

Részletes szakmai beszámoló a 49151 számú, OTKA pályázathoz, melynek címe

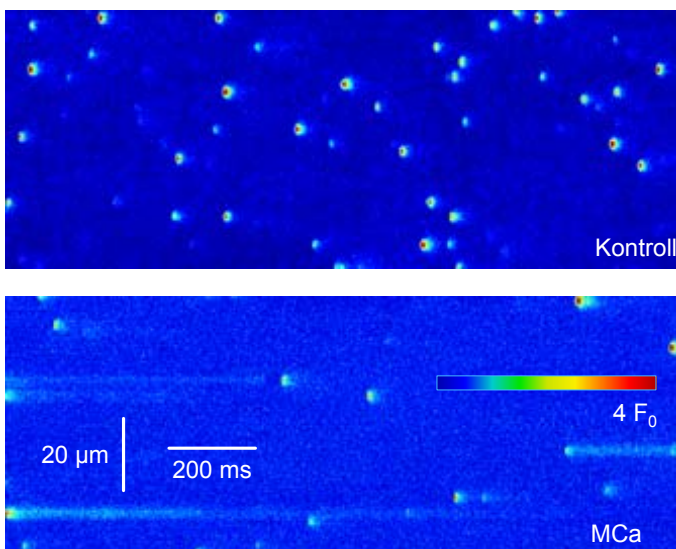
"Izomsejtek intracelluláris kalciumraktárainak szerepe a kalciumhomeosztázis szabályozásában fiziológiás és kóros körülmények között"

Az izomsejtekben az intracelluláris kalciumkoncentráció növekedése alapvető szerepet játszik a kontraktilis fehérjék aktiválásában. Az izomsejtek fejlődése, valamint a kóros folyamatokban bekövetkező adaptációs folyamatok során a kalciumhomeosztázist biztosító mechanizmusok jelentős átalakuláson mennek át.

A DHPR és a RyR közötti kölcsönhatás vizsgálata skorpió toxin, és annak mutánsai segítségével.

Az utóbbi években került az izomkutatók érdeklődésének középpontjába a *Scorpio maurus palmatus* egyik fehérje toxinja, a maurokalcin (M_{Ca}), melynek aminosav szekvenciája nagyfokú homológiát mutat a dihidropiridin receptor rianodin receptorhoz kötődő részével. A M_{Ca} a vázizomrostokban kalciumfelszabadulást hoz létre azért, hogy aktiválja a szarkoplazmatikus retikulumban (SR) található rianodin receptort. Munkánk során patkány vázizomban vizsgáltuk a M_{Ca} Ca^{2+} felszabadulásra kifejtett hatásait. Maurokalcin (20, 50 nM) hozzáadásával a szulfáttal és glutamáttal kezelt rostban is megnőtt az elemi kalciumfelszabadulások eseményszáma. A M_{Ca} hatására az elemi események amplitúdója csökkent, miközben a kalciumfelszabadulás térbeli kiterjedését leíró, az amplitúdó felénél mért görbeszélesség változatlan maradt. A toxin tartós alkalmazása, a rostokon olyan kis frekvenciájú, hosszantartó eseményeket hozott létre, amelyek kontroll körülmények között egyáltalán nem voltak kimutathatóak (1. ábra). Az Arg24Ala mutáns még 500 nM koncentrációban sem befolyásolta az elemi kalciumfelszabadulási eseményeket. Ezzel szemben az Arg19Ala mutáns, hatását tekintve a M_{Ca}-nal mutatott hasonlóságot. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a M_{Ca} aktiválja a szarkoplazmatikus retikulumban található rianodin receptort, ezáltal fokozza a kalciumfelszabadulást, míg a Arg24Ala mutáns, az aktivátor helyen létrehozott mutáció miatt, erre képtelen.

