

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

Dr. Deli Tamás

Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László



Bevezetés

A Ca^{2+} szerepe a differenciálódásban, proliferációban, apoptosisban és malignus transzformációban

A cytoplasmában megtalálható Ca^{2+} ionok a rövidtávú sejtfunkciók szabályozásán (kontraktilitás, excitózis) túl a sejt hosszútávú sorsát meghatározó folyamatok, mint a *differenciálódás* (pluri- vagy multipotens sejtek speciális funkcióra való elköteleződése és az ennek megfelelő fenotípus kialakítása), a *proliferáció* (a sejtek szaporodása), az *apoptosis* (a programozott sejthalál) és a *malignus transzformáció* (egészséges sejtek rosszindulatú daganattá való átalakulása) egyik fontos meghatározója is. Ezt a szerepét azért töltheti be, mert a sejtek olyan Ca^{2+} -kötő fehérjékkel rendelkeznek, melyek megváltoztatják a sejtműködést. Ezek a Ca^{2+} -kötő molekulák vagy nem foszforilációs változások útján hatnak (például a Ca^{2+} szenzor synaptotagmin a vezikulák excitózisában), vagy aktiválni képesek protein-kinázokat és -foszfatázokat (kaldmodulin, mely a Ca^{2+} -kaldmodulin függő protein-kinázt, illetve a calcineurint tudja aktiválni), illetve egyesek maguk kináz (protein-kináz C) aktivitásúak, és aktivitásuk a Ca^{2+} -kötő helyeik telítettségének függvényében változik. A primer célmolekulák aktivációs állapotának megváltoztatása után beindul egy foszforilációs/defoszforilációs kaszkád, mely végeredményben a sejt bármely jelátviteli útját módosíthatja és eképpen a sejt alapvető életfolyamatait szabályozhatja. Ily módon a sejt intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációjának ($[Ca^{2+}]_i$) megváltozása fokozhatja a proliferációt, gátolhatja a differenciálódást és az apoptosist, mely változások együttesen vagy külön-külön a malignus transzformáció irányába sodorhatják a sejteket.

A vázizom differenciálódása

A törzs és a végtagok vázizomsejtjeinek prekursorai a mesodermalis eredetű somiták differenciálatlan mesenchymasejtjei, melyek delaminációját és a

megfelelő helyre történő migrációját követően jönnek létre a törzs és a végtagok izomzatának kezdeményei. Ezek a végtagbimbókba érve intenzív proliferációba kezdenek, ezzel párhuzamosan pedig beindul a determinációnak nevezett folyamat, melynek végeredményeként létrejönnek az izom irányú differenciálódásra elkötelezett, de még a terminális differenciálódás előtt álló myoblastok. A myoblastok fúziójával két hullámban történik meg a terminálisan differenciálódott izomcsövek (myotubulusok) képződése: az első hullám eredményezi az ún. primer myotubulusokat, a második hullám során pedig az innerváció kialakulásával párhuzamosan a primer izomcsövek körül kialakulnak a szekunder myotubulusok. Az izomcsövek további myoblastokkal fuzionálva növekszenek, majd megjelenik a vázizom differenciált formája, az izomrost. A delamináció-migráció-proliferáció-determináció-differenciálódás-izomrostképződés eseménysor szoros genetikai szabályozás alatt áll. A myogenesis során nukleáris transzkripciós faktorok, sejtfelszíni receptorok, illetve szekretált molekulák szekvenciális aktiválása és gátlása, átírásának fokozódása vagy csökkenése eredményezi a fentebb bemutatott folyamat zavartalan lezajlását.

A növekedés során és izomsérülést követően a postnatalis életkorban is képződik vázizomrost *de novo*. Felnőtt korban az izomrostképződés fő forrásául szolgáló sejtek magában a vázizomban, a rostok lamina basalis alatt helyezkednek el. Ezek között *in vitro* tenyészetekben mutatott sajátoságaik és sejtfelszíni, valamint intracelluláris markereik alapján alapvetően két sejtípus különíthető el: az izom eredetű őssejtek (MDSC-k, muscle-derived stem cells) és a szatellitasejtek. Az MDSC-k a csontvelőben és a szervezet egyéb szöveteiben megtalálható pluripotens őssejtek közé tartoznak és az izomregenerációban vagy közvetlenül, vagy szatellitasejtek képzésén keresztül képesek részt venni. A szatellitasejtek tulajdonképpen az izomrost lamina basalis alatt nyugvó állapotba került myoblastok, melyek az izom irányú differenciálódás felé sokkal elkötelezettebbek a MDSC-knél. Az izmot ért károsító behatás nyomán a nyugvó

sejtek aktiválódnak, és a myoblast-myotubulus-izomrost fejlődési sort végigjárva pótolják az elveszett rostokat.

Melanomagenesis

A hám stratum basalejában megtalálható, pigmenttermelő sejtek, a melanocyták jóindulatú, lokalizált proliferációjának eredményeként jön létre a naevus, az ebben található módosult melanocyták a naevussejtek (naevocyták). Akár naevussejtek, akár melanocyták esetében bekövetkezhetnek olyan mutációk, melyek onkogének aktiválása és/vagy tumorszuppresszor gének inaktiválása révén malignus transzformációhoz vezetnek, és kialakul az egyik legrosszindulatúbb ismert tumorfajta, a melanoma malignum. Pigmentátltság szerint melanotikus és amelanotikus formákat szokás elkülöníteni, melyek közül az utóbbit (a melanintermelés hiányát mint a dedifferenciálódás egy kézzelfogható jelét felfogva) általában rosszindulatúbbnak tekintjük. A melanoma malignum gyakorisága, korai disszeminálódása és nagyfokú terápiarezisztenciája miatt intenzív kutatások tárgyát képezi.

A purinerg jelátviteli utak

Szent-Györgyi Albert és Drury először 1929-ben számolt be az extracelluláris ATP hatásairól. Az eltelt háromnegyed évszázad alatt világossá vált, hogy a kotranszmitterként exocitózissal, vagy sejtlelesio során az extracelluláris térbe jutó ATP, UTP és származékaik számos gyors, rövid távú, illetve lassú, trofikus hatást fejtenek ki. Előbbiek közé tartozik a thrombocytáaggregációt és exocitózist, míg utóbbiak közé a sejtproliferációt, differenciálódást és apoptosist szabályozó funkciójuk.

A sejtfelszíni P2-purinoceptoroknak, melyek különféle purin és pirimidin nukleotidokkal (ATP, ADP, UTP stb.) aktiválhatók, két csoportja ismert: az ionotrop P2X és a metabotrop P2Y receptorok. A *P2X receptorok* a P2X₁₋₇ alegységek homo- vagy heteromultimerizációjával jönnek létre, a homomer P2X

receptoroknak így tehát hét típusát ismerjük. Az ioncsatorna képzésében 3-6 alegység vesz részt. Amikor az extracelluláris oldal megfelelő helyéhez ATP kötődik, kationcsatorna nyílik meg, mely a $[Ca^{2+}]_i$ -t részben közvetlenül a külső térből növeli meg, részben a belépő Ca^{2+} ionok hatására kalciumindukált kalciumfelszabadulás történik a raktárakból. Emellett a P2X receptorok aktiválódása depolarizálja a sejtet, ami további Ca^{2+} -belépés és -felszabadulás forrása lehet. A *P2Y receptorok* 7 transzmembrán domainnel rendelkező G-proteinhez kapcsolt receptorok. Az emlősökben eddig nyolcféle P2Y receptort klónoztak, melyek közül a legkorábban megismert négy típus ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$) G_q -proteinen keresztül IP_3 -felszabadítás révén hozza létre a cytoplasma $[Ca^{2+}]_i$ -jának növekedését, az újabban megismert négy altípus esetében pedig az adenilcikláz aktiválása G_s -protein ($P2Y_{11}$) vagy gátlása G_i -protein ($P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) közvetítésével is szerepel a jelátvitel mechanizmusaként.

