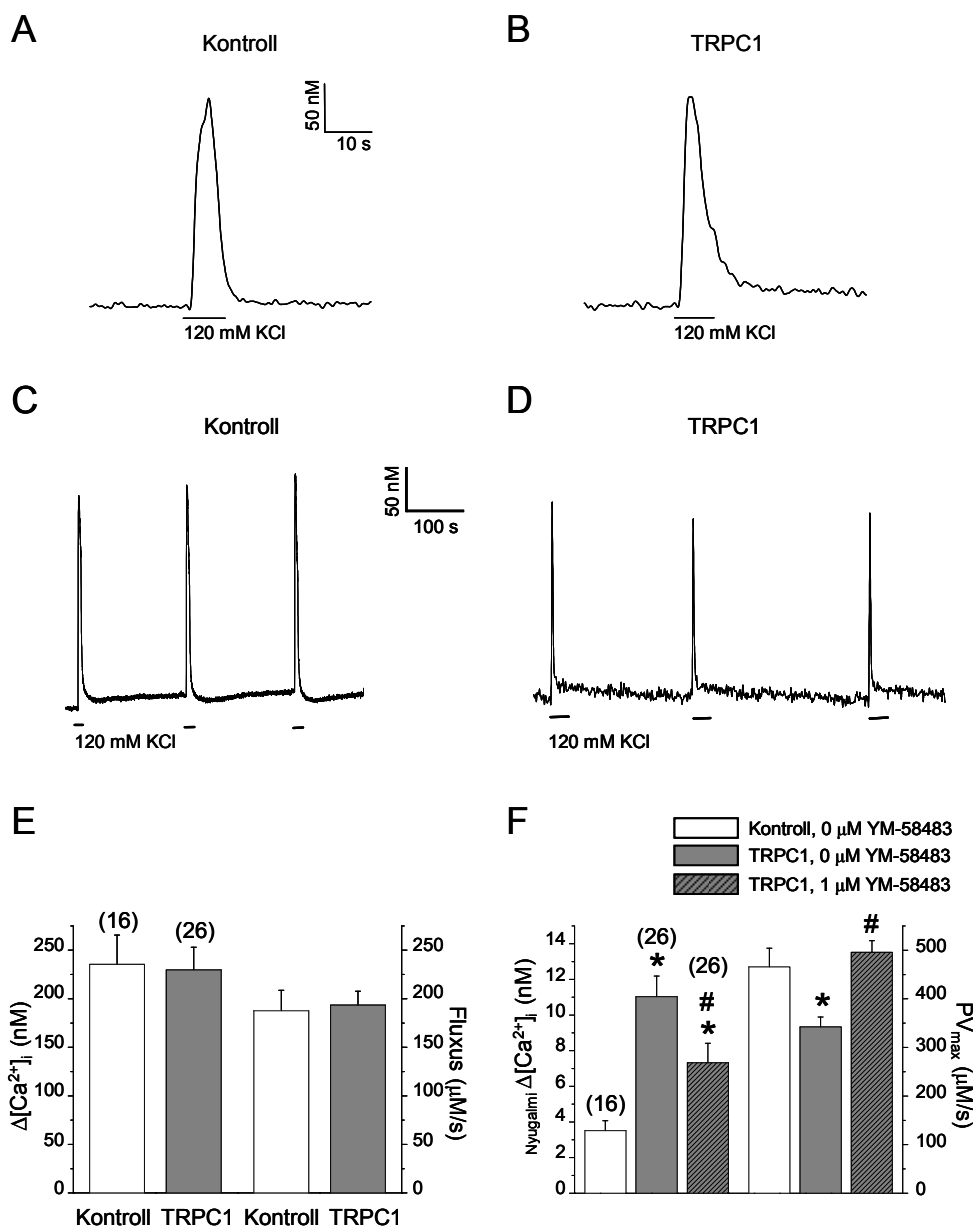
30. ábra. A Ca^{2+} -jelátvitellel összefüggő fehérjék immuncitokémiai jelölése 5 napos C2C12 myotubulusokban. (A) A STIM1 expressziója kontroll (bal panel) és TRPC1-et túltermelő (jobb panel) sejtekben. (B) Az Orai1 expressziója kontroll (bal panel) és TRPC1-et túltermelő (jobb panel) sejtekben. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük. A kalibráció mindegyik képen azonos. Az eredeti nagyítás 40 $\times$ volt.



31. ábra. A STIM1 fehérje pontákba rendeződése. A tenyészeteket 30 perces, 4 μ M thapsigargin általi raktárürítés után fixáltuk, majd a STIM1-et FITC-cel jelöltük (zöld). A felső és alsó panelek képei azonos látótérben lettek felvéve, azonban az alsó paneleken a nagyítás 4 $\times$ nagyobb. A STIM1 expressziója (A) kontroll, (B) üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált, és (C) TRPC1-et túltermelő myotubulusokban. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük. A kalibráció mindegyik felső és mindegyik alsó képen azonos. Az eredeti nagyítás a felső képek esetén 40 $\times$ volt.

A TRPC1 overexpresszió és a fentiek funkcionális következményeinek vizsgálatához egyedileg (32A, B ábra) vagy ismételten (32C, D ábra) alkalmazott 120 mM KCl-dal depolarizáltuk az izomcsöveket, és az így kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket vizsgáltuk. A tranziensek amplitúdóját, az azt meghatározó fluxust, a tranzienseket követő nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást, és a Ca^{2+} -pumpa maximális transzportkapacitását (PV_{max}) hasonlítottuk össze kontroll (32A, C ábra) és TRPC1-et túltermelő (32B, D ábra) izomcsöveken. Sem a tranziensek amplitúdója (235 ± 30 nM, $n=16$ a kontroll, és 230 ± 23 nM, $n=26$ a transzfektált sejteknél), sem a fluxusa (188 ± 21 $\mu\text{M/s}$ az előbbinél, és 193 ± 14 $\mu\text{M/s}$ az utóbbinál) nem változott szignifikánsan ($p > 0,8$) a TRPC1-et túltermelő izomcsöveken (32E ábra). Ez arra utal, hogy sem a RyR-on keresztüli Ca^{2+} -felszabadulás, sem a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák működése nem változott. Másrésről viszont, a tranzienseket követően az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szignifikánsan lassabban csökkent – ez különösen az ismételt adagolást mutató, hosszabb időskálájú görbéken volt nyilvánvaló (32D ábra) –, és magasabb alapértékre állt be a transzfektált izomcsövekben (a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ különbsége a tranziensek előtti és utáni állapot között $3,5 \pm 0,6$ nM volt a kontroll, és $11,0 \pm 1,2$ nM volt a TRPC1-et túltermelő sejtekben), ami a SERCA pumpák csökkent Ca^{2+} -felvevő kapacitására utal (32F ábra). Ezt a PV_{max} számolásával számszerűsítettük (lásd Anyagok és Módszerek), ami – összhangban a Western-blottal kimutatott SERCA expressziócsökkenéssel – szignifikánsan ($p < 0,01$)

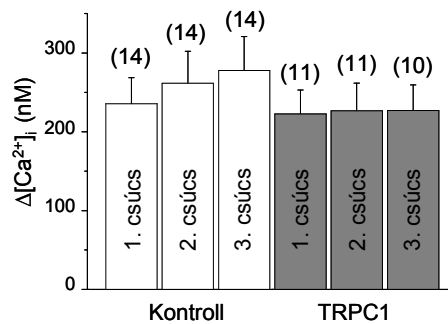
csökkent a TRPC1-et túltermelő izomcsövekben ($342 \pm 20 \mu\text{M/s}$) a kontrollhoz ($465 \pm 39 \mu\text{M/s}$) képest.



32. ábra. A TRPC1 overexpressziójának funkcionális hatása a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranziensekre. (A, B) Egyszeri, vagy (C, D) ismételt 120 mM KCl adagolása által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek reprezentatív görbéi (A, C) kontroll, és (B, D) TRPC1-et túltermelő C2C12 myotubulusokon. (E) A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és a maximális Ca^{2+} -fluxus (a sejtekbe 1 másodperc alatt belépő Ca^{2+} mennyisége) kontroll és TRPC1-et túltermelő myotubulusokban. (F) A tranziensek utáni nyugalmi Ca^{2+} -szint, és a SERCA pumpa aktivitásának megváltozása kontroll és TRPC1-et túltermelő myotubulusokban. A KCl által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket YM-58483-mal kezelt TRPC1-et túltermelő sejtekben is megvizsgáltuk. A csillag (*) a kontroll és a TRPC1-et túltermelő sejtek közti, míg a kettős kereszt (#) az YM-58483 jelenlétében és hiányában kapott adatok közti szignifikáns különbséget jelöli. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a vázizomtenyészetek ismételt KCl-os depolarizációra egyre növekvő amplitúdójú Ca^{2+} -tranziensekkel válaszolnak (Szappanos et al.

2004). Ezt az extracelluláris Ca^{2+} beáramlásával, és ezáltal az SR Ca^{2+} -telítettségének növekedésével magyarázták. A TRPC1-et túltermelő sejtekben azonban az ismételt KCl-stimuláció nem okozta a Ca^{2+} -tranziensek növekedését (33. ábra), ami szintén a SERCA aktivitás csökkenésének közvetlen következménye lehet. Ezek alapján, a depolarizáció során beáramló Ca^{2+} -nak csak kisebb része szállítódik az SR-be, így az SR Ca^{2+} -tartalma nem nő az egyes tranziensek után.

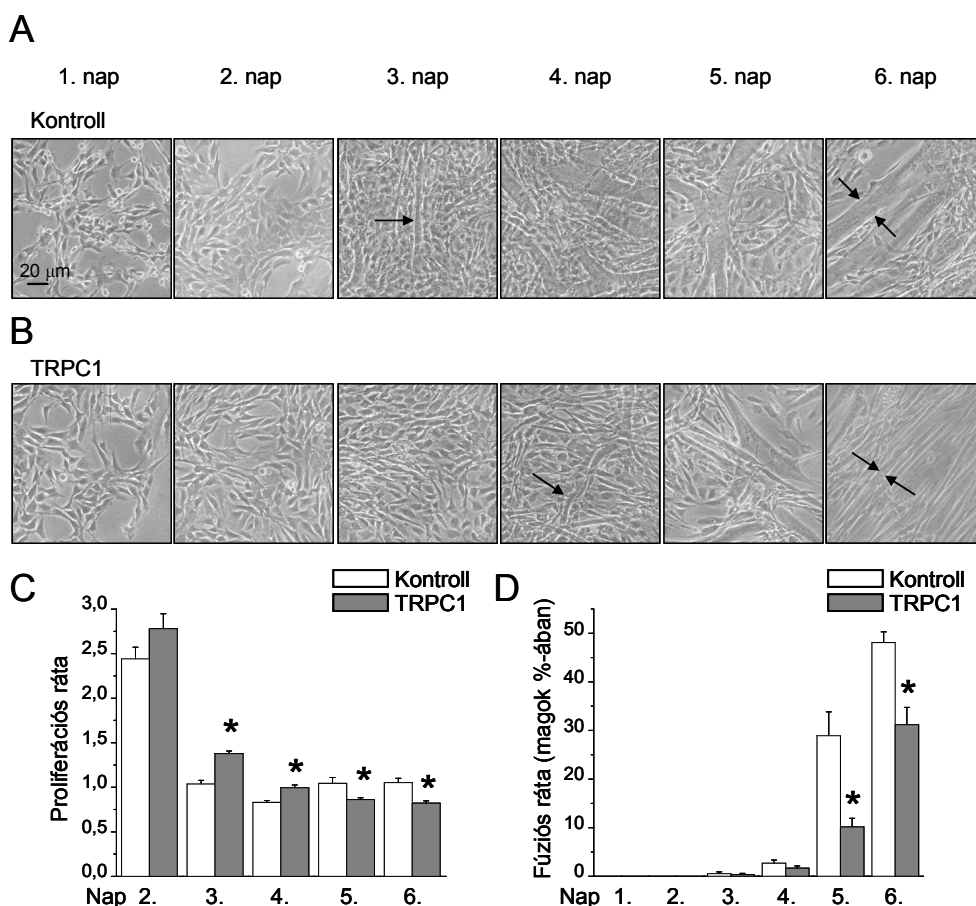


33. ábra. Ismételt 120 mM KCl adagolása által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdói. A háromszori KCl adagolás 1., 2., és 3. Ca^{2+} -csúcsainak amplitúdói. A kontroll sejtek esetén megfigyelt tendenciózus növekedés a TRPC1-et túltermelő sejtekben a SERCA expresszió csökkenése miatt elmaradt. A zárójelekben feltüntetett számok a vizsgált sejtek számát jelzik.