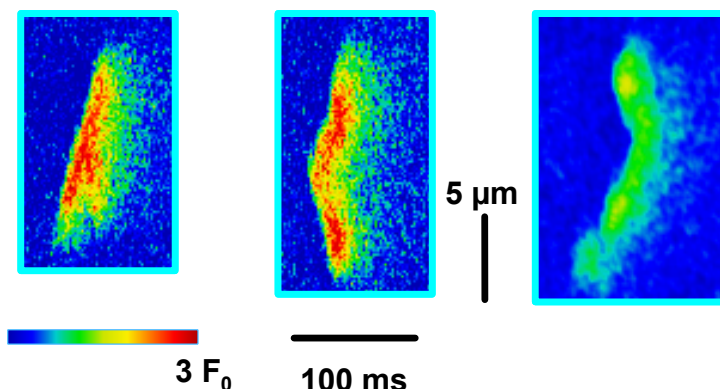
1. ábra: A. Elemi események kontroll körülmények között béka harántcsíkolt izmán. B. 50 nM natív Maurokalcin hatása.



Az elektro-mechanikai kapcsolat lépéseinek vizsgálata különböző intralumináris $[\text{Ca}^{2+}]$ -k esetén.

Kísérleteinkben béka és patkány harántcsíkolt izomrostjaiban egy membránpermeabilis kalciumpuffer (TPEN) adagolásával változtattuk az SR szabad kalciumkoncentrációját ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$) és mértük a spontán és depolarizáció hatására kialakuló kalciumfelszabadulást az SR-ből. Konfokális mikroszkóp segítségével spontán kialakuló elemi kalciumfelszabadulási eseményeket (spark) rögzítettünk. Megállapítottuk, hogy a TPEN nagy ($>100 \mu\text{M}$) koncentrációban csökkentette a sparkok előfordulását, míg kis koncentrációban alacsony intracelluláris magnéziumkoncentráció ($[\text{Mg}^{2+}]_i$) mellett tovaterjedő elemi eseményeket hozott létre, melyek terjedési sebességére $365 \pm 23 \mu\text{m/s}$ értéket kaptunk (2. ábra). Intakt rostokon a szer nagy koncentrációban nem okozott változást a depolarizációval kiváltott kalciumfelszabadulás jellemző paramétereiben. Míg kis koncentrációban már 10 perc alatt lelassította az SR kalcium csatornájának (RyR) inaktivációját $5 \pm 1 \text{ ms}$ -ről $10 \pm 3 \text{ ms}$ -ra. Megfigyeléseink azt mutatják, hogy a TPEN magas koncentrációban az SR kalcium visszavételi mechanizmusát gátolva csökkenthette a kalciumfelszabadulást. Míg alacsony koncentrációban magnézium hiányában a felszabaduló kalcium megkötésével gátolhatja a RyR inaktivációját. Mindezek azt bizonyítják, hogy fiziológiás körülmények között a magas $[\text{Mg}^{2+}]_i$ gátolja a kalciumindukált kalciumfelszabadulás tovaterjedését vázizomrostokon és megfelelően magas $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ szükséges az elemi kalciumfelszabadulási események spontán kialakulásához.

2. ábra: Három jellemző formája a tovaterjedő elemi kalciumfelszabadulási eseményeknek.

