

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUMHOMEOSZTÁZIS
SZABÁLYOZÁSA VÁZIZOMSEJTEKEN**

Szappanos Henrietta



Témavezető: Dr. Csernoch László

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

Bevezetés

A vázizom fejlődése

Az izomsejtek fejlődése során 3 stádium különíthető el. Az első az embrionális fázis, vagy korai differenciálódás, melynek során a differenciálatlan mezodermális sejtek miogén irányban elkötelezett sejtekké alakulnak. A myoblast ezután terminális differenciálódáson megy keresztül, melynek során működésbe lépnek az izomspecifikus fehérjéket kódoló gének és a sejt fúzió iránti készsége nő. A második szakaszban, az érési fázis ideje alatt, a fúzió után, az izomspecifikus fehérjék: aktin, miozin, troponin, tropomiozin, miokináz, kreatinfoszokináz, egyes receptorok (pl. acetilkolin receptor, AchR), sejtadhéziós molekulák szintézise fokozódik. Ekkor történik a növekedés és a speciális feladatokhoz való adaptálódás. Ez a két fázis *in vitro* reprodukálható, de külső faktorok hiányában (beidegzés, hormonhatások, az extracelluláris mátrix jelenléte) a fejlődés ezen a stádiumon nem jut túl. A harmadik fázis, a késői differenciálódás jellegzetessége az izomtípusok szerinti differenciálódás.

A myoblastok egy része az embrionális izomzatot alkotja, míg egy elkülönülő sejtvonalból stem sejt populációk, azaz szatellitasejtek alakulnak ki. A szatellita sejtek a kifejtett vázizomrostok membránja és alaphártyája között található, nem osztódó, nyugvó állapotban levő sejtek, melyek az izom sérülésekor aktiválódnak és belőlük indul meg a sérült, vagy elpusztult izomrész regenerációja. A szatellita sejtek osztódó myoblastokká alakulva ugyanazt a fejlődési, differenciálódási útvonalat járják be, mint ami az embrionális fejlődés során a magzati vázizomzat kialakulásához vezet.

A vázizom sajátosságai

Kifejtett harántcsíkolt izom membránjában feszültségfüggő gyors Na^+ - és késői típusú K^+ -csatornák, Cl^- és Ca^{2+} -csatornák, valamint különféle receptormolekulák találhatók meg. A myofilamentumok myofibrillumokba tömörülnek, melyeket egy fejlett intracelluláris membránrendszer, a sarcoplasmaticus reticulum (SR) vesz körül, amit longitudinális (L-) tubulusok alkotnak. Az L-tubulusok kiszélesedett végei a terminális ciszternák. Ezek a transzverzális (T-) tubulusok -a sarcolemma betüremkedései- közvetlen közelében helyezkednek el, és azokkal együtt alkotják a triádokat. Az SR belső membránrendszere kalciumraktárként működik, ez teszi lehetővé a Ca^{2+} -koncentráció egyidejű, gyors megemelkedését az intracelluláris térben.

Az elektromechanikai csatolás a felszíni membrán depolarizációja és a kontrakció kialakulása között végbemenő események sorozata, melynek első lépése az akciós potenciál betérése a T-tubulusokba. Itt találhatók az úgynevezett dihidropiridin- receptorok (DHPR), melyek nem funkcionáló L-típusú Ca^{2+} -csatornák és az ingerületi folyamatban feszültségérzékelő szerepet töltenek be. A Ca^{2+} -raktárként működő terminális ciszternákon rianodinreceptorok (RZR) találhatók.

Jelenlegi ismereteink szerint a harántcsíkolt izmok felépítése és működése különbözik kétéltűek és emlősök esetében. Ez egyrészt a sarcoplasmaticus reticulum morfológiai eltéréseivel, másrészt a kalciumfelszabadulásban részt vevő rianodin receptorok szerkezetének különbözőségeivel magyarázható. Kimutatták, hogy béka vázizomban kétféle RZR izoforma fordul elő, melyek kettős sorokban helyezkednek el. Az egyik közvetlen kapcsolatban áll egy, a felszíni membránban elhelyezkedő feszültségérzékes DHPR-al, a másik izoforma attól távolabb helyezkedik el, és az intracelluláris tér kalciumkoncentrációjának kismértékű megváltozására nyílik meg. Emlős vázizomban ez utóbbi izoforma nem fordul elő. A DHPR-ok, majd a RZR-ok aktiválódása kalciumfelszabadulást okoz.

Az egész sejtre kiterjedő, tranziens intracelluláris kalciumkoncentráció (továbbiakban $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$) -megemelkedés alapját képező, egy, vagy néhány RZR megnyílása által okozott kalciumfelszabadulást elemi eseménynek nevezzük Ezeknek két formája ismert. Egy nagyobb amplitúdóval jellemezhető, rövid ideig tartó esemény, a „spark”, valamint egy hosszabb ideig tartó, kisebb amplitúdójú esemény, az „ember”. A megnövekedett $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ felelős a kontrakcióért és számos sejtfolyamatért.

A purinerg jelátvitel

Az ATP neurotranszmitter szerepe már régóta ismert. Elsőként egyes nem-adrenerg, nem-kolinerg ideg (NANC) esetében mutatták ki, hogy transzmitterük az ATP. Az általuk közvetített jelátviteli folyamatot purinerg transzmisszióknak nevezték el. Később azonosították a hatásért felelős receptorokat, melyeket két csoportba soroltak hatásuk és endogén aktivátoruk szerint. Az adenzinnal aktiválható adenzin- vagy P1 purinoreceptorok adenilát-cikláshoz kapcsolnak, idegvégződések és szinapszisok preszinaptikus membránjában helyezkednek el. A másik, a P2 purinoreceptorok csoportja, ezek ATP-vel és ADP-vel aktiválhatók. Számos sejtípusban előfordulnak, így az idegsejteken is, ahol főleg a posztzinaptikus membránban találhatók és stimuláló hatásúak az ingerületáttevődési folyamatokban.

Az aminosav szekvenciájuk és jelátviteli útvonalaik szerint a P2 receptorok két csoportba sorolhatók:

1. A P2X purinoreceptorok ligandvezérelt kationcsatornák. Két transzmembrán szegmensből és egy extracelluláris hurokból állnak, a C- és az N-terminális intracellulárisan helyezkedik el.
2. P2Y purinoreceptorok: 7 transzmembrán domént tartalmaznak és olyan G-proteinekhez kapcsolódnak, melyek foszfolipáz C enzimet aktiválnak.

Az ATP hatása vázizmokon

Korábban már leírták az extracellulárisan alkalmazott ATP hatásait izomsejteken. Kimutatták, hogy az ATP acetilkolinnal együtt szabadul fel a neuromuscularis junctioban az idegvégződésekből és módosítja a szinaptikus ingerületátvitelt. Ezen kívül erőltetett izommunka, illetve szöveti sérülés alatt is felszabadulhat ATP. Egy jelenleg elfogadott elképzelés szerint az extracelluláris ATP az izom differenciálódás szabályzásában vesz részt, valamint szerepe lehet egyes sarcoglycanopathiás betegségek kialakulásában.