A tranzienseket követő magasabb nyugalmi Ca^{2+} -szint fennmaradásának másik oka a TRPC1 csatornákon keresztül esetlegesen „becsorgó” Ca^{2+} lehet. Ennek a vizsgálatához a TRPC1-et túltermelő izomcsövekben a csatornákat YM-58483-mal gátoltuk (32F ábra). A tranzienseket követő nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ magasabb volt, mint a kontroll sejtekben, azonban így is szignifikánsan alacsonyabb volt ($7,3 \pm 1,1$ nM, $n=26$), mint az YM-58483 kezelést nem kapott transzfektált sejtekben. Ez a TRPC1 csatornákon keresztül történő „ Ca^{2+} -csorgás” részleges szerepét jelezheti. Azt az elgondolást, hogy inkább a TRPC1-en keresztüli „ Ca^{2+} -csorgás” a felelős a tranzienseket követő megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ért, az is megerősítette, hogy az YM-58483-mal kezelt, TRPC1-et túltermelő sejtekben a PV_{max} hasonló volt (496 ± 24 $\mu\text{M/s}$), mint a kontroll sejtekben.

A kontroll és a TRPC1-et túltermelő sejtek differenciálódásának összehasonlítása

A TRPC1-et túltermelő tenyészetek morfológiájának eltérését is megfigyelhettük a kontrollhoz képest a differenciálódás során (34A, B ábra). Azonos körülmények között tenyésztve, a többmagvú izomcsövek később jelentek meg (4. nap) és vékonyabb átmérőjűek voltak (6. nap, nyilak) a TRPC1-et túltermelő tenyészetekben. Ahhoz, hogy ezeket az eltéréseket konkrét adatokkal is alátámasszuk, a tenyésztés mindegyik napján meghatároztuk a proliferációs rátát (34C ábra) és a fúziós indexet (34D ábra).

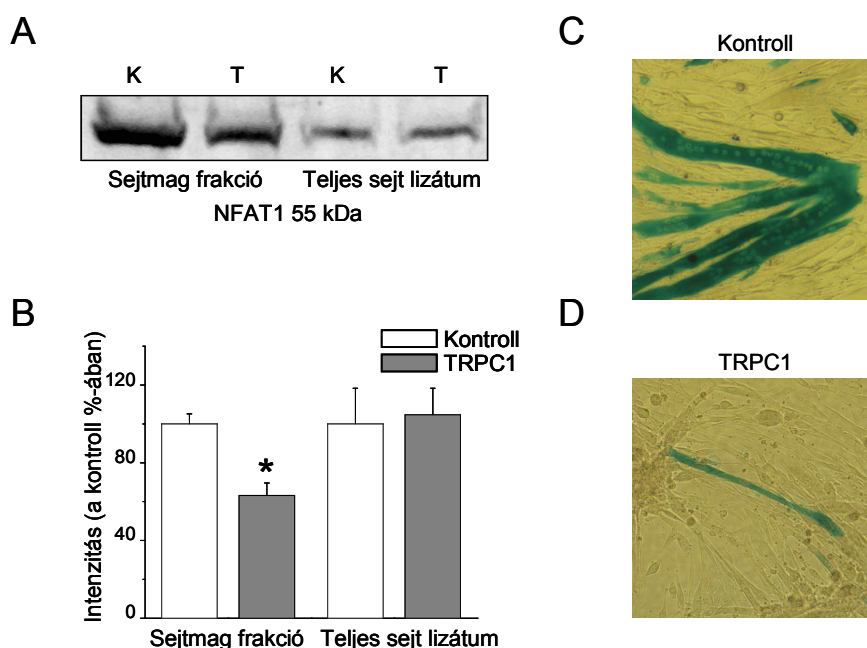


34. ábra. A TRPC1 túltermeltetés hatása a tenyészetek differenciálódására. Differenciálódó C2C12 sejtek reprezentatív felvételei a tenyésztés különböző napjain. **(A)** A kontroll és **(B)** a TRPC1-et túltermelő sejteket azonos körülmények között tenyésztettük. A proliferáltató oldatot a tenyésztés 2. napján differenciáltató oldatra cseréltük. A képeket 20× nagyítással vettük föl. A TRPC1-et túltermelő tenyészetekben a többmagvú myotubulusok később jelentek meg (4. nap) és vékonyabb átmérővel rendelkeztek (6. nap, nyilak). **(C)** A proliferációs rátát az adott és az előző tenyésztési napon kapott sejtmagszám hányadosaként számoltuk kontroll és transzfektált sejtekben. **(D)** Fúziós index, amit a többmagvú myotubulusokban lévő sejtmagok számának az összes mag számához viszonyított százalékaként fejeztünk ki.

Amikor a sejtek tenyésztését megkezdjük, a kontroll és a TRPC1-et túltermelő sejtek száma nem különbözött szignifikánsan ($p > 0,2$) a tenyésztőedényben. A tenyésztés 2. napján a proliferációs ráta nem különbözött szignifikánsan a transzfektált tenyészetekben a kontrollhoz képest ($2,78 \pm 0,16$ az előbbinél, és $2,44 \pm 0,13$ az utóbbinál). Amikor a tápoldatot lecseréltük a differenciálódást elősegítő tápoldatra, a kontroll tenyészetekben befejeződött a proliferáció, és a sejtek elkezdtek többmagvú izomcsöveket képezni (3. nap). Ezzel szemben a TRPC1-et túltermelő tenyészetekben a proliferáció egészen a 4. napig folytatódott. A differenciálódott izomcsövek aránya a kontroll tenyészetekben a tenyésztés minden napján magasabb volt, mint a transzfektáltakban. Ezek az eredmények alátámasztják a mikroszkópos megfigyeléssel kapottakat, miszerint a TRPC1-et túltermelő tenyészetek később kezdtek differenciálódni, és vékonyabb izomcsöveket képeztek. Ezt az összehasonlítást az üres pcDNA3.1 vektorral

transzfektált sejtekkel is végrehajtottuk (az adatokat nem mutatjuk), azonban az említett morfológiai változások csak a TRPC1-et túltermelő sejtekben voltak megfigyelhetőek.

Azért, hogy e morfológiai változások, és a csökkent differenciálódó képesség magyarázatát megtaláljuk, Western-blottal vizsgáltuk az NFAT1 expresszióját kontroll és transzfektált sejtekből nyert teljes sejt lizátumokban és sejtmag frakciókban (35A ábra). Míg a teljes sejt lizátumokban az NFAT1 expressziója nem különbözött a két sejttípus között, a sejtmag frakciókban a TRPC1-et túltermelő sejtekben szignifikánsan kevesebb NFAT1 volt a kontrollhoz képest (35B ábra). Ezeket az eredményeket a Rosenberg és munkatársai (Rosenberg et al. 2004) által kifejlesztett HSP-NRE NFAT-riporter plazmid és X-Gal festés alkalmazásával erősítettük meg (35C, D ábra). Az NFAT aktivitás mértékével arányosan a myotubulusok kékes elszíneződést mutattak. 15 db kontroll és 9 db TRPC1-et túltermelő myotubulust vizsgáltunk, mindegyiken 5-5 ROI-t analizáltunk ImageJ program segítségével. A kontroll sejtekben szignifikánsan erősebbnek bizonyult az NFAT aktivitása ($p < 0,05$; $57,5 \pm 1,4$ AU, $n=75$ kontroll, és $46,1 \pm 2,6$ AU, $n=45$ TRPC1-et overexpresszáló myotubulusokban), ami alátámasztja a Western-blottal kapott eredményeket.



35. ábra. Az NFAT1 expressziójának és aktivitásának kimutatása. (A) Az NFAT1 expresszióját Western-blottal mutattuk ki sejtmag frakcióban és teljes sejt-lizátumban kontroll (K) és TRPC1-et túltermelő (T) myotubulusokban. (B) A Western-blot eredmények kvantitatív analízise (átlag $\pm$ SE). Az NFAT aktivitását HSP-NRE NFAT-riporter plazmiddal történő transzfekció után, X-Gal festéssel mutattuk ki (C) kontroll és (D) TRPC1-et túltermelő myotubulusokban. Az eredeti nagyítás 10 $\times$ volt.

Megbeszélés

Kutatásaim során olyan fehérjék szerepét vizsgáltam, amelyek részt vesznek a vázizom differenciálódás korai stádiumaiban az IP₃ receptor működése és a SOCE mechanizmus szabályozásában. A funkciójuk felderítésén keresztül eredményeim – reményeim szerint – hozzájárulhatnak az izom Ca²⁺-homeosztázisának valamint az izomfejlődés folyamatának jobb megismeréséhez.

I. A Trisk 32 overexpressziója fokozza az IP₃R működését

Munkánk első felében bemutattuk, hogy a Trisk 32 fehérje L6 myoblastokban túltermeltetve kolokalizál és ko-immunoprecipitál az IP₃R-al. Elsőként mutattunk be a fehérje élettani szerepét bizonyító mérési eredményeket. A vázizom triadin ezen izoformája nagymértékben megnövelte a vazopresszin vagy bradykinin által kiváltott, az ER-ből történő Ca²⁺-felszabadulást, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy részt vesz az IP₃R szabályozásában.

A triadinokat két évtizeddel ezelőtt írták le vázizomból (Brandt et al. 1990, Kim et al. 1990). Azóta számos újabb izoformájukat felfedezték, és a lokalizációjukat és a szöveti eloszlásukat is felderítették. Kollaborációs partnereink (Vassilopoulos et al. 2005) többek közt egy 32 kDa-os vázizom triadin izoforma létezését bizonyították. Kimutatták, hogy – a többi izoformával ellentétben – a triádon kívül, a longitudinális SR-ben helyezkedik el, és az IP₃R-al és a mitokondriumokkal kolokalizál. A Trisk 32 élettani szerepéről azt feltételezték, hogy az IP₃R-on keresztüli Ca²⁺-felszabaduláshoz, vagy a szarkomer-struktúra kontrakció közben való fenntartásához, vagy a mitokondriumban történő Ca²⁺-tároláshoz lehet köze.

Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a Trisk 32-nek lehet-e szerepe az IP₃R szabályozásában – hasonlóan, ahogy a Trisk 95 részt vesz a RyR szabályozásában –, a fehérjét L6.G8 myoblastokban termeltettük túl. Azért ezt a sejtípust választottuk, mert ismert róla, hogy elvesztette a differenciálódásra való képességét (a forgalmazó – European Collection of Cell Cultures – állítása és saját, nem publikált vizsgálataink alapján), így állandó, a tenyésztés idejétől többé-kevésbé független háttérrel biztosított a vizsgálatokhoz. Fontos megjegyezni, hogy a myoblastok a differenciálódás kezdeti stádiumát képviselik. Az is ismert, hogy a triadin expressziója párhuzamosan zajlik a differenciálódással, azaz a triadin expresszió nagyon alacsony a myoblast stádiumban, és egyre nő, ahogy az izomsejtek

differentiálódnak (Vassilopoulos et al. 2005). Az L6.G8 myoblastok ezáltal ideális rendszert biztosítottak a Trisk 32 overexpresszió tanulmányozására, ugyanis bármiféle kölcsönhatás az IP₃R-ok és a triadinok – ha utóbbiak egyáltalán jelen voltak – között minimális volt a kontroll sejtekben, és közel maximális a Trisk 32-t túltermelő sejtekben. Ráadásul ebben a stádiumban a nagyon alacsony szintű RyR expressziónak köszönhetően olyan körülmények között lehetett dolgozni, ahol a RyR által mediált Ca²⁺-felszabadulás okozta zavaró hatás elhanyagolható volt.