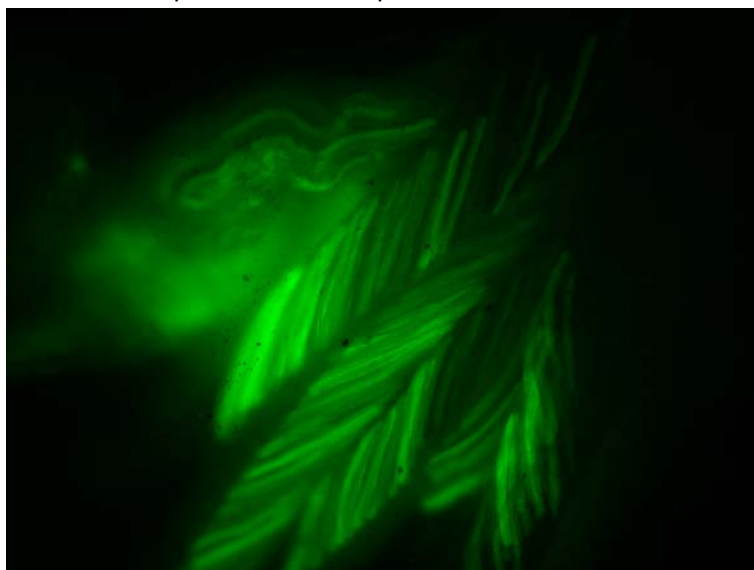


C2C12 vázizomsejt tenyészetekben a TPEN kis koncentrációban a sejtek 60%-ban kalciumfelszabadulást váltott ki. Ezzel ellentétben nagy koncentrációban alkalmazva csökkentette mind a depolarizációval és a koffeinnel kiváltott kalcium tranziensek amplitúdóját és a kalcium visszavételi rendszer sebességét. TPEN nem a Zn^{2+} megkötése által módosította kalciumfelszabadulásokat, amit a Zn^{2+} mentes környezetben végzett mérések bizonyítottak. Ezen adatok bizonyítják, hogy a TPEN direkt módon változtatja meg az SR-ből történő kalciumfelszabadulást és a Ca^{2+} eltávolítását a myoplazmából.

Harántcsíkolt izomrostok mellett megvizsgáltuk a TPEN hatását a szívizomsejtek Ca^{2+} homeosztázisára is. A szer alkalmazását követően fokozódott a szívizomsejtekben a spontán Ca^{2+} felszabadulások frekvenciája, valamint ezzel szinkron 60%-al csökkent az SR Ca^{2+} telítettsége. Az izolált és lipidmembránba beépített rionodin receptor (RyR) nyitási valószínűsége kétszerese nőtt TPEN hatására. Alacsony koncentrációban alkalmazott TPEN nem befolyásolta az SR Ca^{2+} -ATP működését az izolált SR vezikulumokban. Eredményeink igazolták a TPEN állatkísérletekben kimutatott kardioprotektív és antiaritmiás hatásait.

Az SR integráns fehérjéi szerepének tanulmányozása módosított expressziós rendszerekben.

Kifejlett vázizomrostokon a transzverzális tubulusok membránjában található dihidropiridin receptorok és az SR membránjában elhelyezkedő RyR-ok kölcsönhatása vezet az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedéséhez. Az SR membránban lokalizálódó triadin fehérje a Ca^{2+} felszabadító komplex tagjaként képes befolyásolni a RyR-ok működését, az izom kontraktilitásban betöltött pontos szerepe azonban egyelőre tisztázatlan. Kísérleteinkben tanulmányozni kívántuk az in vivo ill. in vitro géntranszfekcióval létrehozott triadin overexpressziót kísérő változásokat. Az in vivo kísérletekben plazmid vektorba klónozott triadin cDNS-t injektáltunk elaltatott állatok steril körülmények között feltárt végtagizmába. A DNS izomsejtekbe való bejutását 10 mg/ml cc. LevovistR egyidejű alkalmazásával oldottuk meg ami egy olyan echográfiás szer, mely légbuborékokat képezve a szövetben felrobban és a lérejövő membránsérülések lehetővé teszik a DNS sejtbe jutását. Transzfekciós markerként a kontroll lábba injektált zöld illetve sárga fluoreszcens proteint kódoló plazmidot alkalmaztunk. A membránsérülések regenerációját és a DNS



expressziót figyelembe véve a vizsgálatokat 10 nappal a beavatkozás után végeztük fluoreszcens és konfokális mikroszkópia segítségével. Az in vitro kísérletekben a fenntartott izomrostokat adenovírus vektorral transzfektáltuk, az eredményeket triadin ellenes antitest felhasználásával immuncitokémiai módszerrel ill. konfokális mikroszkópiával értékeltük (3. ábra). Eredményeink alapján az izom géntranszfekciója, a kontrollként alkalmazott fluoreszcens gének expressziója sikeres. A triadinnal kezelt izomban a RyR-ok működésének változását tapasztaltuk a kontrollhoz képest, ami nagy valószínűséggel a triadin fokozott expressziójának következménye.