Mind az ionotróp P2X, mind a metabotróp P2Y receptorok jelenlétét kimutatták már harántcsikolt izomsejteken. A receptorok expressziója differenciálódás-függő mintázatot mutatott, a fejlődés korai stádiumában a legtöbb altípus megjelent a sejteken, míg a későbbi, differenciáltabb fejlődési stádiumban ezek nagy része eltűnt. A P2X receptorok a teljesen differenciált izomrostokon nincsenek jelen, bár denerválás hatására expressziójuk ismét fokozódik. C2C12 egér vázizom eredetű sejtvonalon, valamint embrionális izomsejteken kimutatták a P2Y receptorok jelenlétét is. Mind a P2X, mind a P2Y receptorok aktiválódása az $[Ca^{2+}]_{ic}$ megemelkedéséhez vezet, de azt mindeddig nem sikerült megállapítani, hogy a két különböző útvonal milyen arányban vesz részt a folyamatban.

A proteinkináz C rendszer jellemzői és szerepe vázizomsejteken

A foszfatidil-inozitol útvonal P2Y receptoron keresztüli aktiválódása az $[Ca^{2+}]_{ic}$ megemelésén túl, aktiválja a proteinkináz C (PKC) enzimesalád tagjait is. A PKC rendszer elemei a szerin/threonin kinázok csoportjába tartoznak, amelyek központi szabályozó szerepet játszanak számos sejtípus működésében. Jelenleg 11 különböző izoenzimet ismerünk, amelyeket három csoportba sorolnak: a kalciummal és forbolészterekkel aktiválható „klasszikus” ($PKC\alpha$, βI , βII , és γ), a kalciumtól független „új típusú” ($PKC\delta$, ϵ , η , és θ), és az aktiválódásához sem kalciumot, sem forbolésztert nem igénylő, „atípusos” ($PKC\zeta$ és λ/ι) családokba. Külön „csoportba” tartozik a $PKC\mu$ izoenzim. Az izoenzimformák jellegzetes

eloszlási mintázatot mutatnak a különböző sejtekben, és eltérő a proliferációban illetve differenciálódásban betöltött szerepük is. Ismert az is, hogy egy adott válasz kialakítása nem csak bizonyos PKC izoformák aktiválásához kötött, hanem a különböző típusok akár antagonisztikus hatásúak is lehetnek. Ez az egyes izoenzimek eltérő szabályozó funkciójára utal.

Célkitűzések

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

Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

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

Anyagok és módszerek

Vázizomsejtek tenyésztése

Humán vázizom eredetű tenyészetek esetében az izomszövetek olyan egészséges páciensekből származtak akik ortopédiai műtéten estek át. Egér vázizom tenyészetekhez a rostokat 4-10 napos egerek hátsó végtagjából preparáltuk. Az izomszöveteket tripszinnel és kollagenázzal emésztettük, majd a kiszabadított szatellitasejteket humán minta esetében 5% főtális borjúsavót (FCS), 5% lószérumot (HS), egér vázizom esetén 10% FCS és 10% HS-t tartalmazó HAM F-12 tápoldatban tenyésztettük, 5% CO₂ tartalom mellett, 37°C-ra termosztált környezetben. A tenyésztés 3. napján áttértünk a Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ra (DMEM), mely humán izomtenyészet esetén 2% FCS-t, 2% HS-t, egér tenyészet esetében 4% lószérumot tartalmazott.

Fluoreszcenciás [Ca²⁺] mérés

A méréseket 4-10 napos egér, illetve 7-14 napos humán tenyészetek sejtjein végeztük. Az eredmények kiértékelésénél figyelembe vettük a sejtek differenciáltsági fokát, melyet a sejtben található magok számával jellemeztünk. A mérésekhez Fura-2-acetoxi-metilészter kalciumérzékeny fluoreszcens festéket használtunk. A sejtekbe juttatott festék megfelelő, 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a DeltaScanTM kettős monokromátoros berendezése biztosította. Az intracelluláris kalciumkoncentráció értékeket Grynkiewicz, Poenie és Tsien egyenlete alapján számítottuk.

A kalcium fluxus számítása

A sejt intracelluláris terébe belépő kalciumionok származhatnak egyrészt az extracelluláris térből, másrészt a belső raktárakból. Az intracelluláris térbe jutó kalciumionokat a kalciumpumpák és a kalciumkötő fehérjék távolítják el. A megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentrációt kalciumérzékeny fluoreszcens festék segítségével közvetlenül mérni tudjuk. Az anyagmegmaradás törvénye értelmében a belépő, és az eltávolított kalcium mennyisége megegyezik a mért [Ca²⁺]_{ic}-változás mértékével. A kalciumkötő fehérjék koncentrációját és kalciumkötő képességét ismertnek tételeztük fel. A kalciumpumpa transzportsebességét a depolarizációval kiváltott kalciumtranziensek leszálló szárából, matematikai modell segítségével határoztuk meg. A kalciumtranziens és a kalciumeltávolító mechanizmusok paramétereinek ismeretében ki tudtuk tehát számolni a kalcium beáramlás sebességét, azaz a fluxust (FI).

Ionáramok és membránpotenciálok mérése

Az izomsejtek ingerületi folyamatait patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében (whole-cell), szobahőmérsékleten tanulmányoztuk. Méréseink során Axopatch 200A erősítőt használtunk. A mérésekhez használt, K^+ -aszpartát alapú belső oldattal feltöltött boroszilikát mikropipetták elektromos ellenállása 3-4 M Ω között volt. A sejtek ionáramait a mérőrendszer feszültség-rögzítés (voltage-clamp) módjában rögzítettük. A sejtek elektromos ingerlését, a mintavételezést és az eredmények kiértékelését a pClamp 6.0.4 program segítségével valósítottuk meg. Az elektromos jelek mintavételezése 20-40 kHz-es gyakorisággal történt.

A sejtek membránpotenciálját a mérőrendszer áram-rögzítés (current-clamp) módjában regisztráltuk. A sejtek passzív elektromos paramétereinek meghatározásához 40 ms hosszú, -80 mV-os tartó potenciálról induló, 5 mV-os depolarizáló impulzust használtunk. A vizsgált sejtek lineáris kapacitása 100-600 pF volt. Az alkalmazott oldatok cseréjét állandó sebességű perfúziós rendszerrel oldottuk meg. Az extracellulárisan alkalmazott ATP hatásait feszültség- és áram-rögzítés módban is nyomonkövettük. Előbbi esetben a tartó potenciált -80mV-on rögzítve az ATP jelenlétében kialakuló holding áram változását, mint az ATP által kiváltott áramot (I_{ATP}) mértük. Áram-rögzítés módban az ATP hatására kialakuló membránpotenciál-változásokat, a depolarizáció mértékét vizsgáltuk.

A sejtosztódás és a differenciálódás vizsgálata

A sejteket 24 lyukú tenyésztőedényekben tenyésztettük, az oldatot minden második nap cseréltük. Az ATP-t 180 μ M koncentrációban, naponta kétszer alkalmaztuk, a tenyésztés 1. napjától a 3.-ig. Az izomsejteket és a bennük található magok számát naponta, illetve a kezelés időtartama alatt naponta kétszer számoltuk, 2 fedőlemezen, fedőlemezenként 4 látótérben. A proliferáció mértékét a proliferációs rátával írtuk le, mely az izomsejtekben levő magok számának relatív változása. A differenciálódás mértékének jellemzésére kiszámítottuk a fúziós indexet (Fi), ami a többmagvú izomsejtekben található magok arányát mutatja az összes miogén maghoz viszonyítva. Az ATP kezelés hatását 4 független kísérletsorozatban vizsgáltuk. A fúziós index időfüggését növekedési görbe illesztésével határoztuk meg.