A Trisk 32-vel és az üres vektorral végzett transzfekció nem befolyásolta a sejtek életképességét, ugyanakkor mind az üres vektorral transzfektált, mind a Trisk 32-t túltermelő sejtek proliferációs képessége lecsökkent a kontrollhoz képest. Ezt feltehetőleg az okozta, hogy a halálos dózisz (1 mg/ml) geneticinben történő növekedés, és a rezisztenciafehérjék expresszálása megnövelte a metabolikus stresszt a transzfektált sejtekben.

Kimutattuk a Trisk 32 és az IP₃R kolokalizációját és közvetlen fizikai kapcsolatát a transzfektált sejtekben, valamint a funkcionális kapcsolatukat is bizonyítottuk. Az IP₃ útvonal aktiválásához bradykinint és arginin-vazopresszint használtunk. A B2 bradykinin receptorok jelenlétét már korábban kimutatták L6 sejteken (Miyata et al. 1998), valamint a receptorok és az IP₃ jelátviteli útvonal kapcsolatát is bizonyították vázizmon (Rabito et al. 1996). Hasonlóképp, az IP₃-útvonalhoz kapcsolt V1 vazopresszin receptorokat is leírták már L6 sejtvonalról (Teti et al. 1993). Ezeket az eredményeket immuncitokémia használatával mi is megerősítettük a vizsgálatainkhoz használt L6.G8 altípuson.

Munkánk egyik fő felfedezése az, hogy a Trisk 32 overexpressziója szignifikánsan nagyobb amplitúdójú és felszálló meredekségű Ca²⁺-tranzienseket eredményezett az IP₃ útvonalon keresztül, akár BK, akár AVP segítségével aktiváltuk azt. E megfigyelésnek legalább négy különböző, ám funkcionálisan összefüggő magyarázata lehet. Az első lehetőség az, hogy a Trisk 32 megváltoztathatja a felszíni membránreceptorok és az IP₃ képzésével járó folyamatok kapcsolódását, ami miatt nagyobb mennyiségű IP₃ keletkezhet a transzfektált sejtekben. Második lehetőségként a Trisk 32 közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatással fokozhatja az IP₃R megnyílását a receptor agonistája jelenlétében. A harmadik lehetséges magyarázat az, hogy a Trisk 32 overexpressziója az ER Ca²⁺-tartalmának emelkedéséhez, és ezáltal nagyobb mennyiségű felszabadítható Ca²⁺-hoz vezethet. Végül, a Trisk 32 szabályozhatja az intracelluláris raktár ürülésének kapcsolódását az extracelluláris Ca²⁺ belépéséhez, ami egy erősebb SOCE-t eredményezhet. Ezek mellett a RyR által mediált Ca²⁺-felszabadulásra gyakorolt, akár közvetlen, akár a felszabaduló Ca²⁺-on keresztüli közvetett hatása (Ca²⁺-indukált Ca²⁺-felszabadulás; CICR) sem zárható ki elméletben teljesen.

Az első, fentebb említett lehetőség ellen számos bizonyítékot szolgáltatunk. Először is, két, egymástól független útvonal – B2 és V1 receptorok – aktivációja hasonló, megnövekedett Ca^{2+} -jeleket eredményezett, ami ellentmond annak a lehetőségnek, hogy a Trisk 32 a receptorok aktiválódása utáni IP_3 képződést fokozná. Ez csak abban az esetben lehetne így, ha a Trisk 32 egyaránt kapcsolódna mind a B2 bradykinin, mind a V1 vazopresszin receptorokhoz, aminek csekély a valószínűsége. Ugyan a PLC-re gyakorolt hatást nem tudjuk ilyen egyszerűen kizárni, ha csak a funkcionális eredményekre – Ca^{2+} -tranziensek – támaszkodunk, azonban az immuncitokémiai jelölődés alapján nem valószínű, hogy a Trisk 32 egy plazmamembrán-fehérjéhez kapcsolódna.

Arra is bizonyítékokat szolgáltatunk, hogy az IP_3R aktivációja nem változik meg abban az esetben, ha a receptorokat közvetlenül, a jelátviteli útvonal kihagyásával stimuláljuk. Ezt az bizonyítja, hogy a thimerosal – egy széles körben használt, membránpermeabilis IP_3R agonista (Thorn et al. 1992, Elferink 1999, Vanlingen et al. 2001) – adagolást követő Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és felszállási meredeksége azonos mértékű volt a kontroll, üres vektorral transzfektált, és Trisk 32-t túltermelő sejtekben. Ezek alapján arra lehet következtetni, hogy a Trisk 32-t túltermelő sejtekben az IP_3R konduktanciája nem változik meg (ezt megerősíti az is, hogy más, független bizonyítékaink arra utalnak, hogy a raktár Ca^{2+} -tartalma hasonló volt ezekben a sejtekben). Azonban a thimerosallal azt is leírták, hogy az I. típusú IP_3R -t aktiválja, a III. altípust nem (Bultynck et al. 2004). Így a kapott eredmények úgy is értelmezhetők, hogy a Trisk 32 fehérje csak az IP_3R III. típusát szabályozza, az I. altípust nem.

Mindezek mellett a kolokalizációs, ko-immunoprecipitációs, és funkcionális vizsgálatok is erősen arra utalnak, hogy közvetlen kölcsönhatás van az IP_3R (feltehetőleg a III. altípusa) és a Trisk 32 között. Ezek alapján a Ca^{2+} -csatorna és a Trisk 32 egyidejű jelenléte és közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatása fokozhatja az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulást. Kísérleteink során megfigyeltük a Ca^{2+} -tranziensek felerősödését a transzfektált sejtekben extracelluláris Ca^{2+} hiányában, ami ráadásul normál külső Ca^{2+} jelenlétében még kifejezettebb volt. Ez utóbbi a Ca^{2+} -felszabadulás, az ezzel járó raktárürülés, és az ezt követő SOCE fokozódására utalhat a Trisk 32-t túltermelő sejtekben.

Másrésről viszont arra utaló bizonyítékaink is vannak, hogy a Trisk 32 overexpressziója nem hat közvetlenül a SOCE mechanizmusra. Ennek a vizsgálatához, az ER Ca^{2+} -raktárát egy SERCA pumpa gátlószerezrel – thapsigarginnal –, Ca^{2+} -mentes közegben kiürítettük, majd az extracelluláris Ca^{2+} visszaadásával aktiváltuk a plazmamembránon keresztüli Ca^{2+} -belépést (Bird et al. 2008). Sem a SOCE-t kísérő Ca^{2+} -tranziens amplitúdója,

sem a felszálló szárának meredeksége nem különbözött szignifikánsan a Trisk 32-t túltermelő sejtekben a kontrollhoz képest. Ez azt bizonyítja, hogy a Trisk 32 túltermeltetése nem hat magára a SOCE mechanizmusra, azonban nem magyarázza a BK adagolásakor a normál és Ca^{2+} -mentes körülmények között kapott eredmények különbözőségét. Ez utóbbi magyarázata az lehet, hogy a SOCE vizsgálatokor használt thapsigargin teljes raktárürítést végzett a kontroll és a transzfektált sejtekben egyaránt, így – mivel a raktár Ca^{2+} -tartalma azonos volt a két sejttípusban (lásd később) – a SOCE is azonos nagyságú volt. A BK azonban az IP_3R aktiválásán keresztül valószínűleg csak részlegesen ürítette ki a raktárt, így a Ca^{2+} -válasz nagyságával, és ezáltal a raktárürítés mértékével többé-kevésbé arányos, eltérő nagyságú SOCE-t eredményezhetett a két sejttípusban. Ezek mellett Western-blottal kimutattuk, hogy bár a TRPC1 expressziója nem változott a Trisk 32-t túltermelő sejtekben, a STIM1 mennyisége szignifikánsan lecsökkent. Ennek a funkcionális következményei nem voltak érzékelhetőek az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérések során. Hasonló megfigyelést tettünk a TRPC1 túltermeltetését tárgyaló alfejezetben is, ahol a TRPC1-et túltermelő C2C12 sejtekben a STIM1 csökkenése szintén nem járt együtt SOCE csökkenésével. Ezek az eredmények összességében azt sugallják, hogy a Trisk 32 overexpresszió fő hatása nem a SOCE működésének a megváltoztatása, és arra is utalhatnak, hogy a STIM1 ilyen mértékű csökkenése még nem okoz észrevehető hiányosságokat a SOCE mechanizmus során.

Az előző kísérletek ráadásul lehetővé tették azt is, hogy megmérjük az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak telítettségi állapotát. A thapsigargin által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójának és görbe alatti területének megmérése során nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és transzfektált sejtek között, ami arra utal, hogy a Trisk 32 overexpressziója nem befolyásolja az ER Ca^{2+} -raktár Ca^{2+} -tartalmát.

A triadin 95 kDa-os izoformájáról ismert, hogy a RyR-on keresztüli Ca^{2+} -felszabadulást szabályozza (Rezgui et al. 2005, Fodor et al. 2008), és arra utaló adatok is vannak, hogy felnőtt izomrostokban a Trisk 32, nagyon kis mértékben bár, de ko-immunoprecipitálhat a RyR1-gyel (Marty et al. 2009). Ahhoz, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy a RyR-on keresztül bekövetkező, a Trisk 32 overexpresszió hatására megnövekedett CICR okozta a nagyobb BK vagy AVP által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket, funkcionális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ méréseket végeztünk. Sem a RyR agonista 30 mM koffein alkalmazása, sem a BK és AVP adagolás alatt a receptor antagonistája – 10 μM rianodin – nem módosította szignifikánsan a Ca^{2+} -jeleket. A koffein által kiváltott válaszok gyakorlatilag egyformák voltak a kontroll és transzfektált sejtekben, továbbá a transzfektált sejtekben a BK illetve AVP által kiváltott tranziensek sem voltak szignifikánsan alacsonyabbak rianodin

jelenlétében, mint anélkül, ráadásul nem csökkentek a kontroll sejtek szintjére sem. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Trisk 32 overexpresszió hatásai nem magyarázhatóak kizárólag a RyR megváltozott működésével. Mindazonáltal megjegyzendő, hogy rianodin jelenlétében a BK és AVP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdójának kismértékű csökkenése arra utalhat, hogy a CICR, kismértékben ugyan, de mégis részt vehet az L6 sejtek Ca^{2+} -jeleiben. A myoblastokon kapott eredményeink alapján nem zárhatjuk ki teljesen azt, hogy felnőtt izomban a Trisk 32 részt vesz a RyR szabályozásában. Fontos hangsúlyozni, hogy a sejtvonal kiválasztásakor azt tartottuk az egyik legfontosabb szempontnak, hogy az IP_3 útvonal rajtuk a RyR zavaró hatásai nélkül legyen tanulmányozható. Mivel az L6 sejtvonal G8 altípusa nem képes differenciálódni, a RyR expressziója is nagyon alacsony marad benne. A RyR saját, Western-blottal kapott eredményeink alapján sem volt detektálható a sejtekben, valamint a funkcionális vizsgálatok sem teszik valószínűvé azt, hogy a megfigyelt nagyobb AVP és BK által kiváltott tranziensek a Trisk 32 és RyR kölcsönhatásán keresztül jöttek volna létre.

Végkövetkeztetésként elmondható, hogy a Trisk 32-t túltermelő sejtekben a BK és AVP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek szignifikáns növekedése valószínűleg az ER-ből történő Ca^{2+} -felszabadulás fokozódása által valósul meg, a Trisk 32 és IP_3R közvetlen kölcsönhatása következtében.