3. ábra: Egér *m. flexor digitorum brevis* izmának keresztmetszeti képe. A zölden világító izomrostok a triadint túltermelő sejtek.

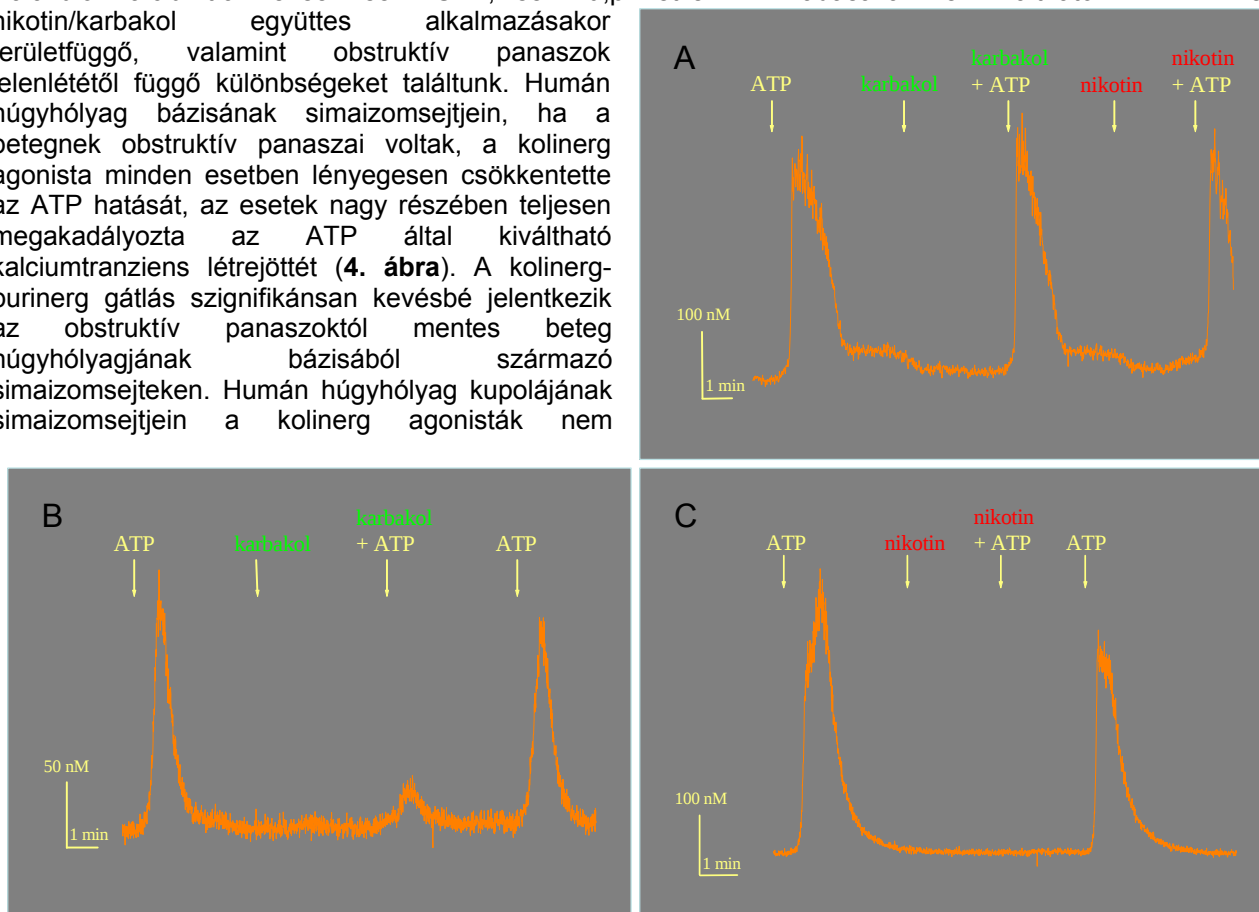
Purinerg jelátvitel szerepe a vázizomsejtek differenciálódásában.