Immuncitokémia

A tenyészeteket kalcium- és magnéziummentes foszfátpuffer oldattal átmostuk, acetonnal fixáltuk, majd Triton X-100-at és BSA-t (borjú szérum albumin) tartalmazó oldattal blokkoltuk. Ezután a sejteket egérben termeltetett dezmin ellenes antitesttel, valamint nyúlban termeltetett anti-PKC antitestekkel, illetve poliklonális purinoreceptor ellenes antitestekkel

inkubáltuk. A fedőlemezeket háromszor mostuk foszfátpufferben, majd ezt követően kecskében termeltetett, nyúl IgG ellenes, fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-konjugált antitesttel, illetve, lóban egér IgG ellen termeltetett, Texas Red-del jelölt, másodlagos antitesttel fluoreszcensen jelöltük.

A specifikus antitestekkel és fluoreszcens festékekkel jelölt sejteket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Az elemi események nyomonkövetése

Kísérleteinkhez béka, valamint patkány hátsó végtagjából származó izomrostokat használtunk. Az izomrost membránját 0,002% saponint tartalmazó oldattal permeabilizáltuk. A méréseket ezt követően, káliumszulfát, illetve kálium-glutamát alapú belső oldatban végeztük. A fluo-3 fluoreszcens festéket egy argon ion lézerrel gerjesztettük. A spontán kialakuló elemi eseményeket pásztázó lézermikroszkóp segítségével rögzítettük. A fluoreszcenciaintenzitásokat kétdimenziós pásztázás, illetve line-scan módszerrel vizsgáltuk. Az előbbin a hely, az utóbbin a hely és az idő függvényében követhető nyomon a fluoreszcenciaintenzitásban bekövetkező változás. Az eredmények feldolgozása egy, az Élettani Intézetben kifejlesztett, automatikus detektáló program segítségével történt. A program kiszámította az elemi események jellemző paramétereit, az amplitúdót ($\Delta F/F_0$), a maximális amplitúdó feléhez tartozó térbeli szélességet (FWHM), valamint időtartamot (FTHM), az esemény időbeli hosszát, a csúcs eléréséhez szükséges időt (TTP) „spark”-ok és összetett eseményeknél, illetve az átlagos amplitúdót, az időtartamot és a FWHM-et különálló „ember”-ök esetében.

Eredmények

Az ATP hatásának vizsgálata humán tenyésztett vázizomsejteken

Humán tenyésztett vázizomsejteket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az extracellulárisan adagolt ATP tranziens $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedést váltott ki, melynek amplitúdója és kinetikája eltérést mutatott az izomsejtek különböző fejlettségi állapotaiban. A tranziensek amplitúdója a több mint 5, de kevesebb, mint 10 centrális magot tartalmazó izomcsöveken volt a legnagyobb. A kiváltott kalciumtranziensek leggyakrabban monoton emelkedést mutattak, viszonylag lassú felszállási meredekséggel. A fejlődésnek ebben a stádiumában megfigyeltünk kétkomponensű válaszokat is, ahol a tranziensek egy korai gyors komponensből és egy késői, lassabb komponensből álltak. A korai komponens nem mindig követte $[Ca^{2+}]_{ic}$ csökkenés, gyakoribb volt az az eset, amikor maga a felszálló szár volt kétfázisú, tehát egy gyors, majd egy lassú emelkedés jellemezte. A kalciumtranzienseket viszonylag hosszú látencia jellemezte.

A tranziensek másik jellemzője az volt, hogy a feszültségfüggő Na^+ -csatorna-(TTX), a nikotin típusú acetilkolin receptor- (d-tubokurarin) és a feszültségfüggő L-típusú kalciumcsatorna (Verapamil) gátlószereivel szemben nem mutattak érzékenységet. A kísérleteinkben alkalmazott 20 μM d-tubokurarin, illetve 100 μM verapamil alkalmazása sem csökkentette az ATP által kiváltott kalciumtranziens amplitúdóját (22 sejt esetében).

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy külső kalcium hiányában a purinerg aktiváció hatására bekövetkezik-e $[Ca^{2+}]_{ic}$ emelkedés. Azt tapasztaltuk, hogy kalciummentes környezetben nem lehetett ATP-vel $[Ca^{2+}]_{ic}$ változást kiváltani. Tekintettel arra, hogy a külső kalciumkoncentráció visszaállítása után, az újabb ATP adagolás hatására ismét megfigyelhető volt kalciumtranziens, a jelátviteli folyamat deszenzitizációjával nem kell számolni. Ismételt ATP adagolás során az $[Ca^{2+}]_{ic}$ változás kisebb mértékű volt, mint az első alkalommal, ami vagy egy lassú, kismértékű deszenzitizálódással, vagy a kalciumfelszabadító mechanizmusok kimerülésével magyarázható.

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

A kalciumtranziensek amplitúdója és kinetikája is változott a fejlődés előrehaladtával. Myoblastokon, valamint a kevesebb, mint 5 magvú myotubulusokon a válaszok kisebbek és jellegzetesen lassúbbak voltak. Az amplitúdó a több mint 5 magot tartalmazó sejtek esetén volt a legnagyobb és gyakoriak voltak a kétfázisú tranziensek. A késői fejlődési fázisban levő, perifériás magokkal rendelkező izomrostok esetében csökkent a kiváltható válaszok amplitúdója. Eredményeinket összehasonlítottuk a 20 μM acetilkolin, illetve a 120 mM K^+ okozta depolarizáció által kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ változásokkal. Azt tapasztaltuk, hogy mind az acetilkolin, mind a depolarizáció esetében a válaszok amplitúdója a fejlődés előrehaladtával párhuzamosan nőtt, legnagyobbak a fejlett izomcsöveken mutatkoztak. Így, míg az ATP által kiváltott kalciumtranziensek korfüggése harangalakú, az acetilkolinnal, illetve a K^+ -depolarizációval kiváltott válaszok amplitúdója folyamatos növekedést mutatott. A myoblastok sem acetilkolinra, sem K^+ -ra nem reagáltak, viszont az ATP kismértékű választ kiváltott ezeken a sejteken is. Míg az agonisták iránti érzékenység bizonyítottan függött a vizsgált sejtek differenciáltságától, a nyugalmi $[Ca^{2+}]_{ic}$ szintjéről ugyanez nem mondható el, értéke közel állandó, a 81 ± 6 és 91 ± 2 nM közötti tartományban volt. Ezek a megfigyelések mutatják, hogy a humán vázizomsejtek alacsony nyugalmi $[Ca^{2+}]_{ic}$ -val rendelkeznek, mely eredmény jó egyezést mutatott a korábban leírt, izolált, illetve tenyésztett vázizomsejteken mért értékekkel.