A $P2X_7$ purinerg receptor speciális tulajdonságai és szerepe

A többi P2X receptortól számos tulajdonságában jelentősen különböző $P2X_7$ receptor ($P2X_7R$) a figyelmet azáltal érdemelte ki, hogy közel egy évtizede apoptotikus hatású receptorként azonosították, amit azóta számtalan egészséges és daganatos sejttípusban végzett *in vitro* tanulmány is megerősített. A $P2X_7R$ aktiválására bekövetkező sejtválaszok három nagy csoportba oszthatók és ezek mindegyike közvetlenül összefüggésbe hozható apoptózis indukciójával. *Egyrészt* a $P2X_7R$ is Ca^{2+} -ra permeábilis ioncsatorna, mely ismételt vagy tartós aktiválásra nagy pórust nyit ki, amelyen akár 900 Da-os molekulák is képesek behatolni a sejtbe. *Másrészt* a $P2X_7$ receptor aktivációja után az $[Ca^{2+}]_i$ megemelkedésétől függetlenül is számos apoptózisban részt vevő enzim, így a kaspáz-1, a kaspáz-3, a kaspáz-9, valamint az IL-1 β citokin aktiválódik. A $P2X_7$ receptor aktivációját követő *harmadik* sejtválasztípus az úgynevezett membrán „blebbing”, melyen a sejt morfológiai változásait és hólyagképződését értik, amit sejthalál követ. Ezen változásokat is okozhatja a $[Ca^{2+}]_i$ megemelkedése, de

kimutatták, hogy a hólyagképződés attól függetlenül is végbemegy. A citoskeleton gyors átrendeződésének hátterében az áll, hogy a P2X₇ receptor egy hosszú, intracellulárisan elhelyezkedő C-terminálissal rendelkezik, mely számos citoskeletális és egyéb intracelluláris struktúrával áll közvetlen kapcsolatban, és ezen kapcsolatok receptor-agonista kölcsönhatás utáni átrendeződése jellegzetes morfológiai változásokat eredményez.

Célkitűzések

A tézisekben összefoglalt munka keretében vizsgálni kívántam az extracelluláris ATP-nek a sejtfelszíni P2 purinoreceptorokon keresztül a sejtek hosszú távú sorsát meghatározó folyamatokban, a proliferációban, differenciációban és apoptózisban betöltött szerepét. A felvetett kérdést két irányból közelítettük meg: egészséges sejtek *fiziológiás*nak tekinthető proliferációját és differenciálódását, illetve a proliferáció, differenciálódás és apoptózis *patológiás* útra térését jelentő malignus transzformáció tanulmányozását terveztük.

Kísérletsorozatunkkal a következő kérdéscsoportokra kerestük a választ:

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

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

3. Mutatnak-e válaszkészséget extracellulárisan adagolt ATP-re a *melanocyták, illetve melanoma sejtek*, van-e különbség a válaszkészségükben? Milyen purinoreceptorok állnak az esetleges különbségek hátterében, szerephez jut-e a P2X₇ receptor? Milyen funkciót tölt be a közelmúltban melanoma sejtekben kimutatott rianodin receptor a sejtek Ca²⁺-homeostasisában, befolyásolja-e a purinerg jelátvitelt?

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

Anyagok és módszerek

1. Sejtek és sejtenyésztés

1.1. C2C12 egér vázizom sejt vonal tenyésztése: A sejteket 15%-os FCS-t, valamint antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó DMEM tápoldatban tenyésztettük, differenciálódás indukciójához 5% FCS-t és 5% HS-t tartalmazó DMEM tápoldatot használtunk. A C2C12 sejtek PKC α -t és PKC δ -t stabilan overexpresszáló klónjait 15% FCS-t tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük, tápoldatukba 500 μ g/ml G418-at (Geneticin) is tettünk a transzfektált sejtek szelekciója érdekében.

1.2. Primer egér szatellitasejt-tenyészet készítése: 2-8 napos újszülött egerek végtagjából preparált vértelenített izomszövetet 1 mg/ml tripszint és 0,75 mg/ml kollagenáz II-t tartalmazó foszfát pufferben emésztettük. Szűrés és centrifugálás után az üledéket 10% FCS-t, antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó Ham F-12 tápoldatban szuszpendáltuk, majd steril üveg fedőlemezekre szélesztettük. A tenyésztés 3. napján áttértünk differenciálódást elősegítő tenyésztő médiumra, azaz 2%-os FCS-t, 2% HS-t, valamint antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó DMEM tápoldatra.

1.3. Primer humán melanociták tenyésztése: A plasztikai sebészeti beavatkozáson átesett betegekből diszpázos-tripszines emésztéssel izolált egészséges humán melanocytákat 100 ml AIM-V Lymphocyte Mediumot, 100 ml Keratinocyte-SFM-t, 400 µl BPE-t, 1µl hrEGF-t, 58,44 mg L-glutamátot, 5 ml FCS-t, antibiotikumot (50 NE/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin) valamint antifungális szert (1,25 µg/ml Fungizone) tartalmazó tápoldatban tenyésztettük. Kísérleteket legfeljebb hatszor passzált sejteken végeztünk.

1.4. Humán melanoma sejtvonalak tenyésztése: Három sejtvonallal dolgoztunk: a *HT168-M1* és a *HT199* sejtvonal SCID egerekben tumorképző tulajdonságú és metastaticus különféle metastasis modellekben, ezzel szemben a *WM35* sejtvonal nem metastatisál, viszont szintén tumorigén SCID egerekben. A sejtenyészeteket 10% FCS-t és 2 mM L-glutamátot, valamint antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban tartottuk fenn. Minden kísérletet 3-4 napos tenyészeteken végeztünk.

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

2.1. Egyedi sejten történő fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ mérés: A sejtekbe juttatott Fura-2 fluoreszcens festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) DeltaScanTM kettős monokromátoros berendezése biztosította. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en fotoelektron-sokszorozó segítségével detektáltuk. A két hul-

lámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából ($R=F_{340}/F_{380}$) az irodalomból ismert egyenlet alapján számítottuk ki az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációkat. A tranziens $[Ca^{2+}]_i$ -változások paramétereit (amplitúdó, látencia, a tranziens kialakulásának maximális sebessége, a leszálló szár meredeksége, a csúcs eléréséhez szükséges idő, félértékszélesség) a munkacsoportunk által kifejlesztett számítógépes program (PTIana) segítségével határoztuk meg.

2.2. A Ca^{2+} -fluxus (FL) kiszámítása: Kalciumfluxusként a myoplasmába a külső térből be- és az intracelluláris raktárakból kilépő összes Ca^{2+} ion fluxusát definiáltuk. Az FL-t az $FL=d(Ca_{tot}+Ca_{transzp})/dt$ képlet szerint határoztuk meg, ahol Ca_{tot} a myoplasmán belüli teljes kalciummennyiség, $Ca_{transzp}$ pedig a kalciumeltávolító mechanizmusok által transzportált Ca^{2+} -mennyiség. $Ca_{transzp}$ a pillanatnyilag a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok (pumpák) által szállított kalciummennyiség, melyet arányosnak tekintettünk a pumpák relatív szaturációjával ($[Ca\text{-pumpa}]/[pumpa]$), ahol az arányossági tényező a Ca^{2+} -eltávolítás maximális sebessége (PV_{max}). A PV_{max} értékét minden vizsgált sejtre külön meghatároztuk egy KCl-depolarizációt követő Ca^{2+} -tranziens leszálló szára legalább 3 s-mal a csúcs elérését követően illesztett exponenciális segítségével.