Kísérleteinkben bemutattuk, hogy az ATP P2X és P2Y purinoreceptorokon keresztül képes tenyésztett vázizomsejtek $[Ca^{2+}]_i$ -nak növelésére. Rámutattunk, hogy az ATP által kiváltott kalciumfluxus korai, gyorsan kialakuló majd megszűnő fázisáért a P2X receptorok aktiválódását kísérő depolarizáció a felelős. Ezzel szemben az ATP által kiváltott kalciumfluxus késői komponensének 80%-a a P2Y receptorok és így a foszfatidil-inozitol (PI) útvonal aktiválódásához köthető. Megállapítottuk, hogy az ATP jelenléte a tenyésztő oldatban a proliferációs ráta jelentős csökkenését okozza. Kimutattuk, hogy a tenyésztő oldat szérumszintézisének megfelelő megváltoztatásával indukált differenciálódás során C2C12 egér myoblastokban a sejtek purinerg válaszkészsége fokozódik. A C2C12 sejtvonal esetében a Ca^{2+} -felszabadulás 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. Ezzel párhuzamosan a P2X7R expressziójának máskor tapasztalt fokozódása is elmaradt. Ez utóbbi kialakításáért az aktiválódó metabotrop P2Y receptorok által az SR-ből fáziskéséssel felszabadított Ca^{2+} a felelős.

A kolinerg-purinerg interakció szerepe a tenyésztett simaizomsejtek kalcium homeosztázis szabályozásában.

Kísérleteinkhez humán és patkány húgyhólyagból származó simaizom sejteket tenyésztettünk, majd kolinerg és purinerg receptor agonista szerek kalcium homeosztázisra kifejtett hatását vizsgáltuk. Patkány húgyhólyagból tenyésztett simaizomsejtek ingerlését külsőleg adagolt karbakol, nikotin és ATP adagolásával szimuláltuk. Kimutattuk, hogy az ATP ismételt adagolása által kiváltott kalciumtranziensekben nincs szenzitizáció vagy deszenzitizáció. Az ATP-adagolás hatására kialakuló kalciumtranziensek sem UTP, sem α,β -metilén-ATP adásával nem válthatók ki. ATP és karbakol együttes alkalmazásakor életkor- és területfüggő különbségeket találtunk. Eredményeink szerint a felnőtt patkány bázisából tenyésztett simaizomsejteken a karbakol és az ATP együttes alkalmazása esetén a karbakol szignifikánsan csökkentette az ATP által kiváltott kalciumszint-emelkedést. Ez a gátló interakció nem volt kimutatható az idősebb patkányok kupolájából készített simaizomtenyészetben. Az újszülött patkányokból származó húgyhólyag simaizomtenyészetben sem mutatható ki a kolinerg-purinerg gátlás, sem a húgyhólyag bázisának, sem a kupolájának sejtein. Kimutattuk, hogy a karbakol gátló hatását az atropin jelenléte nem befolyásolja. A két jelátviteli rendszer között kialakult keresztgátlás sem a retenciós húgyhólyag kupolájának sejtein, sem az egészséges húgyhólyagban nem volt megfigyelhető. Patkányokban a kolinerg és purinerg rendszerek közötti interakció egyértelmű életkorfüggést mutatott. A nikotinos receptorok alfa alegységének immunfluoreszcens festéssel történő kimutatása egyrészt bizonyította a receptorok jelenlétét, másrészt a humán és patkány húgyhólyag között jelentkező különbségeket.