Az ATP dózis-hatás összefüggése

Az ATP által kiváltott kalciumtranziensek koncentrációfüggését az agonista 1, és 180 μM közötti koncentrációkban történő adagolásával vizsgáltuk meg, a legnagyobb amplitúdójú választ adó, 5-10 magot tartalmazó izomsejteken. Az esetleges deszenzitizáció okozta hibák elkerülése végett analízáláskor mindig csak az adott sejten mért, az ATP első adagolásával kiváltott tranziens amplitúdóját vettük figyelembe. A növekvő koncentrációjú ATP által kiváltott $[Ca^{2+}]_{ic}$ változások amplitúdóinak átlagát ábrázoltuk a koncentráció függvényében. A pontokat Hill egyenlettel illesztve a félhatásos dózis $16,1 \pm 0,5 \mu M$ -nak, a Hill-koefficiens pedig $1,0 \pm 0,1$ -nek adódott.

ATP analógok vizsgálata

Következő kísérleteinkben különböző ATP analógok hatását vizsgáltuk. Vizsgálataink alapján az α,β -metilén-ATP és a β,γ -metilén-ATP is sokkal kevésbé volt hatásos, mint az ATP. 180 μM -os koncentrációban az α,β -metilén-ATP, a 12 vizsgált esetből 7-ben, nem okozott mérhető $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ változást. A β,γ -metilén-ATP hatásosabbnak bizonyult, a 20 vizsgált sejtből 17 sejten váltott ki kalciumtranzienseket, ám ezek amplitúdója sokkal kisebb volt, mint az ugyanazon sejten alkalmazott ATP. Egy másik purinerg agonista, a 2'3'-O-(4-benzoil)benzoil-ATP (BzATP) hatásosabb volt, mint az előzőekben alkalmazott ATP analógok, de a 180 μM BzATP által kiváltott válaszok amplitúdója így is csak átlagosan a fele volt az azonos koncentrációban alkalmazott ATP által létrehozott tranziensek amplitúdójának. α,β -metilén-ATP, valamint β,γ -metilén-ATP esetében ezek az értékek 5, illetve 21%-nak adódtak.

Egér tenyésztett vázizomsejtek

További kísérleteinket egérből származó izomtenyészetek sejtjein folytattuk. Elsőként azt vizsgáltuk, hogy van-e hatása az ATP kezelésnek egér tenyésztett izomsejteken. Humán tenyésztett vázizomsejteken tapasztalt eredményekkel összevetve azt találtuk, hogy mind az ATP, mind pedig a KCl oldattal kiváltott depolarizáció hasonló nagyságú kalciumtranzienseket vált ki egér tenyésztett izomsejteken is. Különböző korú és fejlettségű sejteken alkalmazva az ATP-t, a humán izomsejteken előbb bemutatott korfüggést tapasztaltunk, azaz a kiváltható válaszok amplitúdója az izomsejtek differenciálódásával párhuzamosan nőtt, egészen az 5-10 magvú stádiumig, aztán ismét csökkeni kezdett.

Az ATP által kiváltott kalcium fluxus

Az ATP hatásmechanizmusának jobb megértése és feltérképezése érdekében megvizsgáltuk a kalciumionok sarcoplasmába történő belépésének sebességét, azaz a fluxust, hosszú ideig tartó depolarizációval, illetve ATP adagolásával kiváltott kalciumtranziensek esetében. A depolarizációt 120 mM KCl tartalmú extracelluláris oldat alkalmazásával váltottuk ki. K-depolarizáció hatására egyfázisú, tranziens jellegű emelkedést tapasztaltunk, az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ még a KCl adagolása alatt, a depolarizáció megszűnése előtt visszatér a nyugalmi szintre. Ez a feszültségfüggő folyamatok gyors aktiválódásával, valamint inaktiválódásával magyarázható. ATP alkalmazása esetén jellegzetes kétfázisú választ figyelhettünk meg. A gyors, kezdeti emelkedést, mely nagyon hasonló a K-ionok által kiváltott fluxushoz, egy másik, fenntartott szakasz követ, mely az ATP jelenlétében végig megmaradt. A fluxus

fenntartott komponense átlagosan a csúcs 11%-ának adódott, ami $15 \pm 4 \mu\text{M/s}$ sebességű kalciumbeáramlást jelent a myoplasmatikus térbe.

Az ATP által kiváltott fluxus jellemző tulajdonságai változnak a fejlődés során

A fejlődés és differenciálódás különböző stádiumaiban levő sejteken alkalmazva az ATP-t, a kiváltott kalciumtranziensek, valamint a fluxusgörbék paramétereiben és kinetikájában jelentős különbségek voltak megfigyelhetők. Myoblastokon általában nem lehetett ATP alkalmazásával tranziens jellegű $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ változást kiváltani. A fejlődés kezdeti stádiumában levő, néhány magot tartalmazó sejteken, az ATP adagolás elején hirtelen megnő az intracelluláris kalciumkoncentráció, majd az ATP jelenlétében, alacsonyabb szinten, folyamatosan fennmarad és csak a szer kimosódása után tér vissza a nyugalmi szintre. Ez a jellegzetes változás mind a kalciumtranziensek esetében, mind a számított fluxusgörbéken megfigyelhető volt. A fejlődéssel párhuzamosan először nő a tranziensek amplitúdója, majd megváltozik az alakja is. Az 5-10 magvú izomcsövek esetében a tranzienseken, de főként a fluxusgörbéken a két fázis egyre jobban elkülönül. A fluxus korai komponense keskenyebb lett, és az őt követő fenntartott szakasztól időben is egyre jobban elválík. Differenciáltabb sejteken a két komponens teljesen elkülönül egymástól, olyannyira, hogy az első komponens lezajlása után az intracelluláris térbe történő kalciumbeáramlás teljesen megszűnik, majd csak ezután kezd el kifejlődni a második, fenntartott komponens. Az egészen nagy, sokmagvú, differenciált sejteken a kiváltható válaszok amplitúdója ismét csökken, a nagy myotubulusok és azizomrostok 25%-a nem is reagált az ATP kezelésre.

Az ATP ismételt adagolásának hatása

Ahhoz, hogy az ATP adagolásával kiváltható válaszok farmakológiai vizsgálatát el tudjuk végezni, tudnunk kellett, hogy az egyes anyagok ismételhető válaszokat váltanak-e ki tenyésztett vázizomsejteken. Ennek kiderítésére megvizsgáltuk, hogy a K^+ -depolarizációval, 5 mM koffeinnel, valamint $180 \mu\text{M}$ ATP-vel kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ emelkedés változik-e a második, illetve a harmadik adagolást követően. A koffeinnel kiváltott tranziensekből számított fluxusok az ATP által kiváltott fluxusgörbékhez hasonlóan kétkomponensűek, egy korai, tranziens emelkedést egy kisebb amplitúdójú, lassan csökkenő szakasz követ, mely a koffein adagolása alatt végig fennmarad, utána pedig gyorsan lecsökken. Az ismétlés hatására bekövetkező amplitúdóbeli csökkenés nemcsak a kalciumtranzienseken volt megfigyelhető, hanem a fluxusok esetében is, a relatív amplitúdó a második tranziens esetében átlagosan $0,88 \pm 0,12$ -nek adódott $n=7$. A csúcstérték kismértékű csökkenését valószínűleg a

sarcoplasmaticus reticulum kalciumtartalmának kismértékű csökkenése okozhatta. Ezzel szemben a depolarizációval kiváltott kalciumtranziensek amplitúdói és a fluxusgörbék csúcsai kismértékben növekedtek. Ez arra utal, hogy a depolarizáció által aktivált csatornákon keresztül beáramló kalciumionok kismértékben töltik a raktárakat is, így a következő depolarizációval nagyobb mennyiségű kalciumion lesz felszabadítható.