II. A TRPC1 overexpressziója felerősíti a SOCE-t

Munkánk második felében bemutattuk, hogy differenciálódó izomsejtekben a TRPC1 overexpressziója a SOCE fokozódását okozza, ami a TRPC1 eltérő viselkedésére utal a kifejtett vázizomban leírtakhoz képest. Először szolgáltatunk bizonyítékot arra, hogy az overexpresszió hatása nem csak a szerhatásra bekövetkező raktárürülés utáni emelkedett Ca^{2+} -belépésben mutatkozik meg, hanem a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -jelek után megfigyelhető magasabb nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban is. Ráadásul a TRPC1 overexpressziója csökkentette a STIM1 és a SERCA expressziós szintjét, azonban a RyR-ét, a calsequestrinét és az Orail-ét nem, ami a TRPC1 az előbbi molekulákkal történő kölcsönhatására utalhat az SR membránjában.

Nem-ingerelhető sejtekben már évtizedekkel ezelőtt leírták a SOCE jelenlétét, azonban vázizomban a létezésére és szerepére csak az utóbbi években derült fény (Kurebayashi & Ogawa 2001, Gutierrez-Martin et al. 2005, Launikonis & Rios 2007). Ez a

Ca^{2+} -belépési folyamat nem csak az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak újratöltéséhez szükséges, hanem jelentős szerepe van a myotubulusok differenciálódásának szabályozásában is (pl. Louis et al. 2008, Stiber et al. 2008a). Bár a TRPC1 csatornákról már felfedezésük után nem sokkal feltételezték, hogy részt vesznek a SOCE-ban, a Ca^{2+} -belépésben játszott szerepük bizonytalanná vált (pl. Varga-Szabo et al. 2008) miután a STIM1-et, az SR Ca^{2+} -szenzorát (Liou et al. 2005, Roos et al. 2005), és az Orai1-et, a plazmamembránban lévő SOC csatorna pórusképző alegységét (Feske et al. 2006, Vig et al. 2006, Zhang et al. 2006) felfedezték, és az újabb kutatások felderítették a kapcsolatot e molekulák között. Később azonban a STIM1-ről leírták, hogy nem csak az Orai1-et szabályozza, hanem a TRPC1-et is (Huang et al. 2006, Worley et al. 2007, Yuan et al. 2007, Zeng et al. 2008), és a TRPC1 – a STIM1-gyel és Orai1-gyel közösen (Ambudkar et al. 2007, Ong et al. 2007, Liao et al. 2008), vagy tőlük függetlenül (DeHaven et al. 2009) – részt vehet a SOCE-ért felelős fehérjekomplexum kialakításában.

Jelen munkánkban bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a TRPC1 overexpressziója fokozza a SOCE-t, ráadásul megváltoztatja más, a vázizomtenyészetek Ca^{2+} -homeosztázisában részt vevő fehérjék expresszióját, és hatással van a többmagvú izomcsövek differenciálódására is. Másrészt viszont a TRPC1 túltermeltetése nem befolyásolta a sejtek életképességét és apoptózisra való hajlamát.

A belső Ca^{2+} -raktárak kiürítését követően a SOCE amplitúdója és felszálló szárának meredeksége szignifikánsan nőtt a TRPC1-et túltermelő myotubulusokban, ami a TRPC1 részvételét feltételezi a Ca^{2+} -belépésben. Ez a fokozott SOCE kétféleképpen magyarázható, melyek közül a második magyarázat kevésbé valószínű. Az első lehetőség szerint a TRPC1 csatorna közvetlenül részt vett a belépési mechanizmusban. A második magyarázat az lehet, hogy az overexpresszió valahogy felerősítette a STIM1-Orai1 útvonal hatékonyságát. Ugyan az utóbbit sem lehet teljesen kizárni, mégis az első lehetőség tűnik valószínűbbnek, mivel a STIM1 expresszió nem nőtt, hanem csökkent, ami csökkent STIM1-Orai1 kölcsönhatásra utal. Ezt az is megerősítette, hogy a megváltozott STIM1 expresszió funkcionális következménye is megfigyelhető volt az YM-58483 alkalmazását követően. A szer gátolta a TRPC1 csatornákat, és így a SOCE feltételezhetően csak az Orai1 csatornákon keresztül mehetett végbe. Ilyen körülmények között a Ca^{2+} -belépés valamivel kisebb mértékű volt, mint a kontroll sejtekben, ami a STIM1-Orai1 útvonal gyengébb működésére utalhat a TRPC1-et túltermelő tenyészetekben. Másrészt a csökkent STIM1 expresszió ellenére a raktárürülést követően a STIM1 ponttá továbbra is megfigyelhetőek voltak, ami arra utal, hogy a STIM1 aggregációja nem károsodott. Ezek alapján azt lehet feltételezni, hogy ha a TRPC1 csatornák

a raktárürülés során valóban a STIM1 által aktivált „SOCE komplexum” részét képezik, akkor a TRPC1-et túltermelő sejtekben a csökkent STIM1 expresszió a sejtek kompenzációs válasza lehet a finoman szabályozott Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásáért.

Ezek alapján az lenne elvárható, hogy a TRPC1 különböző mértékű expressziója különböző nagyságú SOCE-t eredményezzen. Ezt azonban pontos, kvantitatív mérésekkel igen nehéz bebizonyítani. A bizonyítást tovább nehezíti az is, hogy a TRPC1 teljes expressziós szintje nem feltétlenül egyenesen arányos a felszíni membránban található fehérjemennyiséggel, és ezáltal a lehetséges Ca^{2+} -belépési csatornák számával. Ráadásul, még ha ezt a korrelációt bizonyítani is tudnánk, a SOCE tranziensek amplitúdóját és felszállási meredekségét nagyban befolyásolná az intracelluláris tér pufferkapacitása. Mindezek ellenére olyan TRPC1-et overexpresszáló klónokat is összehasonlítottunk, amelyek különböző mértékben termelik túl a vizsgált fehérjét, és elfogadható mértékű korrelációt találtunk a TRPC1 expressziós szintje és a SOCE nagysága között. Ezekben a klónokban a TRPC1 expressziós szintjének növekedésével mind a SOCE felszálló szárának meredeksége, mind az amplitúdója nőtt.

Megemlítendő, hogy a SERCA expressziócsökkenése is megfigyelhető volt a TRPC1-et overexpresszáló sejteken. Ennek a hatása különösen szembetűnő volt a 120 mM KCl adagolása által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek után. A TRPC1-et túltermelő sejtek a Ca^{2+} -ot lassabban tudták eltávolítani a myoplazmából, és a tranzienseket követő nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -juk is magasabb volt. Az előbbi a csökkent SERCA expresszió közvetlen következménye lehet, amit a Ca^{2+} -pumpa transzportkapacitásának (PV_{max}) csökkenése is igazol. A tranziensek után magasabban maradó nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t magyarázhatja a Ca^{2+} eltávolítás sebességének csökkenése is, valamint az is lehetséges, hogy a túltermelt TRPC1 csatornákon keresztül bekövetkező erősebb és hosszabban tartó Ca^{2+} -belépés okozza. Utóbbi elképzelést az a felfedezés is megerősíti, hogy a Ca^{2+} -tranziensek utáni nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést meg tudtuk szüntetni a TRPC1 csatornák gátlásával.

Elgondolkodtató az is, hogy mi lehet a jelentősége a csökkent SERCA expressziónak. Munkacsoportunk korábban leírta, hogy vázizom tenyészetekben, ismételt KCl stimuláció hatására, a második és azt követő Ca^{2+} -tranziensek nagyobbak voltak az elsőnél (Szappanos et al. 2004). Ez az extracelluláris térből beáramló Ca^{2+} -nak volt köszönhető, ami egyúttal az SR Ca^{2+} -töltöttségét is növelte, ami miatt nőtt a felszabadítható Ca^{2+} mennyisége. A TRPC1-et túltermelő sejtekben a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése még jobban kivehető volt, minden egyes KCl által kiváltott Ca^{2+} -tranziens után. Ezek után arra számíthattunk volna, hogy még nagyobb lesz az SR töltöttségének az emelkedése, és a következő Ca^{2+} -tranziensek

amplitúdója. Ilyen emelkedést azonban nem sikerült megfigyelni a TRPC1-et túltermelő sejteknél. Úgy gondoljuk, hogy ez a csökkent SERCA aktivitás közvetlen következménye lehet. Emiatt a depolarizáció alatt belépő Ca^{2+} -nak csak egy kisebb része tud elraktározódni az SR-be, és így az SR Ca^{2+} -tartalma nem nő a tranziensek után, hanem a Ca^{2+} lassan eltávolítódik a felszíni membránon keresztül. Ez megvédheti a sejteket a fokozott SOCE következményeként a raktár túltöltődésétől.

Azonban más módon is magyarázható a megfigyelt két SR-fehérje (STIM1 és SERCA) expressziócsökkenése. Kollaborációs partnereink nemrég kimutatták, hogy felnőtt vázizomrostokban a TRPC1 az SR membránjában található meg (Berbey et al. 2009). Ez felveti azt a lehetőséget, hogy ha a TRPC1-et túltermeltetjük vázizom tenyészetekben, akkor a fehérje egy része megjelenhet az SR-ben is, és így onnan fizikailag kiszoríthat más fehérjéket.

Annak ellenére, hogy a TRPC1 túltermeltetés hatására sem a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sem az SR Ca^{2+} -tartalma nem változott szignifikánsan, a differenciálódási folyamatok megváltozását figyeltük meg ezekben a sejtekben. A tenyésztő oldat differenciáltató oldatra váltása ellenére a sejtek proliferációja elhúzódott, és vékonyabb myotubulusok alakultak ki. Nem zárható ki, hogy a fentebb leírt KCl-stimuláció utáni átmeneti nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedéshez hasonló jelenség felelős ezekért a változásokért. Már korábban leírták, hogy a TRPC1 fontos szerepet tölt be a vázizom-differenciálódásban. A TRPC1 géncsendesítésével a myoblastok migrációja lassabbá vált, és a differenciálódásuk elmaradt (Louis et al. 2008). Hasonló elváltozást – az izomrost keresztmetszet csökkenését – találtak olyan egerekben is, melyekből hiányzott a Homer 1 fehérje. Ezt a jelenséget a TRPC1 kihorgonyozottságának megváltozásával hozták kapcsolatba (Stiber et al. 2008b). Ezen felül, egy másik TRPC csatorna, a TRPC3 szerepét kritikus fontosságúnak találták a kisagyi Purkinje sejtek dendritikus növekedésében és fejlődésében, ami további összekötő kapcsolatot jelent e csatornacsalád és az ingerelhető sejtek differenciálódása között (Becker et al. 2009). Ezeket az eredményeket összegezve feltételezhetjük, hogy a TRPC1-expresszió csökkentése és növelése egyaránt megváltoztatja a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisát, és csökkenti a myoblastok differenciálódási képességét.

Ezeket az észrevételeket alátámasztja az is, hogy a vázizom differenciálódás egyik kulcsfontosságú szabályozója, az NFAT1 (Horsley et al. 2001, Pavlath & Horsley 2003) expressziója lecsökkent a TRPC1-et túltermelő myotubulusokban, ami felelős lehet e sejtek csökkent differenciálódási képességéért. Érdekes azonban, hogy a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nem változott meg a TRPC1-et túltermelő sejtekben. Ez azt sugallná, hogy az NFAT transzlokáció kritikus lépése, a kalcineurin aktiválódása sem változhatna meg ezekben a sejtekben. Mi azonban úgy gondoljuk, hogy a TRPC1-et overexpresszáló sejtekben a döntő lépés a

különböző stimulációkat követően, az $[Ca^{2+}]_i$ átmeneti, de a kontroll körülményekhez képest jelentősen hosszabb ideig tartó megemelkedése. Megfigyeléseinket jól magyarázná a kalcineurin regulátorfehérjéje, az RCAN1-4 expressziójának párhuzamos növekedése, amely negatív visszacsatolással gátolja a kalcineurint, és ezáltal az NFAT áthelyeződését (Oh et al. 2010). Ezek alapján a következő folyamatot feltételezhetjük: a TRPC1-et overexpresszáló sejtekben a megnövekedett SOCE, vagy a Ca^{2+} -tranziensek után magasabban maradó nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ révén a kalmodulin Ca^{2+} -ot tud kötni. A Ca^{2+} -kalmodulin-komplex aktiválja a kalcineurint, amely defoszforilálja a citoplazmatikus NFAT-t, így szabaddá teszi a nukleáris lokalizációs szekvenciáját, és az NFAT ideiglenesen be tud jutni a magba, és génexpressziót tud beindítani (többek között az RCAN1-4-ét is). Ha az $[Ca^{2+}]_i$ csökkenése, vagy az expresszálódó RCAN1-4 hatására a kalcineurin gátlódik, akkor az NFAT refoszforilálódik, kihelyeződik a magból a citoplazmába, ezáltal megszűnik a génexpresszió (Crabtree & Olson 2002, Oh-hora & Rao 2009). Habár munkánkban a teljes mechanizmust nem tártuk fel pontosan, mégis úgy tűnik, hogy a megváltozott Ca^{2+} -homeosztázis és az ezzel járó NFAT áthelyeződés magyarázhatja a TRPC1-et túltermelő sejtek csökkent differenciálódó képességét.