Humán húgyhólyagból tenyésztett simaizomsejtek ingerlését (a patkány simaizomsejtekhez hasonlóan) külsőleg adagolt karbakol, nikotin és ATP adagolásával szimuláltuk. Az ATP ismételt adagolása által kiváltott kalciumtranziensekben nem mutattunk ki szenzitizációt vagy deszenzitizációt. Az ATP-adagolás hatására kialakuló kalciumtranziensek sem UTP, sem α,β -metilén-ATP adásával nem válthatók ki. ATP és nikotin/karbakol együttes alkalmazásakor területfüggő, valamint obstruktív panaszok jelenlététől függő különbségeket találtunk. Humán húgyhólyag bázisának simaizomsejtjein, ha a betegnek obstruktív panaszai voltak, a kolinerg agonista minden esetben lényegesen csökkentette az ATP hatását, az esetek nagy részében teljesen megakadályozta az ATP által kiváltható kalciumtranziens létrejöttét (4. ábra). A kolinerg-purinerg gátlás szignifikánsan kevésbé jelentkezik az obstruktív panaszoktól mentes beteg húgyhólyagjának bázisából származó simaizomsejteken. Humán húgyhólyag kupolájának simaizomsejtjein a kolinerg agonisták nem



módosítják az ATP hatását.

4. ábra: ATP-vel kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció változások kontroll esetben, karbakol és nikotin adagolása mellett egészséges (A) és obstruktív (B, C) húgyhólyag bázisának simaizomsejtjein.

A TASK-3 receptor kimutatása melanoma malignum sejtekben.

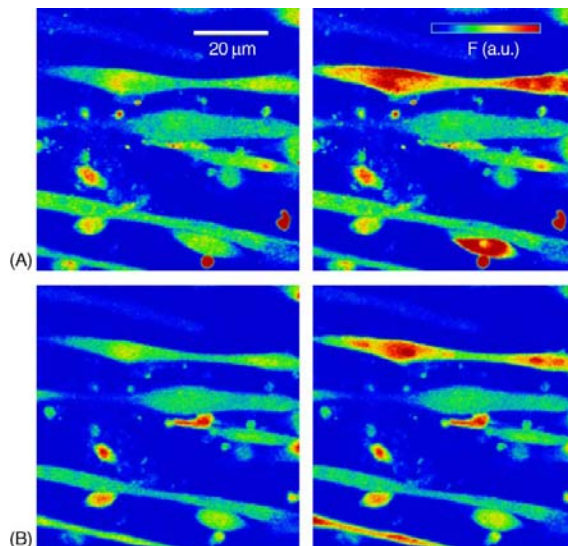
Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a melanoma sejtekben is kimutatható az elsődlegesen izomsejtekre jellemző RyR, ami ráadásul meghatározza a sejtek malignus potenciálját. Ezért megvizsgáltuk azt is, hogy egyéb, elsődlegesen nem melanoma specifikus fehérjék, kimutathatóak-e ezekben a sejtekben. A beszámolási periódusban kollaborációs partnerünkkel (Sigma-Aldrich Izrael) kifejlesztettünk egy humán TASK-3-specifikus monoklonális antitestet. Az ellenanyag használhatóságát immunhisztó- és immuncitokémiai körülmények között vizsgáltuk, a specificitást tranziens és stabil transzfekciós rendszerek

és Western-blot technika alkalmazásával ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy mind a sejtenyészetben fenntartott, mind a szöveti preparátumban található melanoma malignum sejtek erős TASK-3-immunpozitivitást mutatnak. Az immunjelölődés döntően intracelluláris volt, továbbá érintette a melanoma sejtek nucleusát is. A fehérje ezen váratlan megoszlását egy TASK-3-GFP fúziós fehérjét kódoló vektor konstruálásával, és a szintetizálódott termék megoszlásának vizsgálatával erősítettük meg.

Az ASPERGILLUS GIGANTEUS eredetű antifungális protein (AFP) hatásai.