Ezután megvizsgáltuk az ATP-vel kiváltott kalciumtranziens ismételhetőségét. A különbség kifejezettebb a fiatal, 5-10 magot tartalmazó sejthalakokon, mint a differenciáltabb, 5-10 magvú sejteken. A differenciálódás korai szakaszában a második ATP adagolás hatására átlagosan 26 ± 8 , míg a harmadik alkalmazást követően $40 \pm 10\%$ -kal csökken a kiváltható kalciumtranziensek nagysága az első adagolás hatására kialakuló válaszhoz viszonyítva. A fluxusgörbék alakja is megváltozik, a korai, gyors, tranziens jellegű csúcs lecsökken, a változás átlagosan 35 ± 10 illetve $53 \pm 12\%$, a fenntartott komponens amplitúdója viszont alig változik (4 ± 11 és $12 \pm 9\%$). Differenciáltabb sejteken, ahol a legnagyobb az ATP-vel kiváltható $[Ca^{2+}]_{ic}$ változás, a kalciumtranziensek amplitúdója csak kismértékben csökken, a fluxusgörbék nagysága valamint alakja is csak kismértékben változik, a korai csúcs és a fenntartott szakasz amplitúdója egyaránt alig csökken.

ATP hatása az inward áramokra és a membránpotenciálra

Mint azt korábban, tenyésztett humán vázizomsejteken megállapítottuk, az ionotróp P2X receptorokon keresztül befelé irányuló áramok aktiválódnak. Ezen útvonalak deszenzitizálódása magyarázhatja a kalciumfluxusban megfigyelt csökkenést. Az általunk vizsgált 6 myotubuluson a második áramcsúcs relatív amplitúdója az első $97 \pm 12\%$ -a. A több, mint 10 centrális maggal rendelkező izomcsöveken az így kiváltható áramok jóval kisebbek. A kevésbé differenciált sejteken az ATP által kiváltott áramok 250 pA-nél nagyobbak, míg a fejlődés későbbi szakaszában levő izomcsöveken kevesebb, mint 100 pA-nek adódtak.

Ezek a sejteken ugyanakkor, áram-rögzítés módban, membránpotenciál változásokat is mértünk. Az már régóta ismert, hogy az izomsejtek membránpotenciálja változik a fejlődés előrehaladtával. Ezt méréseink is alátámasztották, fiatal sejteken a nyugalmi membránpotenciál értéke -61 ± 3 mV-nak, idősebb sejtek esetében -76 ± 3 mV-nak adódott, azaz a differenciáltabb sejthalakok nyugalmi membránpotenciálja negatívabb, hiperpolarizáltabb volt a kevesebb maggal rendelkező sejtekéhez képest. Ugyanakkor az ATP által kiváltott membránpotenciál-változás fiatal sejteken körülbelül 20 mV-os, a differenciáltabb sejthalakokon kevesebb, mint 5 mV-os volt. Az is megfigyelhető, hogy az

ATP ismételt adagolásával sem a kiváltható áramok, sem a membránpotenciál változások nagysága nem csökkent jelentősen.

A P2X receptoron keresztül megvalósuló jelátviteli folyamatok további karakterizálásához megvizsgáltuk az ATP hatására bekövekező áram feszültség- és koncentrációfüggését. Az ATP adagolásával kiváltott áramok a vizsgált tartási potenciálokon (-80 - 0 mV között) befelé irányulók voltak, ami arra utal, hogy ez egy nem specifikus kationáram, mely a P2X receptorokra jellemző, befelé egyenirányító karakterisztikával bír. Vizsgáltuk az I_{ATP} koncentrációfüggését 10 és 300 μM -os koncentrációtartományban. A méréseket olyan sejteken végeztük, melyek a legnagyobb $[\text{Ca}^{2+}]_{ic}$ változást mutatták. A dózis-hatás görbe illesztése után a félhatásos dózis (EC_{50}) $68 \pm 5 \mu\text{M}$ -nak, a Hill koefficiens pedig $1,66 \pm 0,14$ -nak adódott.

Az ATP által kiváltott fluxus függ a sejtek feszültségfüggő folyamataitól

A kevésbé differenciált, kevesebb, mint 5 maggal rendelkező sejteken általában nem lehetett K^+ -depolarizációval tranziens kalciumválaszokat előidézni. Az ATP azonban mind KCl jelenlétében, mind anélkül képes volt $[\text{Ca}^{2+}]_{ic}$ emelkedést kiváltani, bár a tranziensek kisebbek voltak a depolarizált sejteken és a felszálló szár meredeksége is kisebbnek adódott. A fluxusgörbéken még szembetűnőbbek voltak a változások, ugyanis a korai csúcs eltűnt, és a késői komponens is csökkent a depolarizált sejteken. A fejlődés későbbi szakaszában levő, 5-10 magvú sejteken a depolarizáció nagy $[\text{Ca}^{2+}]_{ic}$ emelkedést okozott, csakúgy, mint az ATP kezelés. A kisebb sejteken tapasztaltakhoz hasonlóan, a fluxus korai, gyors komponense eltűnt a depolarizált myotubulusokon, de ezeken a sejteken a fluxus fenntartott komponense kevésbé csökkent.

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

Extracelluláris kalciumionok hiányában, valamint feszültségfüggő Na^+ - és Ca^{2+} -csatorna gátlószerek (TTX és verapamil) jelenlétében, mind a K -depolarizációval, mind az

extracellulárisan alkalmazott ATP-vel kiváltható válaszok csökkentek. Az ATP alkalmazásával kiváltott fluxusok korai, gyors komponensében volt a legszembevetőbb hatás. Ezek, valamint a depolarizált sejteken tapasztalt eredmények alátámasztják azon elképzelésünket, mely szerint az ATP által kiváltott fluxus korai komponensét a depolarizáció hozza létre.

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

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a suramin, mely egy általánosan ismert és használt purinoreceptor blokkoló, képes-e befolyásolni az ATP hatására kialakuló fenntartott komponens paramétereit. Ezekhez a vizsgálatokhoz a fejlődés késői szakaszában levő izomcsöveket használtuk, mert ezeken ATP hatására csak a fenntartott komponens volt megfigyelhető. 10 és 300 μM suramin adagolásának hatására csökkent mind az ATP-vel kiváltható válaszok nagysága, a fluxus és az áram is. A suramin hatása kimosható volt. 10 μM koncentrációban a szer csak részleges csökkenést okozott a tranziensek (mintegy 32%), a fluxusok (kb. 50%) és az áramamplitúdók (45%) tekintetében, ha viszont a suramin koncentrációját 300 μM -ra növeltük, az ATP-vel nem volt kiváltható válasz. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a fluxus fenntartott komponensének kialakításáért, vagy legalábbis annak jelentős részéért a purinerg jelátviteli mechanizmus a felelős.