Felnőtt izomrostokon végzett újabb kutatások kimutatták, hogy a TRPC1 az SR-ben szivárgó Ca^{2+} -csatornaként viselkedik (Bebey et al. 2009). Ugyan a mi, C2C12 myotubulusokon szerzett adataink nem zárják ki, hogy a túltermelt TRPC1 legalább részben azáltal járul hozzá a megemelkedett SOCE-hoz, hogy megnöveli az SR Ca^{2+} -szivárgását, az immunfestéssel és funkcionális mérésekkel szerzett adataink erősen azt sugallják, hogy a TRPC1 máshogy viselkedik az izomdifferenciálódás e korai szakaszában, mint felnőtt izomban.

Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a TRPC1 expressziójának növelése a SOCE fokozódását okozza. Ez negatív visszacsatolással szabályozza a STIM1-Orai1 rendszert és a SERCA aktiválódását, ami valószínűvé teszi ezen fehérjék együttműködését a Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában.

Összefoglalás

Disszertációmban két olyan fehérjét vizsgáltam, melyek élettani szerepe nem teljesen ismert. Mindkettőről feltételezik, hogy részt vesz a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisának szabályozásában, az egyik a szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+} -raktárából történő Ca^{2+} -felszabadulásban, a másik a raktárürülést követő extracelluláris Ca^{2+} -beáramlásban (SOCE mechanizmusban) tölthet be fontos szerepet. A disszertációmat megalapozó kísérletek során bebizonyosodott, hogy vizsgálataim egyik tárgya, a vázizom triadin 32 kDa-os izoformája (Trisk 32) erőteljesen fokozza az IP_3 receptoron (IP_3R) keresztüli Ca^{2+} -felszabadulást, míg a kanonikus tranziens receptorpotenciál csatornák 1. altípusa (TRPC1) a SOCE mechanizmusban vesz részt Ca^{2+} -csatornaként.

Patkány vázizomban a triadin fehérjének négy izoformája azonosítható, melyek ugyanazon génről képződő splicing variánsok. A Trisk 32 élettani szerepéről kevés információval rendelkezünk. Feltételezések szerint a szarkomer struktúrájának fenntartásában és az IP_3R -on keresztüli Ca^{2+} -felszabadulás szabályozásában vehet részt.

Kutatásunk során patkány eredetű L6.G8 myoblastokban stabil transzfekcióval túltermeltettük a Trisk 32 fehérjét, melyet RT-PCR, immuncitokémia, és Western-blot segítségével igazoltunk. Kimutattuk az IP_3R és a Trisk 32 kolokalizációját a transzfektált sejtekben, valamint ko-immunoprecipitációval igazoltuk a két fehérje közvetlen kapcsolódását is. A Trisk 32 overexpressziójának funkcionális hatását konfokális mikroszkóppal és egyedi sejten történő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -méréssel vizsgáltuk. Az IP_3 mediált Ca^{2+} -felszabadulást arginin-vazopresszin (AVP) és bradykinin lokális adagolásával érték el. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy $0,1 \mu\text{M}$ AVP lokális adagolására a Trisk 32-t túltermelő sejtek szignifikánsan nagyobb amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienseket produkálnak a kontroll és az üres vektorral transzfektált sejtekhez képest. A $20 \mu\text{M}$ bradykinin által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója és felszálló szárának meredeksége is szignifikánsan nagyobb volt a Trisk 32-vel transzfektált sejtekben a kontroll sejtekhez képest, normál extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) mellett és Ca^{2+} -mentes közegben egyaránt. Az, hogy a V1 vazopresszin és B2 bradykinin receptor stimulálása is hasonlóan megemelkedett választ váltott ki a Trisk 32-t túltermelő sejtekben, arra utal, hogy a vizsgált fehérje nem közvetlenül a két membránreceptorra hat. Az IP_3R thimerosallal történő közvetlen ingerlése a kontroll és transzfektált sejtekben azonos nagyságú Ca^{2+} -válaszokat váltott ki, aminek két oka lehet. Az egyik lehetőség az, hogy az IP_3R konduktanciája nem

változott a Trisk 32 overexpresszió következtében. A másik pedig az, hogy a Trisk 32 az IP₃R-I-et nem, csak az IP₃R-III-at szabályozza, ez utóbbira pedig nem hat a szer. Az IP₃R-on keresztül felszabaduló Ca²⁺ a szomszédosan elhelyezkedő rianodinreceptorok (RyR) megnyílását, és rajtuk keresztül Ca²⁺ felszabadulását okozhatja, ezt Ca²⁺-indukált Ca²⁺-felszabadulásnak (CICR) nevezzük. A RyR szerepét a receptor agonistája, (30 mM koffein) illetve antagonistája (10 μM rianodin) alkalmazásával vizsgáltuk, mely esetekben nem volt szignifikáns különbség a két sejttípus között. Ez arra utal, hogy a Trisk 32 overexpressziója nem befolyásolja sem a RyR működését, sem a CICR-t. Az endoplazmás retikulum (ER) Ca²⁺-tartalmának kiürülése során a belső raktárak feltöltésére az extracelluláris térből Ca²⁺-beáramlás történik. E jól szabályozott Ca²⁺-felvételi mechanizmust raktár által vezérelt Ca²⁺-belépésnek nevezzük (SOCE). A Trisk 32 overexpressziójának következtében a SOCE-t kísérő Ca²⁺-tranzien্স amplitúdója és meredeksége nem változott szignifikánsan a benne részt vevő STIM1 fehérje expressziójának módosulása ellenére. Ez arra utal, hogy nem a CICR vagy a SOCE fokozódása a fő oka az AVP illetve bradykinin adagolásakor megfigyelt különbségeknek, hanem az IP₃R fokozott működése.

Eredményeink arra utalnak, hogy a Trisk 32 nem csak kapcsolódik az IP₃ receptorhoz, de jelentős mértékben részt vesz az azon keresztül történő Ca²⁺-felszabadulás szabályozásában is.

Munkám második felében TRPC1 funkcióját vizsgáló kísérleteinkről számoltam be. Itt a TRPC1 overexpressziójának hatását vizsgáltuk a SOCE mechanizmusra, melynek működése számos fehérje (STIM1, Orai1 és TRPC1) együttműködésétől függ. Ismert, hogy a STIM1 feladata a [Ca²⁺]_i érzékelése az ER-ben, az Orai1 a felszíni membrán Ca²⁺-csatornája, míg a TRPC1 szerepe – mint raktár által vezérelt csatorna, vagy ennek része – és kapcsolata az előbbi két fehérjével nem teljesen tisztázott.

Kísérleteinkben liposzóma-mediált plazmid transzfekcióval C2C12 egér eredetű vázizomsejtekben túltermeltettük a TRPC1 fehérjét. Az overexpressziót mRNS szinten RT-PCR-rel, fehérje szinten pedig immuncitokémiával és Western-blot technikával igazoltuk. A transzfektált sejteken a SOCE által az [Ca²⁺]_i-ban bekövetkező változásokat mértük, amit Ca²⁺-mentes közegben az ER Ca²⁺-pumpáját (SERCA) gátló thapsigargin hozzáadásával, majd a raktár ürülése után a normál, 1,8 mM-os [Ca²⁺]_e visszaállításával értünk el. A TRPC1 overexpresszió eredményeként a SOCE-t kísérő Ca²⁺-tranzien্স amplitúdója és felszállási meredeksége szignifikánsan nőtt a TRPC1-et túltermelő C2C12 myotubulusokban. Ez az overexpresszió mértékével korrelálni látszott. A TRPC antagonistá YM-58483 alkalmazása során a TRPC1-et overexpresszáló myotubulusokban a SOCE-val együtt járó Ca²⁺-tranzien্স

meredeksége szignifikánsan, amplitúdója pedig kissé, de nem szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest, ami a túltermelődött TRPC1 gátolhatósága mellett a STIM1-Orai1 rendszer csökkent működésére is utalhat. Ezekben a sejtekben a STIM1 valamint a SERCA expressziójának csökkenését Western-blot technikával igazoltuk is. Utóbbi magyarázhatja azon megfigyelésünket, hogy 120 mM KCl által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket követően a Ca^{2+} -visszavétel lassult, és magasabb nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ volt megfigyelhető. A két fehérje expressziócsökkenése feltehetőleg a sejtek kompenzációs válasza volt a TRPC1 overexpressziójára. A STIM1 csökkenése – bár a ponttákkba rendeződésre továbbra is képes maradt – a SOCE másik útvonala, az Orai1-en keresztüli Ca^{2+} -belépés csökkentését okozhatta, míg a SERCA csökkenése a raktár túltöltődésétől védhette meg a sejteket. A TRPC1 fehérje túltermeltetésének hatására morfológiai változásokat is észleltünk, a myoblastok differenciálódása később kezdődött, és a myotubulusok vékonyabbak voltak a kontroll sejtkultúrákhoz viszonyítva. Ezekért az NFAT1 nevű transzkripciós faktor csökkent sejtmagon belüli aktivitását tettük felelőssé, melyet magfrakció izolálásával és az ezen végzett Western-blot vizsgálattal igazoltunk is. Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a transzfektált myotubulusok életképessége és apoptózisra való hajlama nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest.

Eredményeink arra utalnak, hogy a TRPC1 expressziójának növelése a SOCE fokozódását okozza, és negatív visszacsatolással szabályozza a STIM1-Orai1 rendszert és a SERCA aktivitását, valószínűvé téve ezen fehérjék együttműködését.

A dolgozatban bemutatott új tudományos megállapítások:

- A Trisk 32-t stabilan overexpresszáló L6 myoblastokban a Trisk 32 és az IP_3R ko-lokalizál és ko-immunoprecipitál
- Az IP_3 -útvonal AVP és BK általi aktiválása során nagyobb Ca^{2+} tranziensek figyelhetők meg a Trisk 32-t overexpresszáló sejtekben
- Ezek a változások nem a SOCE vagy a RyR aktivitásának fokozódása miatt következtek be
- A TRPC1 overexpressziója az expresszió mértékével arányosan fokozza a SOCE mechanizmust C2C12 myotubulusokban
- A STIM1 és a SERCA expressziója csökken a TRPC1-et túltermelő sejtekben, feltehetően a sejtek kompenzációs válaszaként
- A TRPC1 túltermeltetése az NFAT aktivitás megváltoztatásán keresztül hatással van a sejtek differenciálódására és morfológiájára

Summary

In this thesis two proteins were examined which are believed to regulate the intracellular Ca^{2+} homeostasis. The 32 kDa triadin isoform (Trisk 32) was proposed to regulate the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R) and the Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR), while the transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) is connected to the entry of the extracellular Ca^{2+} via store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) mechanism.