A fonalas gombák nagy mennyiségben termelnek antifungális fehérjét, amelyek segítségével a környezetükben lévő egyéb gombák növekedését gátolni tudják. Az AFP az *Aspergillus giganteus* által termelt ciszteinben gazdag antifungális hatású fehérje, amely képes a fonalas gombák növekedését meggátolni, miközben hatástalan az élesztőgombákra és a baktériumokra. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az emlős sejteken van-e az AFP-nek kimutatható hatása. A szernek nem volt kimutatható citotoxikus hatása a human endothel sejteken, valamint nem aktiválta az immunrendszert. Ugyancsak nem tudtunk kimutatni szerhatást sem az idegsejtek, sem az astrocyták kálium áramain. A tenyésztett vázizomsejteken, így az izomsejtek kalcium homeosztázisában sem volt kimutatható változás AFP hatására (5. ábra). Eredményeink felvetik, hogy az AFP egy potenciális antifungális szer, amely in vitro rendszerekben nem rendelkezik emlős sejtekre kifejtett hatásokkal, ezért tervezzük az AFP élő állatokon történő tesztelését is, a szer lehetséges későbbi klinikai alkalmazhatósága végett.

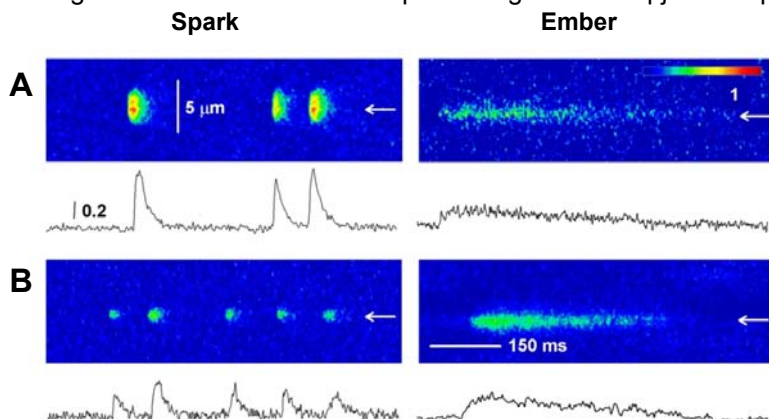
5. ábra: Nyugalmi intracelluláris kalciumkoncentráció szint és spontán kalciumkoncentráció változások kontroll állapotban (A) és 10 µg/ml AFP (B) adagolását követően.



A triadin 95 expresszió gátlása és fokozása módosítja az elektromechanikai kapcsolatot patkány primer myotubulusokban.

Megállapítottuk, hogy patkány satelita sejtekből differenciáltatott myotubulusokban az endogén triadin 95 fehérje a differenciálódás megkezdését követően a 3. naptól mutatható ki. A rodamin vörössel jelölt shRNS-t liposzóma mediált transzfekcióval juttattuk a sejtekbe, a triadin 95 transzlációjának gátlását pedig specifikus antitest alkalmazásával, immuncitokémiai módszerrel ellenőriztük. Fluo-4-gyel feltöltött kontroll primer myotube-okban jellemzően az akciós potenciál hatására az elektromechanikai kapcsolat révén bekövetkező Ca^{2+} felszabadulási események voltak megfigyelhetők, míg triadin 95 hiányának következtében nagyszámú spark jelent meg a sejteken. Feltételezhető, hogy a triadin95 expressziójának csökkentésével az emlős vázizomban a RyR gátlása megszűnik és DHPR szabályozás nélkül is Ca^{2+} felszabadulás történik.