A különböző purinoreceptor altípusok meghatározásához immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk. A sejteket P2X és P2Y receptor ellenes antitestekkel jelöltük. Mivel a P2 receptorok megtalálhatóak a fibroblasztok membránjában is, kettős immunfestést alkalmaztunk, a tenyésztett sejteket izomspecifikus fehérje (dezmin) ellenes antitesttel is kezeltük és csak a dezmin-pozitív sejteket tekintettük izom-eredetű sejteknek. Az 5-10 magvú, tenyésztett vázizomsejteken 6 különböző P2 receptor, a P2X₁, P2X₄, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂ és a P2Y₄ volt jelen. Míg a festődés erősnek bizonyult a P2X₄, P2X₇, P2Y₁ és a P2Y₄ altípusok esetében, viszonylag gyengének mondható a P2Y₂ receptorra. A P2X₂ receptortípust egy esetben sem sikerült kimutatnunk a vizsgált sejteken. A P2Y₁ purinoreceptor esetében megfigyelhető a felszíni membránban való elhelyezkedés.

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

Korábban már leírták, hogy az ATP, P2X₅ receptorok aktiválódásán keresztül, patkányok myoblastjainak differenciálódását idézi elő. Vizsgálataink során egér vázizomból indított tenyészeinkhez 180 μ M ATP-t tartalmazó tenyésztőoldatot adtunk a tenyésztés 1.-3. napján. A sejtosztódás mértékét a proliferációs ráta, azaz a miogén eredetű sejtek számában tapasztalható relatív változás mutatja. Kontroll körülmények között a proliferációs ráta csúcsa a 2. tenyészetben eltöltött napon van, míg ATP kezelés hatására ez a csúcs kisebb és későbbre tolódott, a legnagyobb mérvű osztódás a szer eltávolítása után figyelhető meg.

A proliferáció csökkentésével egyidőben az ATP elősegítette a tenyésztett vázizomsejtek differenciálódását, amit a fúziós index változásával követtünk nyomon. A fúziós index kontroll körülmények között először lassú emelkedést mutatott, majd meredekebbé vált, amikor a myoblastok többmagvú myotubulusokká olvadtak össze. Végül a fúziós index értéke 1 közeli értéken stabilizálódott, mivel erre az időszakra közel az összes myoblast fuzionált. A fúziós index időfüggésének leírásához a pontokra növekedési görbét illesztettünk. Az illesztés után a $t_{0,5}$ (az az idő, amikor az aktuális fúziós index megegyezik a fúziós index maximális értékének felével, tehát a miogén magok fele van az izomcsövekben) $3,8 \pm 0,1$, illetve $2,9 \pm 0,1$ napnak, a k (meredekséget jellemző paraméter) értéke pedig $0,59 \pm 0,09$, valamint $0,82 \pm 0,16$ napnak adódott kontrollban, illetve az ATP kezelés hatására. Mindez azt jelzi, hogy a fúzió hamarabb következett be azokon a sejteken, amelyeket ATP tartalmú oldatban tenyésztettünk. A különböző körülmények mellett a tenyészetek jellegzetes morfológiai különbségeket is mutattak. Kontroll oldatban a 2 napos tenyészetekben a miogén sejtek főleg myoblastok formájában voltak jelen, melyek egy része szétszórta, míg mások csoportokba rendeződve helyezkedtek el. ATP jelenlétében, az azonos korú tenyészetek sejtei jellegzetesen sorokba rendeződtek, ami a sejtek fúzióját megelőző állapot.

Az ATP befolyásolja a PKC izoenzim mintázatát

A következőkben arra kerestük a választ, hogy az ATP-vel való hosszantartó kezelés milyen jelátviteli mechanizmusokat aktivál. Mivel már több sejttypuson bebizonyították, hogy a proliferáció és a differenciálódás szabályozása részben a foszfatidil-inozitol útvonalon, a proteinkináz C (PKC) izoenzimcsalád aktiválódásán keresztül hat, immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk annak megállapítására, hogy az ATP a proliferációt csökkentő és differenciálódást serkentő hatását, a PKC izoenzimeken keresztül fejt-e ki. Az ismert

izoenzimeket 2 és 5 napos tenyészetek sejtjein mutattuk ki, azért, mert az ilyen korú tenyészetek reprezentálják a legjobban az intenzív sejtosztódás, illetve a késői differenciálódás stádiumait. A klasszikus és az új típusú PKC izoenzimek közül négy, az α , β , ϵ és η festődött kontroll körülmények között a tenyésztett izomsejtekben, a másik három izoenzim sem kontrollban, sem ATP kezelés hatására nem volt kimutatható. Mind a négy izoenzim jelen volt a fejlődés korai és késői stádiumában egyaránt. A második napon ezek az izoenzimek kivétel nélkül a citoplazmában jelennek meg, nem mutatnak szubcelluláris elrendeződést. Az 5 napos tenyészetek sejtjein azonban a PKC β jellegzetes festődést mutat, a sejtmagban, pöttyözötten jelenik meg. Ugyanezt a négy izoenzimet sikerült kimutatni az ATP-vel tartósan (1.-3. tenyésztési napig) kezelt sejteken is, két szembevetendő különbséggel. A PKC α festődése sokkal gyengébb volt az ATP kezelés hatására, valamint a kontroll esetben idősebb sejteken megjelenő, PKC β izoenzimre jellemző mintázat már a kétnapos, ATP-vel kezelt sejteken megfigyelhető volt.

A kalciumfelszabadulás elemi eseményei

Az intracelluláris kalciumkoncentráció egész sejtre kiterjedő változásainak tanulmányozását követően a kalciumfelszabadulás háttérében álló folyamatokat vizsgáltuk meg. Mint ismeretes, a harántcsíktolt izmok felépítése és működése különbözik kételtűek, valamint emlősök esetében. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy míg béka izomrost esetén csak „spark”-ok, addig patkány izomrost esetében „spark”-ok és „ember”-ök is előfordultak. Ez utóbbiak vagy magányosan, vagy a „spark”-ok előtt, illetve után következtek be. A „spark”-ok jellemző paramétereit vizsgálva megállapítottuk, hogy az események amplitúdója a békákból, míg a többi vizsgált paraméter (FWHM, FTHM, valamint az időtartam) a patkányokból származó rostokon mutatott magasabb értékeket. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy emlősökön kisebb amplitúdójú, hosszabb ideig tartó elemi események, és így RYR megnyílasok figyelhetők meg. A térben azonos helyen megjelenő „spark” és „ember” TTP értékét összehasonlítva a résztvevő csatornák aránya hozzávetőleg 15-nek adódott. Ennek megfelelően, míg a „spark” kialakításában valószínűleg több tíz rianodin receptor vesz részt, addig az „ember” létrehozásáért csak néhány rianodin receptor egyidejű megnyílása lehet a felelős.