3. Immundetekciós módszerek

3.1. Immuncitokémia és immunhisztokémia: A sejteket 5 percig acetonnal fixáltuk, 0,1%-os Triton-X-100-zal permeabilizáltuk a sejtmembránt 10 percen keresztül, majd 30 perces blokkolás történt 1%-os BSA-val. Az elsődleges antitesttel egy órán át szobahőn, majd a másodlagos antitesttel szintén egy órán keresztül sötétben, szobahőn inkubáltuk a sejteket. A magokat DAPI-val vagy propidium-jodiddal tettük láthatóvá. Kettős festések esetén a kétféle primer antitestet egyszerre tettük a sejtekre, csakúgy, mint a kétféle szekunder antitestet. A negatív kontrollok készítésekor kihagytuk az elsődleges antitesteket és csak a

másodlagos antitesteket adtuk a sejtekhez. A megfestett sejtek vizsgálatát vagy a Zeiss LSM 510 META konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal, vagy a Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. Immunhisztokémiai vizsgálatok során a metodika az alábbi pontokon különbözött: *fixálás*: metanol, 10 perc; *permeabilizálás*: nem történt; *mosás*: PBS, 3x5 perc; *blokkolás*: 1% BSA és 10-szeres hígítású kecskeszérum, szobahőn, 2 h; *primer antitest*: 60 perc, 37°C; *mosás*: PBS, 6x10 perc; *másodlagos antitest*: biotin-konjugált egér IgG ellenes antitest, 1:100, 40 perc, szobahőn; *mosás*: PBS, 3x5 perc; *jelölés*: streptavidin-FITC, 1:100, 40 perc, szobahőn.

3.2. Western immunoblot: A felaratott és szonikált minták proteintartalmát módosított BCA próbával határoztuk meg. A mintákat SDS-PAGE-nek vetettük alá, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. 5%-os tejporoldattal történő blokkolást követően a primer antitestek közül a purinoreceptorok, illetve a dezmin ellenes antitestek 1:200-as hígításait alkalmaztuk. A HRPO-konjugált másodlagos antitest alkalmazását követően az immunreaktív sávokat ECL Western blotting detection kittel mutattuk ki fényérzékeny filmen. Az optikai denzitás értékeket az Image-Pro Plus 4.5 képanalizáló szoftver segítségével mértük meg és a kontroll minta értékére normalizáltuk. Rutinszerűen ellenőriztük a membránok citokróm c jelölődését.

4. Az siRNS technika

A primer kultúrában fenntartott izomsejteket háromnapos korukban a jetSI-ENDO kationos transzfektáló reagens segítségével transzfektáltuk fluoreszceinnel konjugált, a P2X₄, P2X₅, P2X₇ és P2Y₁ receptor ellen tervezett siRNS-ekkel, követve a gyártó utasításait. A méréseket a transzfekció után 48 órával végeztük. Kontrollként olyan jetSI-ENDO-val kezelt sejteket használtunk, melyek esetében a kísérlet során kihagytuk a siRNS-t. A célgének maradék transzlációjának mértékét Western blottal ellenőriztük.

5. Ionáram- és membránpotenciál-mérések

Az extracelluláris ATP által indukált transzmembrán ionáramok és membránpotenciál-változások megfigyelését patch-clamp technika segítségével, teljes sejt (whole-cell) elrendezésben végeztük. Méréseink során boroszilikát üvegapillárisokból készített patch-mikropipettákat és Axopatch 200A erősítőt használtunk. A sejtek elektromos ingerlését, a mintavételezést és az eredmények kiértékelését a pCLAMP 6.0.4. szoftver segítségével valósítottuk meg. Az alkalmazott oldatok cseréjét állandó sebességű perfúziós rendszerrel oldottuk meg.

6. A sejtprolifерáció és sejthalál vizsgálata

6.1. MTT sejtprolifерációs teszt: Az 5000 sejt/lyuk denzitásban 96 lyukú tenyésztő edényben fenntartott sejtekhez a tenyésztés 6. napján 0,5 mg/ml MTT-t adtunk. 2 h 37 °C-on történő inkubálás után az élősejt-számmal arányos formazánkristály-koncentrációt kolorimetriás módszerrel, BioRad Model 550 Microplate Readerben, 570 nm-en mérve az abszorpciót, a gyártó utasításainak megfelelően határoztuk meg.

6.2. Áramlási citometriás apoptosisevizsgálat: A tenyésztett melanoma sejtekben 1 μ M metoxi-ösztadiol hozzáadásával indukáltunk apoptosist. Az ATP hatásának vizsgálatára a tenyészetek egy részéhez a metoxi-ösztadiol mellett 180 μ M ATP-t is adtunk. 48 h elteltével a sejteket szuszpenzióba vittük, 70%-os etanolban fixáltuk, majd 2 órán át inkubáltuk őket propidium-jodiddal és RNazzal. CyFlow áramlási citométer és a FlowMax szoftver segítségével határoztuk meg az apoptotikus sejteknek megfelelő sub-G₀/G₁ frakció nagyságát.

6.3. Nekrotikus sejtek arányának meghatározása - tripánkék exclusiós teszt: A vizsgált sejtek szuszpenzióját 1:1 arányban összekevertük 0,4%-os tripánkékoldattal, majd 3 perc szobahőn történő inkubáció után Bürker-kamrában megszámlolva a kék és nem kék sejteket határoztuk meg a nekrotikussejt-arányt.

7. Tumornövekedés és metastasisképzés in vivo állatmodellben

A HT168-M1 melanoma sejteket szuszpendáltuk, centrifugáltuk, mostuk, Medium 199-ben reszuszpendáltuk, majd három csoportra osztott, csoportonként 6-8 SCID egérbe 50 μ l térfogatban 5×10^4 élő tumorsejtet injektáltunk intrasplenicusan. Az inokulációt követő 7. naptól kezdve az első csoport 100, a második 500 μ g/ttkg/nap dózisban $ZnSO_4$ -ot kapott PBS-ben oldva 12 napon át *per os*, míg a harmadik csoport ugyanolyan mennyiségű üres PBS-t kapott. Az állatokat a kísérlet 28. napján Na-pentobarbitállal túlaltattuk, majd meghatároztuk a májmetastasisok számát, illetve a primer tumor méretének indikátoraként az eltávolított lép tömegét.

8. Statisztikai analízis

Kísérleti adatok csoportjainak összehasonlításához Student-féle t-próbát használtunk, szignifikáns különbséget $p < 0,05$ esetén állapítottunk meg.

Eredmények

1. A purinerg jelátvitel változásai C2C12 egér myoblast sejtvonal differenciálódása során

1.1. ATP és KCl-depolarizáció hatásának dózis- és korfüggése: A C2C12 sejtvonalban az ATP dózis-hatás görbét meghatározva és a kapott pontokra Hill-függvényt illesztve meghatároztuk a félhatásos dózist ($EC_{50} = 143 \mu M$) és a Hill-koefficiensét ($n = 1,05$). Ezután a dózis-hatás görbe alapján maximális választ kiváltó $180 \mu M$ ATP hatásának korfüggését vizsgáltuk meg. A sejtek Ca^{2+} -tranziensei a differenciálódás előrehaladásával párhuzamosan monoton növekedést mutattak: míg 2 napos myoblastok tranzienseinek amplitúdója 111 ± 25 nM ($n = 13$) volt, addig 9 napos, differenciált myotubulusok esetében 231 ± 35 nM-os ($n = 24$) tranzienseket regisztráltunk. A legfejlettebb, 9 napos myotubulusok esetében bifázisos tranziensek jelentek meg, azaz egy gyorsan

kialakuló és lecsengő, nagy amplitúdójú komponenst némi késéssel egy lassabb és kisebb fázis követett.