To date four isoforms of triadins have been identified in rat skeletal muscle. While the function of the 95 kDa isoform in excitation-contraction coupling has been studied in detail, the role of the 32 kDa isoform (Trisk 32) remains elusive. Here Trisk 32 overexpression was carried out by stable transfection in L6.G8 myoblasts. Co-localization of Trisk 32 and IP_3Rs was demonstrated by immunocytochemistry and their association was shown by co-immunoprecipitation. Functional effects of Trisk 32 on IP_3 -mediated Ca^{2+} release were assessed by measuring changes in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) following the stimulation by bradykinin or vasopressin. The amplitude of the Ca^{2+} transients evoked by 20 μM bradykinin was significantly higher in Trisk 32-overexpressing as compared to control cells. The difference remained significant in the absence of extracellular Ca^{2+} . Similar observations were made when 0.1 μM vasopressin was used to initiate Ca^{2+} release. These results suggest that Trisk 32 does not regulate directly these membrane receptors. When IP_3Rs were directly activated by thimerosal, similar Ca^{2+} transients were observed in control and transfected cells. It could mean that the Trisk 32 overexpression did not alter the conductance of the channels, and it can also mean that – because thimerosal activates only the $\text{IP}_3\text{R-I}$ subtype – Trisk 32 does not enhance the activity of $\text{IP}_3\text{R-I}$, only $\text{IP}_3\text{R-III}$. Possible involvement of the ryanodine receptors (RyR) in these processes was excluded, after functional and biochemical experiments. Furthermore, Trisk 32 overexpression had no effect on SOCE, despite a decrease in the expression of stromal interaction molecule 1 (STIM1). These results suggest that neither the increased activity of RyR, nor the amplification of SOCE are responsible for the differences observed in bradykinin- or vasopressin-evoked Ca^{2+} transients, rather, they were due to the enhanced activity of IP_3R . Thus Trisk 32 not only co-localizes with, but directly contributes to the regulation of Ca^{2+} release via IP_3R .

When the endoplasmic reticulum (ER) calcium store is depleted, a Ca^{2+} influx is activated from the extracellular milieu to refill these stores. This Ca^{2+} uptake mechanism

depends on the cooperation of several proteins as STIM1, Orai1, and, possibly, TRPC1. While STIM1 as the calcium sensor of the ER and Orai1 as the Ca^{2+} influx channel have been established, the function of TRPC1 as, or part of the store-operated channel remains elusive. Here TRPC1 was overexpressed in C2C12 mouse skeletal muscle cells and SOCE was studied by measuring the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evoked by the re-addition of 1.8 mM Ca^{2+} to the extracellular solution following sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)-inhibition. TRPC1 overexpression significantly increased both the amplitude and the maximal rate-of-rise of SOCE. When YM-58483, the antagonist of TRPC1 was used, these differences were eliminated, moreover, SOCE was slightly but not significantly suppressed, suggesting the downregulation of the STIM1-Orai1 system. A decrease in the expression of STIM1 together with the downregulation of SERCA was confirmed by Western-blot. As a consequence, a reduction in maximal Ca^{2+} uptake rate and a higher resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ following the Ca^{2+} transients evoked by 120 mM KCl were detected. Morphological changes also accompanied the overexpression of TRPC1. Differentiation of the myoblasts started later, and the myotubes were thinner in TRPC1-overexpressing cultures. For these changes the observed decrease in the nuclear expression of nuclear factor of activated T-cells 1 (NFAT1) could be responsible. Our results suggest that enhancing the expression level of TRPC1 increases SOCE and has a negative effect on the STIM1-Orai1 system, indicating an interaction between these proteins.

Irodalomjegyzék

- Alicia S, Angélica Z, Carlos S, Alfonso S, Vaca L (2008): STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. *Cell Calcium* **44**, 479-491.
- Allard B, Couchoux H, Pouvreau S, Jacquemond V (2006): Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and depletion fail to affect sarcolemmal ion channel activity in mouse skeletal muscle. *J Physiol* **575**, 69-81.
- Almassy J, Sztretye M, Lukacs B, Dienes B, Szabo L, Szentesi P, Vassort G, Csernoch L, Jona I (2008): Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* **457**, 171-183.
- Ambudkar IS, Ong HL, Liu X, Bandyopadhyay BC, Cheng KT (2007): TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium* **42**, 213-223.
- Becker EB, Oliver PL, Glitsch MD, Banks GT, Achilli F, Hardy A, Nolan PM, Fisher EM, Davies KE (2009): A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 6706-6711.
- Beech DJ (2005): TRPC1: store-operated channel and more. *Pflugers Arch* **451**, 53-60.
- Beech DJ, Xu SZ, McHugh D, Flemming R (2003): TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium* **33**, 433-440.
- Berbey C, Allard B (2009): Electrically silent divalent cation entries in resting and active voltage-controlled muscle fibers. *Biophys J* **96**, 2648-2657.
- Berbey C, Weiss N, Legrand C, Allard B (2009): Transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) operates as a sarcoplasmic reticulum calcium leak channel in skeletal muscle. *J Biol Chem* **284**, 36387-36394.
- Berridge MJ (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-529.
- Berridge MJ, Irvine RF (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321.
- Bezprozvanny I, Ehrlich BE (1994): Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP3)-gated Ca channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J Gen Physiol* **104**, 821-856.
- Billups D, Billups B, Challiss RA, Nahorski SR (2006): Modulation of Gq-protein-coupled inositol trisphosphate and Ca^{2+} signaling by the membrane potential. *J Neurosci* **26**, 9983-9995.
- Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney JW Jr (2008): Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods* **46**, 204-212.

- Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983): Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* **32**, 1171-1180.
- Blondel O, Takeda J, Janssen H, Seino S, Bell GI (1993): Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP₃R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J Biol Chem* **268**, 11356-11363.
- Brandt NR, Caswell AH, Wen SR, Talvenheimo JA (1990): Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J Membr Biol* **113**, 237-251.
- Bultynck G, Szlufcik K, Kasri NN, Assefa Z, Callewaert G, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H (2004): Thimerosal stimulates Ca²⁺ flux through inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1, but not type 3, via modulation of an isoform-specific Ca²⁺-dependent intramolecular interaction. *Biochem J* **381**, 87-96.
- Cheng KT, Liu X, Ong HL, Ambudkar IS (2008): Functional requirement for Orail in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *J Biol Chem* **283**, 12935-12940.
- Chopra N, Yang T, Asghari P, Moore ED, Huke S, Akin B, Cattolica RA, Perez CF, Hlaing T, Knollmann-Ritschel BE, Jones LR, Pessah IN, Allen PD, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC (2009): Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 7636-7641.
- Clapham DE (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524.
- Cooke R (1997): Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol Rev* **77**, 671-697.
- Cosens DJ, Manning A (1969): Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285-287.
- Crabtree GR, Olson EN (2002): NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-79.
- Damjanovich S, Mátyus L (szerk.) (2000): Orvosi biofizika. Medicina Könyvkiadó RT., Budapest
- Davies KE, Nowak KJ (2006): Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 762-773.
- De Smedt H, Missiaen L, Parys JB, Henning RH, Sienaert I, Vanlingen S, Gijssens A, Himpens B, Casteels R (1997): Isoform diversity of the inositol trisphosphate receptor in cell types of mouse origin. *Biochem J* **322**, 575-583.
- De Smedt H, Parys JB, Himpens B, Missiaen L, Borghgraef R (1991): Changes in the mechanism of Ca²⁺ mobilization during the differentiation of BC3H1 muscle cells. *Biochem J* **273**, 219-223

De Smet P, Parys JB, Callewaert G, Weidema AF, Hill E, De Smedt H, Erneux C, Sorrentino V, Missiaen L (1999): Xestospongins C are equally potent inhibitors of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pumps. *Cell Calcium* **26**, 9-13.

DeHaven WI, Jones BF, Petranka JG, Smyth JT, Tomita T, Bird GS, Putney JW Jr (2009): TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1. *J Physiol* **587**, 2275-2298.

DeHaven WI, Smyth JT, Boyles RR, Bird GS, Putney JW Jr (2008): Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry. *J Biol Chem* **283**, 19265-19273.

Denys A, Aires V, Hichami A, Khan NA (2004): Thapsigargin-stimulated MAP kinase phosphorylation via CRAC channels and PLD activation: inhibitory action of docosahexaenoic acid. *FEBS Lett* **564**, 177-182.

Dirksen RT (2009): Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca^{2+} entry in skeletal muscle. *J Physiol* **587**, 3139-3147.

Dobrosi N, Tóth BI, Nagy G, Dózsa A, Géczy T, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R, Kovács L, Bíró T (2008): Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J* **22**, 3685-3695.

Elferink JG (1999) Thimerosal: a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen Pharmacol* **33**, 1-6.

Endo M (2006): Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling. *J Pharmacol Sci* **100**, 519-524.

Feske S (2007): Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* **7**, 690-702.

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A (2006): A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179-185.

Figuerola CD, Dietze G, Müller-Esterl W (1996): Immunolocalization of bradykinin B2 receptors on skeletal muscle cells. *Diabetes* **45 Suppl 1**, S24-28.

Fodor J, Gönczi M, Sztretye M, Dienes B, Oláh T, Szabó L, Csoma E, Szentesi P, Szigeti GP, Marty I, Csernoch L (2008): Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} signals in skeletal muscle cells in culture. *J Physiol* **586**, 5803-5818.

Fonyó A (szerk.) (1999): Az orvosi élettan tankönyve. Második, átdolgozott kiadás. Medicina Könyvkiadó RT., Budapest

Formigli L, Sassoli C, Squecco R, Bini F, Martinesi M, Chellini F, Luciani G, Sbrana F, Zecchi-Orlandini S, Francini F, Meacci E (2009): Regulation of transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblasts and its relevance for a role of mechanotransduction in skeletal muscle differentiation. *J Cell Science* **122**, 1322-1333.

- Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO (2007): Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol Rev* **87**, 593-658.
- Franzini-Armstrong C, Protasi F (1997): Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev* **77**, 699-729.
- Gervasio OL, Whitehead NP, Yeung EW, Phillips WD, Allen DG (2008): TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Sci* **121**, 2246-2255.
- Green DR, Reed JC (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- Guo W, Jorgensen AO, Jones LR, Campbell KP (1996): Biochemical characterization and molecular cloning of cardiac triadin. *J Biol Chem* **271**, 458-465.
- Gutierrez-Martin Y, Martin-Romero FJ, Henao F (2005): Store-operated calcium entry in differentiated C2C12 skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1711**, 33-40.
- Gwack Y, Srikanth S, Oh-Hora M, Hogan PG, Lamperti ED, Yamashita M, Gelinas C, Neems DS, Sasaki Y, Feske S, Prakriya M, Rajewsky K, Rao A (2008): Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Mol Cell Biol* **28**, 5209-5222.
- He LP, Hewavitharana T, Soboloff J, Spassova MA, Gill DL (2005): A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem* **280**, 10997-11006.
- Hogan PG, Rao A (2007): Dissecting ICRAC, a store-operated calcium current. *Trends Biochem Sci* **32**, 235-245.
- Hong CS, Ji JH, Kim JP, Jung DH, Kim DH (2001): Molecular cloning and characterization of mouse cardiac triadin isoforms. *Gene* **278**, 193-199.
- Horsley V, Friday BB, Matteson S, Kegley KM, Gephart J, Pavlath GK (2001): Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. *J Cell Biol* **153**, 329-338.
- Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF (2006): STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I_{crac} and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* **8**, 1003-1010.
- Jaimovich E, Reyes R, Liberona JL, Powell JA (2000): IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated $\text{Ca}(2+)$ signals in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C998-C1010.
- Kim KC, Caswell AH, Talvenheimo JA, Brandt NR (1990): Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry* **29**, 9281-9289.

Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi YM, Reinke U, Schmitz W, Jones LR (2001): Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem* **276**, 4142-4149.

Kobayashi YM, Jones LR (1999): Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem* **274**, 28660-28668.

Kunert-Keil C, Bisping F, Krüger J, Brinkmeier H (2006): Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* **7**, 159.