Emlős vázizmokon megfigyelhető elemi események jellemzése és farmakológiai befolyásolhatósága

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

Korábbi eredményeink szerint a timol módosítja a RYR-ok működését. Kíváncsiak voltunk tehát, hogy befolyásolja-e az elemi kalciumfelszabadulási események tulajdonságait. A timol már alacsony koncentrációban (30 μM) is módosította az elemi események megjelenését, valamint jellemző paramétereit. Míg kontroll körülmények között az elemi események előfordulási gyakorisága $0,0587 \pm 0,0020 \text{ s}^{-1} \text{ sarcomer}^{-1}$ volt, 30 μM timol alkalmazását követően ez az érték $0,0654 \pm 0,016 \text{ s}^{-1} \text{ sarcomer}^{-1}$ -re nőtt. Az elemi események megoszlása is változott a szer hatására. Kontroll esetben leggyakrabban „spark”-ok fordultak elő (az összes esemény 63%-a), kevésbé voltak gyakoriak a magányos „ember”-ök (22%), legritkábban pedig az összetett események fordultak elő. Timol jelenlétében a hosszabb és összetettebb események domináltak, a magányos „spark”-ok relatív előfordulása csökkent (az összes esemény 41%-a), az „ember”-ök gyakorisága nőtt (35%). A timol csökkentette a „spark”-ok amplitúdóját, „ember”-ök esetében az átlagos amplitúdót, a „spark”-ok FWHM értékét. A csúcs eléréséhez szükséges idő nem változott jelentősen. Ezzel szemben az összes kalciumfelszabadulási esemény időtartama jelentősen megnövekedett.

Ezután megvizsgáltuk hogy milyen hatásokat vált ki a timol magasabb koncentrációban. 150 μM timol jelenlétében „spark”-okat nem lehetett megfigyelni, viszont nagyon hosszú, gyakran több száz ms-ig is elhúzódó események jelentek meg. Ezen események jellemző értékei, az átlagos amplitúdójuk, a térbeli szélességük, nagyon hasonlított az alacsony koncentrációjú timol alkalmazásakor, a magányos „ember”-ök esetében tapasztaltakhoz.

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

Megbeszélés

Humán tenyésztett vázizomsejtek

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

Az ATP a vázizom embrionális fejlődésében csakúgy, mint a sérülések utáni regenerációs folyamatokban, valószínűleg nagyon fontos szerepet tölt be. A fejlődés korai szakaszában egyes sejtfolyamatok beindításához, illetve a génexpressziót szabályozó folyamatokhoz a másodlagos hírvivőként szereplő Ca^{2+} koncentrációjának megemelkedése elengedhetetlen. Az acetilkolin ilyen irányú szerepe ezzel szemben korlátozott, hiszen az embrionálisan fejlődő izomsejteknek kezdetben még nincs motoneuronos beidegzése, tehát a sejtekbe, bár rendelkeznek nikotin-típusú acetilkolin receptorokkal, acetilkolin hiányában nem történik Ca^{2+} -belépés. Felnőtt egyedekben a motoros végtag területén felszabaduló acetilkolin hatása lokális, mert a neuromuscularis junctionban jelen levő acetilkolin-észteráz

enzim, mely a szervezet egyik legnagyobb aktivitással rendelkező enzime, nagyon gyorsan és hatékonyan bontja a neurotranszmittet, amely így nem képes eldiffundálni a szinapszis közvetlen közeléből, így hatása a fejlődő izomsejteken nem jelentkezik.

Egér tenyésztett vázizomsejtek

Az ATP-vel kiváltható kalciumtranziensek a humán izomsejtekhez hasonló módon korfüggést mutattak. A kalciumtranziensekből számított fluxus kétfázisú, egy nagy amplitúdójú, korai fázist, melynek kinetikája a K^+ -depolarizáció által aktivált fluxushoz hasonlít, egy lassabban kialakuló, fenntartott komponens követ. Ez a kinetika az 5-10 magvú sejtek esetében már a tranzienseken is megfigyelhető volt. ATP ismételt adagolása a kalciumtranziensek amplitúdójának, valamint a fluxus gyors komponensének jelentős csökkenését okozza. A gyors komponens elsősorban a P2X receptorok aktivációjától és az azt követő depolarizációtól függ, míg a lassabb, fenntartott fluxusszakasz kialakításáért valószínűleg a P2Y receptorok felelősek.

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

A fluxust létrehozó kalciumionok eredete

A sejt intracelluláris terébe belépő kalcium származhat az extracelluláris térből, a P2X receptoron, mint ionotróp receptoron, vagy feszültségérzékeny kalciumcsatornákon keresztül, valamint felszabadulhat a belső raktárakból, főként az SR-ből, feszültség- és/vagy kalcium-indukált kalciumfelszabadulás révén.

ATP alkalmazása az 5-10 maggal rendelkező myotubulusokon nagy, befelé irányuló áramokat és ezzel egyidejűleg depolarizációt okozott. Ez a depolarizáció (20 mV) elegendő volt ahhoz, hogy akciós potenciált váltson ki a sejteken, így aktiválva a feszültségfüggő T- és L-típusú kalcium áramokat. Ezek a folyamatok magyarázhatják az ATP adást követő, nagy kalciumfluxust. Másrészt viszont a T-típusú kalcium áramok gyorsan inaktiválódnak, s még a lassabb, L-típusú áramok is teljesen megszűnnek néhány másodperc alatt. Mivel a feszültségérzékeny folyamatok inaktivációja izomrostokon kevesebb, mint 10 másodpercen belül bekövetkezik, a fluxus fenntartott komponense, mely hosszan, az ATP adagolása alatt végig megmarad, a feszültségfüggő folyamatokkal nem magyarázható. Érett izomcsövekben

ezzel szemben negatívabb a membránpotenciál, az ATP alkalmazásával kiváltható depolarizáció pedig jóval kisebb (4 mV), így az feltehetően nem elegendő a feszültségfüggő folyamatok aktiválásához. Valószínűnek tűnik tehát, hogy az ATP által kiváltott kalciumfluxus fenntartott komponenséért a szer alkalmazásának ideje alatt folyamatosan nyitott állapotban levő P2X receptorokon keresztül megvalósuló kalciumbeáramlás, vagy egy P2X receptortól független mechanizmus a felelős. Immonocitokémiai módszerrel sikerült kimutatnunk a P2X₇ receptort, melyről korábban leírták, hogy ATP aktiválás alatt, folyamatosan nyitott állapotban van, rajta keresztül konstans áram folyik. Sikerült kimutatnunk egyes P2Y receptorok jelenlétét is. Mivel kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy az ATP által kiváltott kalciumtranziensek és a belőlük számított fluxusok gátolhatók suraminnal, ami a P2Y receptorok gátlószere, ez megerősítette azon feltételezésünket, miszerint a fluxus fenntartott komponensének hozzávetőleg 80%-áért a P2Y receptorok aktivációja és így az SR-ből történő kalciumfelszabadulás a felelős.

Az ATP által kiváltott kalcium fluxus időbelisége

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

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

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

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

Purinoreceptor altípusok tenyésztett vázizomsejteken

Vázizomsejteken több P2X receptorok jelenlétét mutatták már ki, így a P2X₁, P2X₂, P2X₅ és P2X₆ altípust. Kimutattak egy embrionális fejlődéssel összefüggő expressziós mintázatot is, melynek során a P2X₅ receptor jelenik meg először, majd a P2X₆ és végül a P2X₂ altípusok. Kísérleteinkben egér primer izomtenyészetben, három P2X receptor altípust sikerült kimutatnunk a P2X₁, P2X₄ és P2X₇-t. A P2X₂ receptort nem sikerült kimutatnunk, ami összhangban áll korábbi megállapításokkal, miszerint ez az altípus csak a késői differenciálódás szakaszában jelenik meg.