A KCl-depolarizáció dózis-hatás összefüggésének meghatározása után a maximálisan hatékonynak talált 120 mM-os KCl-koncentrációval folytattuk a kísérleteket. A korfüggés vizsgálatakor azt találtuk, hogy a legfiatalabb sejtek még egyáltalán nem reagáltak a depolarizáló impulzusra, a 2. és 5. nap között viszont válaszkészségük megjelent, amely 5 napos korukra már mintegy 200 nM-os amplitúddal a közel maximális nagyságot érte el, és a fejlődés későbbi stádiumai során alig mutatott további növekedést.

1.2. ATP és KCl-depolarizáció hatása extracelluláris Ca^{2+} hiányában: Vizsgálataink folytatásában meghatároztuk, hogy az egyes stimulusok esetében az extracelluláris térből belépő kalcium a kialakuló Ca^{2+} -tranziens mekkora részéért tehető felelőssé. Ismételt ATP-adagolás esetében szignifikáns deszenzitizáció lépett fel (a 2. tranziens mintegy 85, a 3. mintegy 70%-a volt az első tranziensnek), míg ismételt depolarizáló impulzusokat követően a válaszkészség nem csökkent, ezért egy első tranziensre, mint kontrollra normalizált második tranziensek amplitúdóit hasonlítottuk össze extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében és hiányában. ATP esetében a külső Ca^{2+} elvétele a relatív amplitúdót $86\pm 6\%$ -ról $76\pm 4\%$ -ra csökkentette, addig ugyanez a változás depolarizáció esetében $113\pm 10\%$ -ról $87\pm 2\%$ -ra való csökkenést jelentett.

1.3. Az ATP és KCl által kiváltott válaszok változásai PKC α - és PKC δ -overexpresszió indukálta differenciáció és proliferáció során: A tápoldat székumtartalmának megfelelő megváltoztatásával indukált differenciálódás (SID) mellett egyes PKC izoenzimek túltermelése is differenciálódást indíthat be (PKCID, PKC indukálta differenciálódás). A következőkben a PKCID és SID során bekövetkező hasonlítottuk össze. Az MTT proliferációs teszttel, illetve a dezmin expresszióváltozásának Western blottal történő meghatározásával igazoltuk, hogy a PKC α fokozza a differenciálódást és gátolja a proliferációt, a

PKC δ pedig, ennek mintegy ellentettjeként, a differenciálódást gátolja és a proliferációt fokozza.

A fenti két PKC izoenzim valamelyikét overexpresszáló 2 napos sejteket és kontroll myoblastokat 180 μ M ATP-vel stimulálva azt találtuk, hogy a kontroll és a PKC δ -t overexpresszáló sejtek $[Ca^{2+}]_i$ -ja csak alig változott, a PKC α -t overexpresszáló sejtek azonban már a fejlődés ezen korai stádiumában is igen nagy Ca^{2+} -tranzienseket hoztak létre. Ugyanezen sejttípusokon 9 napos korukban elvégezett hasonló kísérletek azt mutatták, hogy a kontroll sejtekben végbement a fejlődés és Ca^{2+} -tranziensek jelentek meg, azonban a PKC izoenzimeket overexpresszáló sejtek ATP-re mutatott válaszkészsége az első napokat követően tovább már nem változott. PKCID során a Ca^{2+} -tranziensek nem váltak bifázisossá, ami viszont a SID-en végigment kontroll sejtekben igen tipikus jelenség volt.

A KCl-depolarizáció hatását vizsgálva azt találtuk, hogy a PKC δ -overexpresszáló klónok feszültségfüggő válaszai megrekedtek egy alacsony szinten, a PKC α -overexpresszáló, korán differenciálódó sejtekben viszont abban a stádiumban (2 napos), amikor a purinerg válaszkészségük már maximálisan jelen volt, még nem fejlődött ki a depolarizációra való reagálás képessége, viszont érett, 9 napos sejként már ugyanolyan gyors és nagy Ca^{2+} -tranzienseket mutattak KCl-stimulust követően, mint a kontroll SID-en átesett sejtek.

1.4. Purinerg receptorok expressziós mintázatának változásai SID és PKCID során: Ezután a SID és PKCID folyamatán végigment, differenciált sejtek receptormintázatát hasonlítottuk össze 2 napos kontroll, differenciálatlan myoblastok receptormintázatával. A kontroll myoblastokon P2X₄, P2X₇ és P2Y₂ receptorokat találtunk, a P2Y₄ receptor pedig nem volt jelen ezekben a sejtekben. A differenciálódás előrehaladtával (az azt beindító mechanizmustól függetlenül) a P2X₄ receptor expressziójának szintje jelentősen, a kiindulási érték 10%-ára vagy az alá csökkent. A P2X₇ receptor expressziója lényegében változatlan maradt a PKC α -t overexpresszáló sejtekben, viszont közel négyszeresére

nőtt SID során. A P2Y₂R szintje szintén csak mérsékelten emelkedett a PKCID 2. napjáig, ezzel szemben negyedére csökkent a SID befejeződéséig. A legmarkánsabb, nemcsak mennyiségi, hanem minőségi különbség a P2Y₄ receptor esetében volt megfigyelhető, hiszen ez a receptor teljesen hiányzott a differenciálatlan kétnapos myoblastokról, viszont a SID végállapotában a P2Y₄R erőteljes expressziója volt detektálható.

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

2.1. ATP hatásának korfüggése: Az árammérések tanúsága szerint ATP 40 s-on keresztül fenntartott adagolása sem 5-10, sem >10 magvú sejtek esetében nem váltott ki deszenzitizációt, ugyanakkor a befelé irányuló I_{ATP} nagysága szignifikánsan különbözött. Az 5-10 magvú sejteken mért áramsűrűség átlaga 1,5 pA pF⁻¹-nél nagyobb, míg a 10-nél több maggal rendelkező sejteken 0,25 pA pF⁻¹-nél is kisebb volt. A differenciáltabb sejtek nyugalmi membránpotenciálja átlagosan jóval negatívabb volt (-80 mV körüli, szemben az 5-10 magvú sejtek -60 mV körüli értékével), és az ATP csak sokkal kisebb mértékben váltott ki depolarizációt.

A fluoreszcens kalciummérések és fluxusszámítások eredményei alapján a legéretlenebb (<5 magvú) sejtek [Ca²⁺]_i-ja az ATP-adagolás időtartama alatt egy magasabb szinten stabilizálódott, majd azt követően visszaállt a nyugalmi értékre. A Ca²⁺-szint ezen változásainak hátterében egy gyors emelkedést, majd csökkenést mutató első (FL_{csúcs}), illetve azt követően egy fenntartott második (FL_{plató}) komponensből álló fluxusváltozás állt. 5-10 magvú sejtek egy részében az éretlen sejtekben tapasztaltakhoz jellegében hasonló, ám sokkal meredekebben felszálló, nagyobb maximális [Ca²⁺]_i-értéket eredményező és rövidebb ideig tartó FL_{csúcs}-ot találtunk, melyet szintén fenntartott fázis követett. 10-nél több nucleust tartalmazó sejtek [Ca²⁺]_i- és fluxusgörbéről is hiányzott a korai emel-

kedés és csak a késői, jóval kisebb amplitúdójú Ca^{2+} -tranzienst létrehozó $\text{FL}_{\text{plató}}$ jelentkezett az ATP hozzáadását követően.