A kísérleteink másik típusában a triadin 95 fehérjét egér C2C12 vázizom sejteken ill. primer myotube-okban túltermelttük és megvizsgáltuk a sejtek Ca^{2+} homeosztázisban bekövetkező változásokat. A triadin túltermelő myotube-okban a koffein indukált Ca^{2+} felszabadulás nem módosult a kontrollhoz képest, míg a KCl által kiváltott Ca^{2+} felszabadulás jelentősen csökkent külső Ca^{2+} hiányában. A spontán Ca^{2+} felszabadulási események két formájának, a „spark”-ok és „ember”-ek vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy a triadin túltermelés a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkentette a „sparkok” frekvenciáját és amplitúdóját. Hasonló csökkenés volt megfigyelhető az „ember”-ek frekvenciában is, míg azok átlagos amplitúdója szignifikánsan nem változott (6. ábra). Az adenovírus vektorral transzfectált primer myotube-okon végzett konfokális mikroszkópos vizsgálatok alapján a spontán Ca^{2+} felszabadulási események



gyakorisága szintén szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a triadin 95 az elektromechanikai kapcsolat gátlásán keresztül szabályozza a vázizomban a szarkoplazmatikus retikulumból történő kalciumfelszabadulást.

6. ábra: Elemi kalciumfelszabadulási események kontroll körülmények között (A) és Triadin-t túltermelő sejtekben (B).

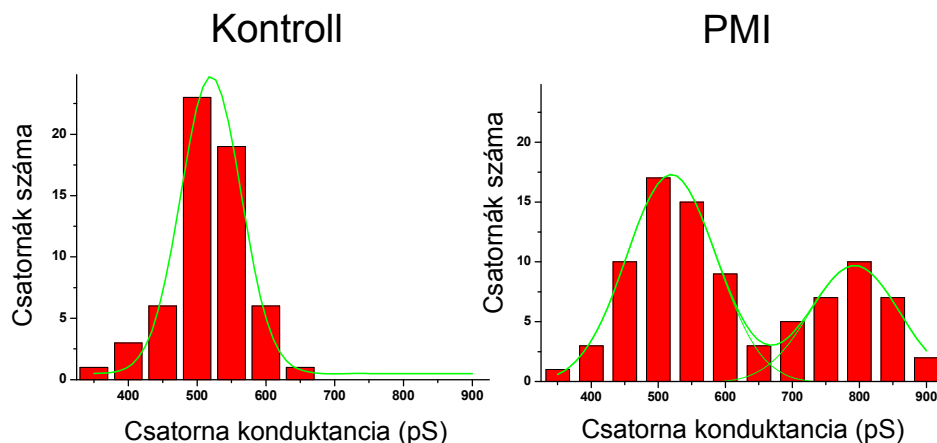
A posztmiokardiális infarktusban kialakuló vázizomgyengeség sejtélettani háttere

A szívinfarktust követő elégtelen szív működés egyes betegekben többek között a vázizomzat progresszív diszfunkciójával is együtt jár. Ezekben a betegekben a perifériás izomzat tömegének és erejének jelentős csökkenése figyelhető meg, amiben nem játszik szerepet a csökkent fizikai aktivitás, hanem az ok a harántcsíkolt izomrostok intrinzik tulajdonságainak megváltozása.

Mindezek ismeretében érthetővé vált az a megfigyelésünk, miszerint a posztinfarktusos (PMI) állatokból származó rostokban csökkent a Ca^{2+} felszabadulás elemi eseményeinek amplitúdója, amivel szinkron megnőtt a hosszuk és a komplexitásuk, utalva a szarkoplazmatikus retikulum (SR) kalcium telítettségének csökkenésére, valamint a rianodin receptor (RyR) és a SR membrán kapcsolatának megváltozására. Az egyedi RyR mesterséges lipidmembránba való beépítése és a csatorna funkció módosulásainak vizsgálata alapján a posztinfarktusos állatokban a csatorna vezetőképességének növekedése volt kimutatható

(7. ábra). Megfigyeltük továbbá, hogy kalciumérzékenység tekintetében a csatornák populációmegoszlását leíró Gauss-görbe kiszélesedett. Ezek az eredmények alátámasztják a kalcium-homeosztázisban szerepet játszó fehérjék gén- és sejtszintű szabályozásának módosulását.

7. ábra: Lipid kettősrétegbe épített egyedi RyR csatornák konduktanciája.



Debrecen, 2009. 02. 27.

Dr. Csernoch László