A P2X₄ és P2X₇ altípusok jelenlétét vázizmokon eddig még nem írták le, csak simaizomokban. Úgy gondoljuk, hogy az eltérést a fajok, a tenyésztett és az izolált sejtek közti különbözőség okozhatta. Az általunk megfigyelt I_{ATP} kinetikája, a hosszú ideig fenmaradó, nagy amplitúdójú áram a P2X₇ receptorra jellemző. A kísérletünkben meghatároztuk a kötőhelyek számát tükröző Hill-koefficiens értékét, és az kettőhöz közeli értéknek adódott (n=1,66). Ez összhangban áll azzal a korábbi megállapítással, miszerint az ATP két helyen kötődik a receptorához.

Egérben a P2Y₁, P2Y₂ és a P2Y₄ receptorok jelen vannak az embrionális fejlődés alatt, expressziós szintjük folyamatosan változik, és a születés után mindhárom receptor altípus down-regulálódik. Immuncitokémiaileg mindhárom receptort sikerült kimutatnunk egér tenyésztett vázizomsejteken, bár a P2Y₂ receptor expresszióját alacsonynak találtuk.

PKC izoformák jelenléte proliferáló és differenciálódó myotubulusokban

Korábbi tanulmányok már számot adtak arról, hogy a PKC izoenzimeszalád számos tagja megtalálható vázizomsejtekben. Kísérleteinkben a klasszikus és új típusú izoenzimek közül a PKC α , β , ϵ , és η jelenlétét mutattuk ki.

A PKC izoformák és expressziós mintázatuk számos sejttípusban így vázizomsejtekben is kapcsolatba hozható a sejtek proliferációjával és differenciálódásával. Feltételezhető, hogy a PKC klasszikus izoformái, különösképpen a PKC α , közvetlenül részt vesz az izomsejtek proliferációjának szabályzásában. A PKC α kontroll körülmények között mind a fejlődés korai, mind késői szakaszában kimutatható volt. Az ATP kezelés hatására, a PKC α szintje

lecsökken, ezzel egyidőben a sejtosztódás üteme lelassul. A kontroll körülmények között tenyésztett, differenciált izomsejtekre jellemző a PKC β pöttyözött magfestődése. ATP kezelés hatására ez a mintázat már a két napos tenyészetek sejtjein megfigyelhető volt. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az ATP, a P2Y receptorok aktiválásával, a PI útvonalon keresztül képes befolyásolni a tenyésztett vázizomsejtek proliferációját/differenciálódását.

Kalciumfelszabadulási események timol jelenlétében

A timol 30 μ M koncentrációban növelte az elemi kalciumfelszabadulási események frekvenciáját, 0,0587-ről 0,0654- s^{-1} sarcomer $^{-1}$ -re. Ez az eredmény összhangban van az átvágott rostokon mért kalciumfelszabadulás változásával, illetve az izolált RYR megnyílási valószínűségének megnövekedésével. Továbbá az „ember”-ök relatív aránya a frekvenciánál is jobban nő. Magasabb koncentrációban a timol a legtöbb esetben egy nagymértékű kalciumfelszabadulást okoz. 150 μ M timol jelenlétében az események frekvenciája lecsökken, míg az „ember”-ök relatív előfordulása nő. A „spark”-ok és az „ember”-ök amplitúdója csökken, amit magyarázhat, hogy a timol fokozza a nyugalmi kalciumkilépést a raktárból. Az amplitúdó csökkenésével párhuzamosan nő a TTP és az események hossza.

150 μ M koncentrációban a timol hosszú események megjelenését idézi elő. Ezek állandó fluoreszcenciaértéket és egyforma térbeli kiterjedést mutatnak, ami arra utal, hogy a felszabaduló kalcium mennyisége egyensúlyt tart a diffúzióval és a kalciumionok megkötődésével. Tekintettel arra, hogy a kontroll körülmények között mért „ember”-ök átlagos amplitúdója lényegében megegyezik a timol jelenlétében rögzített hosszú események átlagos amplitúdóival, valószínűsíthető, hogy ezek az események jelentik a kalciumfelszabadulás elemi egységét. Ez azt jelenti, hogy az „ember” vagy egy csatorna nyílását-záródását, vagy több csatorna szinkronizált kapuzását jeleníti meg.

Ha az „ember” egy csatorna megnyílása által létrehozott elemi esemény, a „spark” kialakításáért 20-30 csatorna egyidejű megnyílása lehet a felelős. Ha pedig az „ember”-t több csatorna együttes megnyílása okozza, egy „spark” létrehozásában akár 100 csatorna megnyílása is részt vehet.

Összefoglalás

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

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

Az ATP adagolásával deszenzitizációt nem mutató, befelé irányuló áramot lehetett kiváltani. Az áramgörbék felszálló szára igen meredek, az áram maximumát körülbelül 300 ms alatt éri el. Az ATP hatásait nem befolyásolta a nAChR antagonistá d-tubokurarin, ami azt igazolta, hogy az ATP nem a nikotin-típusú acetilkolin receptoron keresztül hat, hanem egy ionotróp purinoreceptor aktiválódását idézi elő. A depolarizáció, a feszültségfüggő csatornák gátlása, valamint a külső kalcium eltávolítása főként az ATP alkalmazásával kiváltható fluxusok gyors komponensét csökkentette. A purinoreceptorokat gátló suramin koncentrációfüggő módon csökkentette az ATP alkalmazásával kiváltható válaszokat. Ezzel összhangban mind P2X, mind P2Y purinoreceptorok jelenlétét sikerült immuncitokémiai módszerekkel is kimutatni. Az ATP hosszantartó alkalmazása a tenyésztett vázizomsejtek proliferációját csökkentette, míg a differenciálódást elősegítette. Az ATP ezen hatása valószínűleg a PKC rendszeren keresztül, a foszfatidil-inozitol jelátviteli útvonalon keresztül valósul meg.

Kísérleteinkben sikerült meghatározni az egész sejtre kiterjedő kalciumfelszabadulások hátterében álló, elemi kalciumfelszabadulási események jellemző paramétereit emlős vázizomban. Kimutattuk, hogy a timol megváltoztatja ezeket a paramétereket, növeli az események előfordulási valószínűségét, csökkenti az amplitúdót és a térbeli kiterjedést, de az események időtartamát megnyújtja. Kis koncentrációban alkalmazva a szert az események megoszlása is megváltozik, az „ember”-ök és az összetett események gyakrabban fordulnak

elő, mint kontroll körülmények között. Nagy koncentrációban alkalmazva a timol több száz szekundum hosszú elemi kalciumfelszabadulásokat idéz elő.

Ezek az eredmények hozzájárulhatnak a vázizomsejtek kalciumhomeosztázisának jobb megismeréséhez.

A tézisek alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:

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

A tézisek alapjául szolgáló idézhető absztraktok:

1. **H. Szappanos**, P. Szentesi, L. Csernoch, L. Kovács, J. Cseri (2002): Calcium transients and purinergic activation on mouse skeletal muscle cells in primary culture. *Acta Physiologica Hungarica* **89**, 35
2. **H. Szappanos**, M. Gönczi, J. Cseri, L. Kovács, L. Csernoch (2003): Elementary calcium release events (ECRE) in the presence of thymol on mammalian skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* **24**, 359.

Egyéb *in extenso* közlemények és idézhető absztraktok:

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

Ezek összesített impact faktora: 9,69