2.2. ATP hatása extracelluláris Ca^{2+} hiányában, illetve depolarizált sejteken: Kontroll ATP-stimulust követően a sejteket KCl-dal tartósan depolarizáltuk, majd mintegy 60 s elteltével újra ATP-t tettünk az extracelluláris oldatba. 5-nél kevesebb magvú, éretlen sejteken maga a depolarizáció általában nem váltott ki Ca^{2+} -tranzienst, viszont az azt követő ATP-alkalmazás csökkent amplitúdójú Ca^{2+} -választ eredményezett, ez azonban statisztikailag nem különbözött szignifikánsan a deszenzitizáció kiváltotta csökkenéstől. Megvizsgálva a háttérben álló fluxusváltozásokat azt találtuk, hogy a korai gyors komponens a depolarizáció gyakorlatilag eltüntette, a késői lassú fázis viszont a deszenzitizálódott sejtek válaszaikhoz képest nem volt szignifikánsan különböző. Hasonló eredményre vezettek az érettebb, 5-nél több magvú sejteken végzett kísérletek azzal a különbséggel, hogy a Ca^{2+} -tranzienst amplitúdójában bekövetkezett csökkenés ezen sejtek esetében már statisztikailag is szignifikáns volt.

KCl-depolarizáció helyett a második ATP-stimulus előtt az extracelluláris tér Ca^{2+} -tartalmát 0-ra csökkentve a depolarizált sejteken regisztrált válaszokhoz hasonló jelenségeket figyelhettünk meg: a külső Ca^{2+} elvonása csökkentette a Ca^{2+} -tranzienst amplitúdóját és nem okozott jelentős csökkenést a fluxusváltozás fenntartott fázisának nagyságában. A külső Ca^{2+} -hiányát az $\text{FL}_{\text{csúcs}}$ mindkét esetben sokkal kevésbé „érezte meg”, 5-10 magvú sejtek esetében nem is tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Ca^{2+} -ot is tartalmazó külső oldatban elvégzett kísérletektől.

2.3. Az ATP-re adott bifázisos Ca^{2+} -válasz kialakításában részt vevő purinerg receptor altípusok azonosítása: Immuncitokémiai festéssel P2X_4 , P2X_5 , P2X_7 , P2Y_1 és P2Y_4 receptorok jelenlétét sikerült igazolnunk. A P2X_2 receptor, melynek jelenlétét fejlődő patkány vázizmából kimutatták, az általunk izolált egér myoblastokból hiányzott.

10 μM suramin még csak részlegesen, 300 μM már közel teljesen megszüntette az ATP-alkalmazást követő ionáramokat, ami azt igazolta, hogy az ATP áram- és membránpotenciál-változást kiváltó hatása mindenképpen a P2X receptorok segítségével valósult meg. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és a Ca^{2+} -fluxus megnövekedését szintén dóziszfüggő módon és reverzibilisen gátolta, azonban nem csökkentette 0-ra a Ca^{2+} -tranziens amplitúdóját, s mivel az egyetlen P2Y receptor, melyen a suramin hatástalan, a P2Y₄, ez bizonyítékot szolgáltatott ezen receptor sejtjeiben való jelenlétére.

A csaknem minden P2 receptort gátolni képes suramint követően az egyes purinoreceptor altípusok specifikus agonistáinak hatását vizsgáltuk meg. Azt találtuk, hogy a P2X₇ agonista BzATP a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és a FL mindkét fázisa vonatkozásában is hasonló hatást váltott ki, mint az ATP. A P2Y₁ agonista 2-MeS-ADP-vel és a P2Y_{2/4} agonista UTP-vel végzett kísérletek során a Ca^{2+} -tranziensek szignifikánsan kisebbek lettek, csakúgy, mint az FL_{csúcs}, miközben az FL_{plató} csökkenésének mértéke nem volt statisztikailag szignifikáns. Ez arra utalt, hogy a metabotrop P2Y receptorok a tranziens későbbi fázisának kialakulásáért lehetnek felelősek.

A sejteket ezután a P2X₄, P2X₅, P2X₇ és P2Y₁ receptorok elleni siRNS-sel transzfektáltuk. A P2X₄ receptor szuppressziója nem járt eredménnyel, a P2X₅ receptor kifejeződését pedig csak kis fokban sikerült gátolni. Ezzel szemben a P2Y₁ receptor szintjét a siRNS-transzfekeció közel 40%-kal, a P2X₇ receptor szintjét pedig 56%-kal tudta csökkenteni. Az expressziójában legeredményesebben gátolt és a korábbi kísérletek alapján a tranziens mindkét fázisában jelentősnek gondolt P2X₇ receptor fontos szerepét ez a kísérlet is aláhúzta: a kiváltható Ca^{2+} -tranziens amplitúdója és a korai fázis alatti FL_{csúcs} közel negyedére csökkent, de még a fluxus késői fázisának nagysága is megfelelőedett.

2.4. A P2X₇ receptor szerepének további vizsgálata az ATP által kiváltott ionáramokban: A P2X₇ receptor hozzájárulásának mértékét a P2X receptorok által mediált, ATP kiváltotta ionáram-változásokhoz egy további kísérletso-

rozatban kívántuk megvizsgálni. A sejteket a szaturáló ATP-dózisnál kisebb koncentrációjú ATP-vel kezeltük, majd ugyanilyen koncentrációjú, P2X₇R-specifikus BzATP-t adtunk az oldathoz, mely a kiindulási, ATP által kiváltottnál nagyobb áramot indukált. Amennyiben a sejteket a specifikus P2X₇ antagonistákkal oxidált ATP-vel előkezeltük vagy a P2X₇ receptor ellenes siRNS-sel előzetesen transzfektáltuk, akkor egyrészt a fentivel megegyező koncentrációjú ATP szignifikánsan kisebb áramot hozott létre, másrészt a másodikként alkalmazott BzATP még a lecsökkent I_{ATP}-nél is kisebb válasz kiváltására volt képes. A BzATP által kontroll esetben és a P2X₇R szelektív gátlása mellett kiváltott áramok amplitúdójában igen meggyőző, 7-10-szeres különbség volt.

3. Melanoma malignum sejtek purinerg szignalizációjának speciális sajátosságai

3.1. A purinerg szignalizáció megjelenése a melanomagenesis során:

Több tucat sejten elvégzett méréseink egyértelműen rámutattak, hogy a melanocyták az extracellulárisan alkalmazott ATP-re nem reagálnak [Ca²⁺]_i-emelkedéssel. Ugyanolyan koncentrációjú ATP hatására viszont a melanoma sejtek Ca²⁺-tranzienseket hoztak létre, melyek az agonista ismételt adagolásával deszenzitizáció nélkül újra és újra kiválthatók voltak. A vizsgált sejtek jelentős része nemcsak nem mutatott deszenzitizációt, hanem kifejezetten egyre érzékenyebbé vált a stimulusra és mind nagyobb tranzienseket hozott létre. A 2. tranziens az elsőnél átlagosan több, mint kétszer nagyobb volt.

3.2. Farmakológiailag normálisan működő P2X₇ purinoreceptor overexpressziójának igazolása melanoma sejtekben: Három melanoma sejtvonal immuncitokémiai vizsgálata során mindhárom sejtvonalban és meggyőző intenzitással csak a P2X₇ receptor jelenlétét tudtuk igazolni. A receptor expresszióját melanocytákban és melanoma sejtekben összehasonlítva azt találtuk, hogy melanoma sejtek esetében jóval intenzívebb volt a festődés és a szummációs kép – kizárólag az utóbbiakban – extranuclearis immunpozitivitást is mutatott. Konfokális mikroszkópos vizsgálattal a P2X₇ receptort a plazma-

membránban is sikerült kimutatnunk. (A melanocytákban és melanoma sejtekben megfigyelhető nuclearis festődés okát és jelentőségét egyelőre nem ismerjük.) Végül a fokozott receptorexpressziót Western blottal is igazoltuk. A receptor specifikus agonistáinak (BzATP) és antagonistáinak (briliánskék G és Zn^{2+}) alkalmazásával, illetve a szenzitizáció jelenségének megfigyelésével a P2X₇ receptort funkcionálisan is sikerült egyértelműen a hagyományos P2X₇ receptorral azonosítanunk.