Kurebayashi N, Ogawa Y (2001): Depletion of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca^{2+} entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* **533**, 185-199.

Launikonis BS, Ríos E (2007): Store-operated Ca^{2+} entry during intracellular Ca^{2+} release in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* **583**, 81-97.

Launikonis BS, Stephenson DG, Friedrich O (2009): Rapid Ca^{2+} flux through the transverse tubular membrane, activated by individual action potentials in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* **587**, 2299-2312.

Lee KP, Yuan JP, Hong JH, So I, Worley PF, Muallem S (2010): An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. *FEBS Lett* **584**, 2022-2027.

Leung FP, Yung LM, Yao X, Laher I, Huang Y (2008): Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* **153**, 846-857.

Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL, Birnbaumer L (2008): Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/ I_{crac} channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 2895-2900.

Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T (2005): STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol* **15**, 1235-1241.

Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC, Pani B, Dietrich A, Paria BC, Swaim WD, Beech D, Yildirim E, Singh BB, Birnbaumer L, Ambudkar IS (2007): Attenuation of store-operated Ca^{2+} current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 17542-17547.

Louis M, Zanou N, Van Schoor M, Gailly P (2008): TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *Journal of Cell Science* **121**, 3951-3959.

Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP (2005): TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* **7**, 179-185.

Marty I (2004): Triadin: a multi-protein family for which purpose? *Cell Mol Life Sci* **61**, 1850-1853.

Marty I, Fauré J, Fourest-Lieuvin A, Vassilopoulos S, Oddoux S, Brocard J (2009): Triadin: what possible function 20 years later? *J Physiol* **587**, 3117-3121.

Marty I, Robert M, Villaz M, Lai Y, De Jongh KS, Catterall WA, Ronjat M (1994): Biochemical Evidence for a complex involving Dihydropyridine Receptor and Ryanodine Receptor in Triad Junctions of Skeletal Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2270-2274.

Marty I, Thevenon D, Scotto C, Groh S, Sainnier S, Robert M, Grunwald D, Villaz M (2000): Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J Biol Chem* **275**, 8206-8212.

Miyata T, Taguchi T, Uehara M, Isami S, Kishikawa H, Kaneko K, Araki E, Shichiri M (1998): Bradykinin potentiates insulin-stimulated glucose uptake and enhances insulin signal through the bradykinin B2 receptor in dog skeletal muscle and rat L6 myoblasts. *Eur J Endocrinol* **138**, 344-352.

Mori Y, Wakamori M, Miyakawa T, Hermosura M, Hara Y, Nishida M, Hirose K, Mizushima A, Kurosaki M, Mori E, Gotoh K, Okada T, Fleig A, Penner R, Iino M, Kurosaki T (2002): Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca(2+) entry and Ca(2+) release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J Exp Med* **195**, 673-681.

Naro F, Donchenko V, Minotti S, Zolla L, Molinaro M, Adamo S (1997): Role of phospholipase C and D signalling pathways in vasopressin-dependent myogenic differentiation. *J Cell Physiol* **171**, 34-42

Neer EJ (1995): Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257.

Oddoux S, Brocard J, Schweitzer A, Szentesi P, Giannesini B, Brocard J, Fauré J, Pernet-Gallay K, Bendahan D, Lunardi J, Csernoch L, Marty I (2009): Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem* **284**, 34918-34929.

Oh M, Dey A, Gerard RD, Hill JA, Rothermel BA (2010): The CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBPbeta) cooperates with NFAT to control expression of the calcineurin regulatory protein RCAN1-4. *J Biol Chem* **285**, 16623-16631.

Oh-hora M (2009): Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunol Rev* **231**, 210-224.

Oh-hora M, Rao A (2009): The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* **11**, 612-619.

Oka T, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H (2002): Xestospongins C, a novel blocker of IP₃ receptor, attenuates the increase in cytosolic calcium level and degranulation that is induced by antigen in RBL-2H3 mast cells. *Br J Pharmacol* **135**, 1959-1966.

Olivera JF, Pizarro G (2010): Two inhibitors of store operated Ca²⁺ entry suppress excitation contraction coupling in frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **31**, 127-139.

Ong HL, Cheng KT, Liu X, Bandyopadhyay BC, Paria BC, Soboloff J, Pani B, Gwack Y, Srikanth S, Singh BB, Gill DL, Ambudkar IS (2007): Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem* **282**, 9105-9116.

- Parekh AB, Putney JW Jr (2005): Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**, 757-810.
- Pavlati GK, Horsley V (2003): Cell fusion in skeletal muscle - central role of NFATC2 in regulating muscle cell size. *Cell Cycle* **2**, 420-423.
- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005): TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**, 233-252.
- Peinelt C, Lis A, Beck A, Fleig A, Penner R (2008): 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *J Physiol* **586**, 3061-3073.
- Peng M, Fan H, Kirley TL, Caswell AH, Schwartz A (1994): Structural diversity of triadin in skeletal muscle and evidence of its existence in heart. *FEBS Lett* **348**, 17-20.
- Petersen CC, Berridge MJ, Borgese MF, Bennett DL (1995): Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem J* **311**, 41-44.
- Pocsai K, Kosztka L, Bakondi G, Gönczi M, Fodor J, Dienes B, Szentesi P, Kovács I, Feniger-Barish R, Kopf E, Zharhary D, Szucs G, Csernoch L, Rusznák Z (2006): Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific immunopositivity in both tissue sections and cell culture. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2364-2376.
- Powell JA, Carrasco MA, Adams DS, Drouet B, Rios J, Müller M, Estrada M, Jaimovich E (2001): IP₃ receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca²⁺ signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* **114**, 3673-3683.
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* **74**, 595-636.
- Putney JW Jr (1986): A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1-12.
- Qin H, Kent P, Isales CM, Parker PM, Wilson MV, Bollag WB (2009): The role of calcium influx pathways in phospholipase D activation in bovine adrenal glomerulosa cells. *J Endocrinol* **202**, 77-86.
- Rabito SF, Minshall RD, Nakamura F, Wang LX (1996): Bradykinin B2 receptors on skeletal muscle are coupled to inositol 1,4,5-trisphosphate formation. *Diabetes* **45 Suppl 1**, S29-33.
- Rezgui SS, Vassilopoulos S, Brocard J, Platel JC, Bouron A, Arnoult C, Oddoux S, Garcia L, De Waard M, Marty I (2005): Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J Biol Chem* **280**, 39302-39308.
- Riccio A, Medhurst AD, Mattei C, Kelsell RE, Calver AR, Randall AD, Benham CD, Pangalos MN (2002): mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* **109**, 95-104.
- Röhlich P (szerk.) (2006): Szövettan. Semmelweis Kiadó, Budapest

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA (2005): STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol* **169**, 435-445.

Rosenberg P, Hawkins A, Stiber J, Shelton JM, Hutcheson K, Bassel-Duby R, Shin DM, Yan Z, Williams RS (2004): TRPC3 channels confer cellular memory of recent neuromuscular activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 9387-9392.

Royer L, Ríos E (2009): Deconstructing calsequestrin. Complex buffering in the calcium store of skeletal muscle. *J Physiol* **587**, 3101-3111.

Salido GM, Sage SO, Rosado JA (2009): TRPC channels and store-operated Ca^{2+} entry. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 223-230.

Schneider MF (1994): Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol* **56**, 463-484.

Schuhmeier RP, Dietze B, Ursu D, Lehmann-Horn F, Melzer W (2003): Voltage-activated calcium signals in myotubes loaded with high concentrations of EGTA. *Biophys J* **84**, 1065-1078.

Smyth JT, Dehaven WI, Jones BF, Mercer JC, Trebak M, Vazquez G, Putney JW Jr (2006): Emerging perspectives in store-operated Ca^{2+} entry: roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1147-1160.

Sorrentino V (2011): Sarcoplasmic reticulum: structural determinants and protein dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 1075-1078.

Stehno-Bittel L, Lückhoff A, Clapham DE (1995): Calcium release from the nucleus by InsP_3 receptor channels. *Neuron*. **14**, 163-167.

Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V, Ward CC, Seth M, Finch E, Malouf N, Williams RS, Eu JP, Rosenberg P (2008a): STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* **10**, 688-697.

Stiber JA, Tabatabaei N, Hawkins AF, Hawke T, Worley PF, Williams RS, Rosenberg P (2005): Homer modulates NFAT-dependent signaling during muscle differentiation. *Dev Biol* **287**, 213-224.

Stiber JA, Zhang ZS, Burch J, Eu JP, Zhang S, Truskey GA, Seth M, Yamaguchi N, Meissner G, Shah R, Worley PF, Williams RS, Rosenberg PB (2008b): Mice lacking Homer 1 exhibit a skeletal myopathy characterized by abnormal transient receptor potential channel activity. *Mol Cell Biol* **28**, 2637-2647.

Szabó G (szerk.) (2004): Sejtbiológia. Medicina Könyvkiadó RT., Budapest.

Szappanos H, Cseri J, Deli T, Kovács L, Csernoch L (2004): Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *J Biochem Biophys Methods* **59**, 89-101

Szentesi P, Szappanos H, Szegedi C, Gönczi M, Jona I, Cseri J, Kovács L, Csernoch L (2004): Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle. *Biophys J* **86**, 1436–1453.

Sztretye M, Deli T, Szentesi P, Szigeti G, Csernoch L (2007): Effect of TPEN on the calcium release of cultured C2C12 mouse myotubes. *J Muscle Res Cell Motil* **28**, 421-428.

Teti A, Naro F, Molinaro M, Adamo S (1993): Transduction of arginine vasopressin signal in skeletal myogenic cells. *Am J Physiol* **265**, C113-121

Thorn P, Brady P, Llopis J, Gallacher DV, Petersen OH (1992): Cytosolic Ca^{2+} spikes evoked by the thiol reagent thimerosal in both intact and internally perfused single pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* **422**, 173-178.

Tóth BI, Géczy T, Griger Z, Dózsa A, Seltsmann H, Kovács L, Nagy L, Zouboulis CC, Paus R, Bíró T (2009): Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol* **129**, 329-339.

Treves S, Vukcevic M, Maj M, Thurnheer R, Mosca B, Zorzato F (2009): Minor sarcoplasmic reticulum membrane components that modulate excitation-contraction coupling in striated muscles. *J Physiol* **587**, 3071-3079.

Valdés JA, Gaggero E, Hidalgo J, Leal N, Jaimovich E, Carrasco MA (2008): NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**, C715-725.

Vandebrouck A, Sabourin J, Rivet J, Balghi H, Seville S, Kitzis A, Raymond G, Cognard C, Bourmeyster N, Constantin B (2007): Regulation of capacitative calcium entries by $\alpha 1$ -syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of $\alpha 1$ -syntrophin. *FASEB J* **21**, 608-617.

Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, Debaix H, Gailly P (2002): Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* **158**, 1089-1096.

Vanlingen S, Sipma H, De Smet P, Callewaert G, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB (2001): Modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate binding to the various inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by thimerosal and cyclic ADP-ribose. *Biochem Pharmacol* **61**, 803-809.

Varga-Szabo D, Authi KS, Braun A, Bender M, Ambily A, Hassock SR, Gudermann T, Dietrich A, Nieswandt B (2008): Store-operated Ca^{2+} entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch* **457**, 377-387.

Várnai P, Hunyady L, Balla T (2009): STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 118-128.

Vassilopoulos S, Brocard J, Garcia L, Marty I, Bouron A (2007): Retrograde regulation of store-operated calcium channels by the ryanodine receptor-associated protein triadin 95 in rat skeletal myotubes. *Cell Calcium* **41**, 179-185.

Vassilopoulos S, Thevenon D, Rezgui SS, Brocard J, Chapel A, Lacampagne A, Lunardi J, Dewaard M, Marty I (2005): Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **280**, 28601-28609.

Vermassen E, Parys JB, Mauger JP (2004): Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell* **96**, 3-17.

Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP (2006): CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science* **312**, 1220-1223.

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995): TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9652-9656.

Williams IA, Allen DG (2007): The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H1969-1977.