3.3. A melanoma P2X₇ receptorának hatása az apoptosusra, necrosisra és metastasisképzésre: A receptor apoptosusra kifejtett hatásának vizsgálatához melanoma tenyészetekben 2-metoxi-ösztradiol segítségével apoptosist indukáltunk és megmértük az apoptotikus sejtek arányát 48 h elteltével, majd megnéztük, miként befolyásolja az ATP jelenléte a sejtek pusztulását. Az eredmények egyértelműen igazolták, hogy az ATP ezekben a sejtekben – szemben a P2X₇ receptorról eddig meglevő ismereteinkkel – antiapoptotikus hatású, hiszen a 2ME kiváltotta, 50%-nál nagyobb arányú sejtelhalást az ATP jelenléte mintegy felére csökkentette. Ugyanakkor az ATP antiapoptotikus hatását a szelektív P2X₇R antagonista BBG kivédte, a P2X₇ receptort igen potensen gátló ZnSO₄ pedig dózisfüggő módon fokozta az apoptosist és a necrosist. Hogy a ZnSO₄ képes-e *in vivo* állatmodellben is daganatellenes hatás kifejtésére, azt SCID egerek lépébe injektált melanoma sejtek lokális daganatot létrehozó és távoli metastasist képző képességének vizsgálatával kívántuk megállapítani. A *per os* alkalmazott ZnSO₄ nem befolyásolta a primer léptumor tömegét, azonban dózisfüggő módon csökkentette a kialakuló májajtétek számát.

3.4. Rianodinreceptor-overexpresszió, -diszfunkció és RyR-P2X₇R interakció melanomában: Mivel a közelmúltban melanomában a rianodin receptor 2-es izoformájának nagyfokú overexpresszióját mutatták ki, továbbá egyes irodalmi adatok felvetették a RyR2 és a purinerg jelátvitel kölcsönhatását epitheliális tumorsejtekben, megvizsgáltuk, hogy jelen van-e ez a kölcsönhatás sejtvonalainkban is. A RyR2-t konfokális mikroszkópos vizsgálatokkal egyrészt

az endoplasmaticus reticulumban tudtuk kimutatni, másrészt azonban a sejtek egy részében cytoplasmamembrán-lokalizációt találtunk. A számos koncentrációban kipróbált rianodin és a koffein ineffektívnek bizonyult, 10 μM koncentrációjú rianodin viszont, melyről nem ismert, hogy a purinerg receptorok bármelyikével is közvetlen kapcsolatba lépne, az ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek kialakulását szignifikánsan gátolta. Ez a megfigyelés mindenképpen felveti a RyR2 és P2X₇R valamilyen kölcsönhatásának lehetőségét.

Megbeszélés

1. C2C12 sejtek purinerg szignalizációjának változásai a differenciáció és proliferáció során

C2C12 egér vázizom sejtvonala differenciálódása során végzett kísérleteink megmutatták, hogy az izom fejlődése során a sejtek válaszkészsége az extracelluláris ATP-re egyre fokozódik, majd a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásai a legérettebb sejtekben kvalitatív változáson is keresztülmennek, a Ca^{2+} -tranziens bifázisossá válik. PKC α által kiváltott differenciálódás során hasonló típusú purinerg válasz alakul ki, mint a SID végeredményeként megjelenő bifázisos válasz késői, lassú komponense, ugyanakkor az igen gyors első fázis hiányzik. A KCl-depolarizációval kiváltott tranziensek paramétereivel való nagyfokú egyezés rámutatott, hogy az érett sejtek esetében feltehetőleg az ATP-adagolás is a feszültségfüggő folyamatok aktiválása révén emeli meg a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -szintet a tranziens első fázisa során. Ezt a mechanizmust alátámasztotta a primer tenyészetek – más időbeliséggel megjelenő, de morfológiailag hasonló – Ca^{2+} -szint változásainak áram- és membránpotenciál-mérésekkel történő részletes analizálása is. A korábbi fejlődési stádiumok során minden valószínűség szerint azért hiányzik a gyors, feszültségfüggő komponens, mert a P2X receptorok száma nem elegendően nagy a 9. nap előtt ahhoz, hogy rajtuk keresztül a sejtet az akciós potenciál küszöbéig depolarizálni képes nagyságú inward áram alakuljon ki. Ezt a felte-

vést az immuncitokémiai és Western blot vizsgálatok is alátámasztották: a SID-en végighaladt érett sejtek közel 4-szer annyi P2X₇ receptort expresszálnak.

A PKCID során bekövetkező változásokat megvizsgálva azt találtuk, hogy a KCl-depolarizációra adott sejtválasz nem, az ATP-re adott válasz ezzel szemben két igen lényeges szempontból is különbözött a SID folyamán látottaktól: egyrészt a SID végállapotában megjelenő bifázisos válasz második komponenséhez hasonló nagyságú és kinetikájú purinerg válasz jelent meg már a 2. tenyésztési napon, másrészt viszont a 9. napon a gyors fázis megjelenése elmaradt. Nyilvánvaló, hogy a PKC α overexpressziója lehetségessé tette, hogy a purinerg jelátvitel még azelőtt nagyfokú fejlettséget érjen el, mielőtt a feszültségfüggő válasz megjelent volna, viszont az is vitathatatlan, hogy később, amikor már a feszültségváltozásokat érzékelni és azokra reagálni képes apparátus rendelkezésre állt, nem kapcsolódott egymáshoz a purinerg és a depolarizáció vezérelte szignalizáció.

A PKC α sejten belüli excesszív jelenléte elméletileg két módon csökkentheti a purinerg jelet: a purinerg receptor expressziójának és/vagy funkciójának gátlásával. A PKC α -t overexpresszáló sejtekben akkor, amikor az ATP által kiváltott válasz már maximális volt, a purinerg receptorok mintázata alig változott meg, szemben a SID során tapasztaltakkal. Feltételezhető, hogy a P2X₇ receptor nagyfokú expressziónövekedésének elmaradása eredményezi az akciós potenciál kiváltásának hiányát. Lehetséges azonban, hogy a PKC α a P2 receptorok foszforilációjával módosítja azok működését, hiszen a P2X receptorok mindegyike rendelkezik az intracelluláris domainjén egy PKC foszforilációs hellyel.

A PKC δ myoblastokban való túltermeltetése a sejtproliferációt fokozta és a sejt differenciálódást gátolta. ATP-re a sejtek még igen idős tenyészetek esetében sem válaszoltak, ami azt igazolja, hogy a proliferáció felgyorsulása ez esetben nem a purinerg szignalizációs útvonal közvetítésével valósult meg.

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

Abból a – sejtvonalon nem tapasztalható – jelenségből, hogy a legnagyobb izomcsövek és -rostok esetében a $[Ca^{2+}]_i$ -változások gyors és nagy amplitúdójú fázisa eltűnik arra következtethetünk, hogy az ATP az izomdifferenciálódáshoz (-regenerációhoz) csak átmenetileg szükséges, mint jelátvivő molekula, a folyamat lezárultával háttérbe szorul – feltehetően párhuzamosan egy elképzelt izomsérülés során elpusztult sejtekből az extracelluláris térbe jutó ATP mennyiségének fokozatos csökkenésével.

A Ca^{2+} -tranziensek gyors korai fázisának kialakításában a feszültségfüggő csatornák szerepét támasztja alá, hogy KCl-dal depolarizált sejteken, vagyis az ioncsatornák inaktívan tartása mellett az ATP-stimulus szelektíven az egyébként kialakuló $FL_{csúcs}$ -ot szüntette meg, míg az $FL_{plató}$ -t érintetlenül hagyta. Áramméréseink igazolták, hogy ATP alkalmazását követően jelentős inward kationáram jön létre ezen sejtek cytoplasmamembránján keresztül, mely olyan fokú membránpotenciál-változást indukál, mintegy -40 mV-ra depolarizálva a sejteket, ami képes aktiválni a feszültségfüggő csatornákat, akciós potenciált hozva létre. A legfejlettebb myotubulusok és izomrostok esetében a feszültségfüggő és purinerg folyamatok változásai mellett a nyugalmi membránpotenciált meghatározó ionkonduktanciák is módosulnak, a membránpotenciál mind negatívabb lesz. Ezzel párhuzamosan a kezdeti fokozódás után a sejteken ATP-vel kiváltható ionáramok nagysága csökken. E kettő együtt nyilvánvalóan az akciós potenciál és a Ca^{2+} -tranziens korai fázisának elmaradásához vezethet.

Az ATP által kiváltott Ca^{2+} -tranziens késői komponensének és az $FL_{plató}$ -nak a létrehozásában feszültségfüggő folyamatok gyors inaktivációjuk miatt nem játszhatnak szerepet. A P2X receptorok, különösen a nem deszenzitizálódó P2X₇R hozzájárulása a $FL_{plató}$ -hoz nem zárható ki, ugyanakkor mivel egyrészt extracelluláris Ca^{2+} ionok hiányában sem csökkent szignifikánsan az $FL_{plató}$, miközben ugyanez az $FL_{csúcs}$ -ról nem volt elmondható, másrészt pedig 300 μ M

suramin jelenlétében ATP hozzáadása után mért $I_{ATP=0}$ mellett is létrejött a Ca^{2+} -tranziens lassú fázisa, ezért kimondhatjuk, hogy a fenntartott komponenséért főképpen P2Y receptorok aktiválódása a felelős.

Sejtjeinken immuncitokémiai módszerrel az ionotrop receptorok közül a P2X₄, P2X₅ és P2X₇-et, a metabotrop receptorok közül pedig a P2Y₁ és P2Y₄ altípust tudtuk kimutatni. Kiemelendő, hogy a P2X₄ és P2X₇ receptorokat korábbi munkák nem említik a vázizomra jellemző altíposokként. A P2X₄ receptor jelentőségét funkcionális vizsgálatokkal nem tudtuk igazolni. Ezzel szemben a P2X₇ receptor specifikus agonistája (BzATP) és antagonistája (o-ATP) jelenlétében és hiányában, siRNS-sel végzett sikeres szuppressziót követően és anélkül árammérésekkel, $[Ca^{2+}]_i$ -mérésekkel és a számolt Ca^{2+} -fluxus korai és késői fázisának elemzésével minden kétséget kizáróan bebizonyítottuk, hogy primer tenyésztett myoblastok myotubulussá differenciálódása során ez a receptor játssza a legfontosabb szerepet az ATP által kiváltott depolarizáció létrehozásában és így a Ca^{2+} -szintben bekövetkező legnagyobb növekedés, a korai gyors fázis kiváltásában. A fejlődés/regeneráció lezárultát pedig szintén a Ca^{2+} -tranziens azon komponensének eltűnése jelzi a legmarkánsabban, amelyet ennek a receptornak a működése fémjelez.

3. Purinerg szignalizáció melanoma malignumban

Amint az vizsgálatainkból kiderült, a melanomagenesis során az ATP-re tökéletesen érzéketlen egészséges melanocyták szenzitívvé válnak a purinerg stimulusra és bennük nagy mennyiségben P2X₇ receptorok jelennek meg. A receptort ATP-re adott Ca^{2+} -válaszok tekintetében minden szempontból normálisnak találtuk melanoma sejtekben. Ennek ellenére a sejtjeinken megfigyelt receptor a normálisnak tekintett proapoptotikus hatásnak pontosan az ellenkezőjét váltotta ki akkor, amikor az apoptosist és necrosist kísérleteinkben gátolta. El kellett tehát fogadnunk, hogy valami befolyásolja a receptor működését. A lehetséges modulátor keresése közben került a vizsgálódásunk középpontjába a

RyR, melynek overexpresszióját melanoma sejtekben sikerült igazolnunk. Megállapítottuk, hogy a RyR melanoma sejtekben az endoplazmás retikulumban és valószínűleg a külső membránban helyezkedik el. Utóbbi meglehetősen szokatlan lokalizáció a receptor számára, de van rá néhány példa (szívizomsejtek, simaizomsejtek, osteoclastok esetében is leírták). A rianodin receptor ismert agonistáinak alkalmazását sem melanocytákon, sem melanoma sejteken nem követte a $[Ca^{2+}]_i$ megváltozása. Tumoros sejtek esetében az overexpresszáldó receptor diszfunkciója nem tekinthető ritkaságnak, a legvalószínűbb tehát az, hogy abnormális működésű csatornával van dolgunk.

A melanomában funkcióképes overexpresszált $P2X_7$ receptor és a funkcióképtelen RyR2 különálló vizsgálata után a két receptorra ható molekulákat együttesen alkalmaztuk és azt találtuk, hogy rianodin hatására az ATP által kiváltott Ca^{2+} -válaszok amplitúdója lecsökkent. Igen valószínűtlen, hogy a rianodin közvetlenül a $P2X_7$ receptoron hatna, legalábbis erre utaló közleményt nem találtunk, ami nem meglepő, hiszen radioaktív izotópos vizsgálatok tanúsága szerint az alkaloida nagy affinitással és specificitással csak a RyR-hez kötődik. Kézenfekvő tehát a feltételezés, hogy a rianodint kötött RyR befolyásolja a $[Ca^{2+}]_i$ változásait vagyis a rianodin kötődése a RyR-hoz az ATP indukálta $P2X_7R$ -on keresztüli inward Ca^{2+} -áramot csökkenti.

A lehetséges mechanizmus megértését nehezíti, hogy mindkét fehérje egy-egy óriási és heterogén receptorstruktúra fő alkotója, melyek önmagukban is komplex módon hatnak kölcsön molekuláris környezetükkel. Az összetett hatásoknak és a szubcelluláris lokalizáció fentebb említett bizonytalanságainak köszönhetően még elméletben is nehezen állapítható meg pontosan, hogyan lép kölcsönhatásba a RyR és a $P2X_7$ receptor. A lehetőségek átgondolásánál célszerű a közvetlen mechanikai kapcsolat és valamilyen közvetett kölcsönhatás lehetőségét mérlegelni. Egyrészt feltételezhetjük a két receptorkonglomerátum térbeli közelségét, ha elfogadjuk, hogy az overexpresszált RyR a külső membránban (is) megtalálható. Az sem zárható ki azonban, hogy az ER-ben levő RyR kap-

csolódik a cytoplasmamembrán P2X₇ receptorához, akár a citoszkeleton közvetítésével, akár közvetlenül, a plazmamembrán alatt, annak közelében lévő ER-ben elhelyezkedve (az ilyen „kapcsolattartás” a felszíni membránnal egyébként sem idegen a RyR-tól). A feltételezés bármelyik esetben ugyanaz: a rianodin RyR-hez történő kötődése után konformációváltozás következik be, mely módosítja a RyR-hez kapcsolódó molekulát is, ami végeredményben a Ca²⁺-beáramlás csökkenéséhez vezet.