Worley PF, Zeng W, Huang GN, Yuan JP, Kim JY, Lee MG, Muallem S (2007): TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium* **42**, 205-211.

Yaffe D (1968): Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **61**, 477-483.

Yaffe D, Saxel O (1977): Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725-727.

Yoshida Y, Imai S (1997): Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn J Pharmacol* **74**, 125-137.

Yoshino T, Ishikawa J, Ohga K, Morokata T, Takezawa R, Morio H, Okada Y, Honda K, Yamada T (2006): YM-58483, a selective CRAC channel inhibitor, prevents antigen-induced airway eosinophilia and late phase asthmatic responses via Th2 cytokine inhibition in animal models. *Eur J Pharmacol* **560**, 225-233.

Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S (2007): STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat. Cell Biol* **9**, 636-645.

Zanou N, Shapovalov G, Louis M, Tajeddine N, Gallo C, Van Schoor M, Anguish I, Cao ML, Schakman O, Dietrich A, Lebacqz J, Ruegg U, Roulet E, Birnbaumer L, Gailly P (2009): Role of TRPC1 channel in skeletal muscle function. *Am J Physiol* **298**, C149-C162.

Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, Muallem S (2008): STIM1 gates TRPC channels, but not Orail, by electrostatic interaction. *Mol Cell* **32**, 439-448.

Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD (2006): Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 9357-9362.

Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD (2005): STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* **437**, 902-905.

Zhao X, Weisleder N, Thornton A, Oppong Y, Campbell R, Ma J, Brotto M (2008): Compromised store-operated Ca^{2+} entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell* **7**, 561-568.

Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M (2004): Potent inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem* **279**, 12427-12437.

Közlemények listája



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /7/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Oláh Tamás

Neptun kód: AG9SAN

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Oláh, T.**, Fodor, J., Oddoux, S., Ruzsnavszky, O., Marty, I., Csernoch, L.: Trisk 32 regulates IP3 receptors in rat skeletal myoblasts.
Pflugers Arch. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-011-1001-y>
IF:3.354 (2010)
2. **Oláh, T.**, Fodor, J., Ruzsnavszky, O., Vincze, J., Berbey, C., Allard, B., Csernoch, L.: Overexpression of transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) alters both store operated calcium entry and depolarization-evoked calcium signals in C2C12 cells.
Cell Calcium. 49 (6), 415-425, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.012>
IF:3.553 (2010)



További Közlemények

3. Varga, Z., Juhász, T., Matta, C., Fodor, J., Katona, É., Bartók, Á., **Oláh, T.**, Sebe, A., Csernoch, L., Panyi, G., Zákány, R.: Switch of voltage-gated k channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic ca-oscillations and cartilage formation.
PloS One. 6 (11), e27957, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027957>
IF:4.411 (2010)
4. **Oláh, T.**, Fodor, J., Ruzsnavszky, O., Berbey, C., Allard, B., Csernoch, L.: The Alterations of Store-Operated Calcium Entry in TRPC1-Overexpressing C2C12 Myotubes.
Biophys. J. 98 (3 Suppl. 1), 152a-153a, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.820>
5. Fodor, J., Matta, C., Juhász, T., **Oláh, T.**, Gönczi, M., Szíjgyártó, Z., Gergely, P., Csernoch, L., Zákány, R.: Ionotropic purinergic receptor P2X4 is involved in the regulation of chondrogenesis in chicken micromass cell cultures.
Cell Calcium. 45 (5), 421-430, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2009.02.004>
IF:4.288
6. Fodor, J., Gönczi, M., Sztretye, M., Dienes, B., **Oláh, T.**, Szabó, L., Csoma, E., Szentesi, P., Szigeti, G.P., Marty, I., Csernoch, L.: Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca²⁺ release events and global Ca²⁺ signals in skeletal muscle cells in culture.
J. Physiol. 586 (23), 5803-5818, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160457>
IF:4.649

Összesített impakt faktor: 20.255

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 6.907

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.01.10

Előadások, poszterek listája

Idézhető, angol nyelvű absztraktok

Oláh T, Fodor J, Ruzsnavszky O, Berbey C, Allard B, Csernoch L: The Alterations of Store-Operated Calcium Entry in TRPC1-Overexpressing C2C12 Myotubes. Biophysical Journal Volume 98, Issue 3, Supplement 1, January 2010, Pages 152a-153a. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.820

Angol nyelvű előadások

Oláh T: Trisk 32 regulates IP₃ receptors in rat skeletal myoblasts. PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine. Debrecen, 2011.

Fodor J, **Oláh T**, Ruzsnavszky O, Oddoux S, Szentesi P, Marty I, Csernoch L: Role of Trisk 32, the 32 kDa triadin isoform, in the calcium homeostasis of skeletal muscle. XXXIX European Muscle Conference (EMC). Padova, Olaszország, 2010.

Oláh T: The alterations of store-operated calcium entry in TRPC1-overexpressing C2C12 myotubes. PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine. Debrecen, 2010.

Magyar nyelvű előadások

Varga Z, Juhász T, Matta C, Fodor J, Katona É, Bartók Á, **Oláh T**, Sebe A, Csernoch L, Panyi G, Zákány R: Feszültségfüggő K⁺ csatornák expressziójának változása differenciálódó kondrogenikus sejtek plazmamembránjában. A Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, a Magyar Anatómus Társaság XVI. Kongresszusa, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciója és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös tudományos konferenciája (FAMÉ). Pécs, 2011.

Matta C, Takács R, Juhász T, Papp Á, Engler M, Katona É, Fodor J, **Oláh T**, Csernoch L, Gergely P, Zákány R: A primer high density porcosodó kultúrák sejtjeinek differenciációját nagyfrekvenciájú Ca²⁺-oszillációk kísérik. A Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, a Magyar Anatómus Társaság XVI. Kongresszusa, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciója és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös tudományos konferenciája (FAMÉ). Pécs, 2011.

Oláh T: A Trisk 32 fehérje szabályozó hatása az IP₃ receptoron keresztül történő Ca²⁺-felszabadulásra patkány eredetű L6 myoblastokon. Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola szimpóziuma. Debrecen, 2009.

Angol nyelvű posztterek

Oláh T, Fodor J, Ruzsnavszky O, Berbey C, Allard B, Csernoch L: The alterations of store-operated calcium entry in TRPC1-overexpressing C2C12 myotubes. Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA, 2010.

Magyar nyelvű posztterek

Bodnár D, Ruzsnavszky O, **Oláh T**, Mosca B, Fodor J, Dienes B, Zorzato F, Szentesi P, Csernoch L: Egy újonnan izolált izomeredetű fehérje in vitro és in vivo overexpresszióját követő lokalizációs vizsgálatok. A Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, a Magyar Anatómus Társaság XVI. Kongresszusa, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciója és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös tudományos konferenciája (FAMÉ). Pécs, 2011.

Katona É, Juhász T, Matta C, Somogyi C, Fodor J, **Oláh T**, Bartók Á, Varga Z, Panyi G, Csernoch L, Zákány R: Differenciálódó kondrociták feszültségfüggő K^+ csatornái. A Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, a Magyar Anatómus Társaság XVI. Kongresszusa, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciója és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös tudományos konferenciája (FAMÉ). Pécs, 2011.

Papp Á, Matta C, Takács R, Juhász T, Engler M, Katona É, Fodor J, **Oláh T**, Csernoch L, Gergely P, Zákány R: A porcképződést kísérő nagyfrekvenciájú Ca^{2+} oszcillációkat feszültségfüggő kationcsatornák szabályozzák. A Magyar Élettani Társaság LXXV. Vándorgyűlése, a Magyar Anatómus Társaság XVI. Kongresszusa, a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Experimentális Szekciója és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös tudományos konferenciája (FAMÉ). Pécs, 2011.

Oláh T, Fodor J, Juhász T, Matta C, Szentesiné Holló K, Pál B, Kőszeghy Á, Zákány R, Gergely P, Csernoch L: NMDA receptorok szerepe a primer porcdifferenciálódásban. A Magyar Élettani Társaság LXXIV. Vándorgyűlése. Szeged, 2010.

Fodor J, **Oláh T**, Matta C, Juhász T, Katona É, Varga Z, Bartók Á, Zákány R, Panyi G, Csernoch L: Feszültség függő ioncsatornák és spontán Ca^{2+} -tranziensek szerepe a primer porc differenciálódásban. A Magyar Élettani Társaság LXXIV. Vándorgyűlése. Szeged, 2010.

Matta C, Fodor J, Juhász T, Katona É, **Oláh T**, Csernoch L, Gergely P, Zákány R: Feszültségfüggő kationcsatornák szerepe a high density porcosodó kultúrák Ca^{2+} -oszcillációinak szabályozásában. 40. Membrán Transzport Konferencia. Sümeg, 2010.

Oláh T, Fodor J, Ruzsnavszky O, Tóth A, Tóth J, Marty I, Csernoch L: A Trisk 32 fehérje szabályozó hatása az IP_3 receptorokon keresztül történő Ca^{2+} -felszabadulásra patkány eredetű L6 myoblastokban. A Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése. Budapest, 2009.

- Fodor J, **Oláh T**, Berbey C, Csernoch L, Allard B: A TRPC1 overexpresszió hatása a raktár által vezérelt Ca^{2+} -belépésre C2C12 myotubulusokban. A Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése. Budapest, 2009.
- Oláh T**, Fodor J, Ruzsnavszky O, Tóth A, Marty I, Csernoch L: A Trisk 32 fehérje szabályozó hatása az IP_3 receptorokon keresztül történő Ca^{2+} -felszabadulásra patkány eredetű L6 myoblastokban. 39. Membrán Transzport Konferencia. Sümeg, 2009.
- Fodor J, Matta C, **Oláh T**, Gönczi M, Juhász T, Zákány R, Gergely P, Csernoch L: A primer porcsejtek purinerg dependens differenciálódása. A Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése. Debrecen, 2008.
- Fodor J, Matta C, **Oláh T**, Gönczi M, Juhász T, Zákány R, Gergely P, Csernoch L: A primer porcsejtek purinerg dependens differenciálódása. 38. Membrán Transzport Konferencia. Sümeg, 2008.
- Dienes B, Fodor J, Bihari J, **Oláh T**, Sztretye M, Gönczi M, Csernoch L, Szentesi P: A triadin 95 expressziójának fokozása gátolja az elektromechanikai kapcsolatot patkány primer myotubulusokban. A Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése. Pécs, 2007.

Köszönetnyilvánítás

Itt szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében, és a mögötte rejlő elméleti tudásom megszerzésében.

Köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Csernoch László professzor urat, a DE OEC Élettani Intézet igazgatóját, aki az irányítása alatt álló intézetben lehetővé tette és útmutatásával segítette munkámat.

Köszönöm a sok segítséget Dr. Fodor Jánosnak, akitől a munkámhoz szükséges elméleti és gyakorlati tudás nagy részét elsajátítottam, és akihez kérdéseimmel mindig bátran fordulhattam.

Köszönet Dr. Vargáné Kiss Ibolya, valamint Őri Róza asszisztensnőknek, akik a kísérletek elvégzéséhez szükséges kiváló technikai háttérrel biztosították.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet valamennyi dolgozójának a kísérletek során nyújtott segítségükért, és a baráti légkörért, amiben dolgozhattam, valamint külföldi és helybéli kollaborációs partnereinknek is az eredményes közös munkáért.

Köszönöm laborunk egykori TDK-hallgatóinak, Tóth Adriennek és Lamos Melindának a kísérletekben való tevékeny részvételüket.

Ezen felül köszönettel tartozom családomnak, valamint feleségemnek, Dr. Ruzsnaszky Olgának, aki a nyugodt családi háttér biztosításán kívül a disszertációm alapjául szolgáló kísérletekben is tevékenyen részt vett.

A munka a következő anyagi támogatásokkal valósulhatott meg: OTKA K75604, NK78398, ETT 186-09, K-2009-TÁMOP-4.2.2-08/1/2008-0019, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024.