Amennyiben feltételezzük a két receptor kölcsönhatásának szerepét a melanoma kialakulásában, az események alábbi szekvenciája képzelhető el: egy károsító behatás (például UV sugárzás) éri a sejtet, ami esetleges egyéb hatásai mellett tumor szuppresszor géneket inaktivál vagy onkogéneket aktivál. Ez a sejt apoptózisprogramjának aktiválódását eredményezi, melynek részeként kifejeződik a P2X₇R, és a sejt elpusztul. Azokban a sejtekben azonban, amelyekben a véletlen folytán párhuzamosan bekövetkező mutáció miatt a RyR overexpresszálódik, a P2X₇ receptoron keresztüli szignalizáció módosul és a RyR-P2X₇R funkcionális komplex antiapoptotikus hatást fejt ki, azaz a károsodott sejt túlélését és tumor kialakulását segíti. Az antiapoptotikus hatás kialakulására kétféle elképzelésünk is van. Egyrészt könnyen lehet, hogy az overexpresszált (és esetleg mutáns, illetve abnormis helyen található) RyR mindenféle agonistája vagy antagonistája nélkül is, már nyugalomban gátolja a P2X₇ stimuláció kiváltotta [Ca²⁺]_i növekedést, így a P2X₇ agonisták nem apoptosist kiváltó, hanem annál kisebb [Ca²⁺]_i szintet hoznak létre, ami a P2X₇R aktiválódását követően megszokottól eltérő jelátviteli útvonalakat aktivál és antiapoptotikus hatású. A másik lehetőség, hogy a RyR-P2X₇R kölcsönhatás a P2X₇R apoptosist kiváltását eredményező hatásai közül egyéb funkciókat (például citoszkeletális átrendeződések vagy interleukintermelés) gátol, melyek szintén nélkülözhetetlenek volnának a sejthalál kiváltásához.

Végezetül azt kell átgondolni, mik lehetnek a P2X₇R és a RyR antiapoptotikus funkcióját aktiváló molekulák *in vivo*, hiszen ilyenekre feltétlenül

szükség van ahhoz, hogy a sejtelhalás kivédése megtörténhessen a szervezetben is. A P2X₇ receptor esetében a legkézenfekvőbb válasz az ATP, ami az extracelluláris térbe két úton kerülhet: idegvégződésből kotranszmitterként, ami a beidegzéssel nem rendelkező melanocyták és melanoma sejtek esetében kevésbé valószínű (ugyanakkor a korábban tárgyalt izomdifferenciálódás során a fejlődés előrehaladtával – *in vivo* – kialakuló beidegzés és a beinduló neurotranszmisszió az extracelluláris ATP fontos forrása lehet), illetve magukból a széteső melanocytákból és melanoma sejtekből. Utóbbira melanomában van is lehetőség, hiszen a sejtelhalás nem tekinthető ritkaságnak egy gyorsan növekvő tumorban, ahol folyamatos a neovascularisatio elmaradottsága és ebből következően az ischaemia. A RyR esetében elméletileg – ahogy azt korábban már említettük – nem is feltétlenül szükséges valamilyen agonista jelenléte a P2X₇R funkciójának módosításához, hiszen lehetséges, hogy a RyR nyugalmi állapotban is folyamatos kölcsönhatásban áll a P2X₇R-al és befolyásolja annak funkcióját („RyR-P2X₇R funkcionális komplex”). Ha viszont csak valamilyen ágens kötődése után befolyásolja a purinerg receptor működését, *in vivo* körülmények között főleg a Ca²⁺ ion és az ATP, mint a RyR fiziológias regulátorai merülnek fel, de hogy ez a szabályozás hogyan valósulhat meg, egyelőre nem tudjuk.

Összefoglalás

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

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

differentiálódást elindító tényezőtől függően a P2Y₂ és P2Y₄, primer myotubulusok esetében a P2Y₁ és P2Y₄ altípusok) által az SR-ből fáziskéséssel felszabadított Ca²⁺ a felelős.

Az általunk vizsgált melanoma malignum sejtvonalak mindegyikében a kontroll egészséges melanocytákhoz képest új tulajdonságként jelent meg az ATP-szenzitivitás. Vizsgálataink kimutatták, hogy a különböző sejtvonalakon egyöntetűen a P2X₇R expresszálódik, mely a cytoplasmamebránban elhelyezkedve a P2X₇R-nak megfelelő farmakológiai tulajdonságokkal hoz létre Ca²⁺-tranzienseket. A receptor aktiválása azonban – a P2X₇R-től megszokottól eltérően – antiapoptotikus hatást fejt ki, míg a receptor gátlása elősegíti az apoptosist és necrosist *in vitro*, illetve a metastasisképzést csökkenti *in vivo*. A P2X₇R módosult funkciója összefüggésben lehet a rianodin receptor melanoma sejtekben megfigyelhető overexpressziójával. A RyR az ER-ben és a plazmamembránban is kimutatható. Szokványos agonistái nem képesek aktiválni, viszont rianodin jelenlétében szignifikánsan csökken a P2X₇R közvetítésével megvalósuló [Ca²⁺]_i-növekedés amplitúdója. Nem zárható ki tehát, hogy a kórosan overexpresszált RyR módosítja a melanomában megjelenő P2X₇R funkcióját oly módon, hogy utóbbi receptor az apoptosist ellen védő tényezővé válik és működésével elősegíti a malignus transzformációt.

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

Közlemények

A tézisek alapjául szolgáló közlemények, előadások és poszterek.

KÖZLEMÉNYEK:

- Deli T.**, Szappanos H., Szigeti Gy.P., Cseri J., Kovács L., Csernoch L. (2006): Contribution from P2X and P2Y purinoreceptors to ATP-evoked changes in intracellular calcium concentration on cultured myotubes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (Közlésre elfogadva, [doi: 10.1007/s00424-006-0146-6](https://doi.org/10.1007/s00424-006-0146-6)) [IF: 3,564]
- Deli T.**, Tóth I.B., Czifra G., Szappanos H., Bíró T., Csernoch L. (2006): Differences in purinergic and voltage-dependent signalling during protein kinase Ca overexpression- and culturing-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* (Közlésre elfogadva, [doi: 10.1007/s10974-006-9096-z](https://doi.org/10.1007/s10974-006-9096-z)) [IF: 1,338]
- Deli T.**, Varga N., Ádám A., Rásó E., Puskás L.G., Burján Zs., Ladányi A., Kenessey I., Tóvári J., Fehér M., Szigeti Gy.P., Csernoch L., Tímár J.: Functional Genomics of Calcium Channels in Human Melanoma Cells. *International Journal of Cancer* (Közlésre beküldve)
- Szigeti Gy.P., Szappanos H., **Deli T.**, Cseri J., Kovács L., Csernoch L. (2006): Differentiation-dependent alterations in the extracellular ATP-evoked calcium fluxes of cultured skeletal muscle cells from mice. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (Közlésre elfogadva, [doi: 10.1007/s00424-006-0145-7](https://doi.org/10.1007/s00424-006-0145-7)) [IF: 3,564]

ELŐADÁSOK:

- Deli T.**, Ruzsnavszky O., Szentesi P., Csernoch L. (2005): A rianodin receptor és a P2X₇ purinoceptor kölcsönhatásának lehetséges szerepe melanociták transzformációjában. *Membrántranszport Konferencia*, Sümeg.
- Deli T.**, Ruzsnavszky O., Szentesi P., Szigeti Gy.P., Csernoch L. (2005): Az intracelluláris kalciumhomeosztázis vizsgálata melanocitákon és melanoma sejtvonalakon. *Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése*, Budapest.
- Tímár J., **Deli T.**, Csernoch L., Rásó E. (2005): Genomics of calcium signaling in human melanoma. *10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine*, Kréta, Görögország.

POSZTEREK:

- Deli T.**, Szappanos H., Cseri J., Kovács L., Csernoch L. (2003): Purinerg és feszültségfüggő jelátvitel vizsgálata C2C12 harántcsíktolt izomsejteken. *Magyar Élettani Társaság LXVII. Vándorgyűlése*, Pécs.
- Deli T.**, Ruzsnavszky O., Szigeti Gy. P., Tóvári J., Kenessey I., Tímár J., Csernoch L. (2006): Rianodin receptor (RyR)-P2X₇ purinoceptor kölcsönha-

tás szerepe a malignus transzformációban. *Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése*, Szeged.

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

A tézisekben fel nem használt közlemények, előadások és poszterek.

KÖZLEMÉNYEK:

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

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

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

ELŐADÁS:

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

POSZTER:

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