

NEURON ÉS GLIA SEJTEK FEJLŐDŐ TENYÉSZETEIBEN TAPASZTALT VÁLTOZÁSOK A MEMBRÁNBAN ELHELYEZKEDŐ ADENILCIKLÁZ ENZIMNÉL ÉS BÉTA-RECEPTORNÁL*

MADERSPACH KATALIN

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete

A sejtfelszíni receptorok kutatása terén az utóbbi években sok eredmény született. Több hormonhatású anyag, trofikus faktor, neurotranszmitter receptorát fedezték fel és jellemezték (6, 9, 13, 25). Néhány receptort sikerült tiszta formában is előállítani (8, 20, 26). E sejtfelszíni receptorok funkciója, hogy kapcsolatot teremtsenek a sejt és környezete között. A környezet reguláló-moduláló hatása ezek közvetítésével valósulhat meg.

A membránreceptorok közül az adenilcikláshoz kapcsolódó receptort széles körben tanulmányozták. Különböző kismolekulájú- és polipeptid-hormonok, növekedési faktorok és neurotranszmitterek esetében igazolódott, hogy hatásukat az adenilcikláz rendszeren keresztül fejtik ki (2, 4, 7, 24, 28).

Az idegrendszer fejlődésének vizsgálatakor *in vivo* és *in vitro* rendszerekben egyaránt kimutatták, hogy a neuronális differenciálódás a cAMP-adenilcikláz rendszeren keresztül is szabályozódik (17, 18, 19, 29). A legújabb adatok emellett egyre inkább megerősítik a sejtkapcsolatok szabályozó szerepét (1, 10, 11, 12, 22). Különös jelentőséget kaphat ez a központi idegrendszerben, ahol két alapvető sejtípus, az idegsejtek és a gliasejtek igen szoros kölcsönhatásban működnek (27). Néhány szerző (5, 12) feltételezi, hogy a sejt-kölcsönhatások megvalósulásának egyik lehetséges útja az adenilcikláz rendszer.

Mindezen gondolatokat összekapcsolva munkánkban arra a kérdésre kerestünk választ, hogy az idegsejt-gliasejt kapcsolatokban szerepet játszhat-e az adenilcikláshoz kapcsolt membrán receptor, és ezen keresztül szabályozódhat-e a neuronális differenciálódás folyamata.

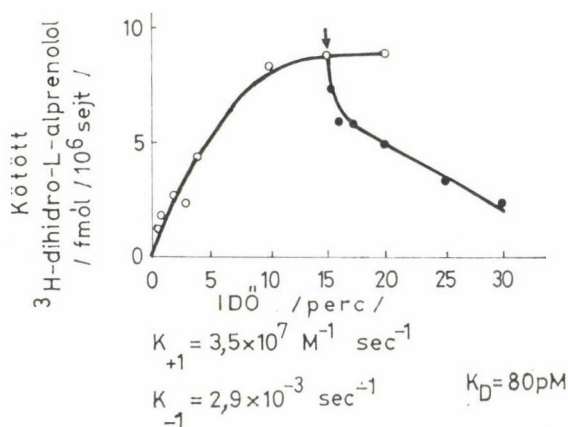
Korábbi munkánkban az adenilcikláz enzim béta-agonistákkal való aktiválhatóságának változását írtuk le az *in vitro* differenciálódás során ideg-glia szövettényezetekben (15). Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy az adenilcikláz aktiválhatósága fejlődés eredményeként alakult ki. Az érzékeny állapotban már 10^{-11} M béta-agonista L-noradrenalin is hatásosnak bizonyult az adenilcikláz enzim aktiválásában. Ez arra a feltételezésre vezetett, hogy az adenilcikláshoz kapcsolt membrán receptor igen nagy affinitású kötőhely lehet a sejt felszínén.

* X. Membrán Transzport Konferencián 1980. május 13–16. között Sümegen elhangzott előadás.

A kötőhely jellemzése

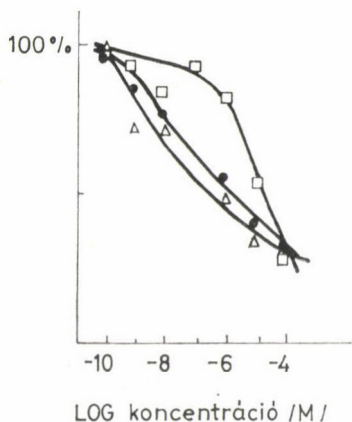
A kötőhely kinetikai és farmakológiai sajátosságainak vizsgálatához intact ideg-glia monolayer tenyészeteket használtunk, melyeket csirkeembrió előagy féltekékből indítottunk a már korábban ismertetett módon (16). Specifikus béta-receptor ligandként ^3H -L-dihidro-alprenololt* (^3H -DHA) alkalmaztunk (13). A nem specifikus kötés meghatározása nagy feleslegű jelzetlen L-alprenolol jelenlétében történt. A nem specifikus kötés kb. 20–30%-a volt az összkötésnek.

A specifikus kötetést 10^{-11} – 10^{-10} M ligand koncentráció tartományban vizsgálva telítődést találtunk $6\text{--}8 \times 10^{-11}$ M ^3H -DHA koncentrációnál. A kötés időfüggése szintén telítődést mutatott 10–15 perc inkubációs időknél. A kötés reverzibilitását mutatta, hogy a telítési időpontban adott nagy koncentrációjú, nem jelzett alprenolol gyors disszociációt okozott. Az asszociáció és disszociáció kinetikáját mutatja az 1. ábra. A kezdeti sebességekből számított disszociációs konstans $K_D = 80$ pM, amely alátámasztja, hogy a kötőhely valóban nagy affinitással rendelkezik. A kötés sztereospecifikus. A 2. ábrából látható, hogy D-propranololból kb. százszor nagyobb koncentráció szükséges ahhoz, hogy a kötött ^3H -DHA 50%-át helyettesítse a kötőhelyen, mint L-propranololból. A béta-antagonista L-propranolol jobban kötődik a receptorhoz, mint az L-alprenolol, a béta-agonista L-noradrenalin — amint azt a 3. ábra mutatja — azonban kevésbé vetélkedik a receptorhelyért. Ez megfelel a béta-receptoron az agyszövetnél tapasztalt élettani hatáserősségnek. Eredményeink alátámasztják, hogy kötőhelyünk valóban béta típusú receptorhely. Az alfa-receptor kölcsönhatás kizárására megmértük a kötetést D,L-fenoxi-

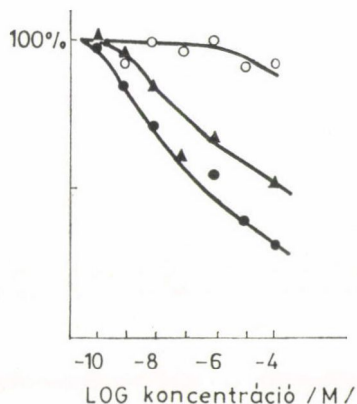


1. ábra. ^3H -DHA kötés időfüggése kevert idegsejt + gliasejt tenyészetekben, 8×10^{-11} M ligand koncentrációnál. A nyíllal jelzett pontban 8×10^{-6} M L-alprenololt adtunk

* Specifikus aktivitása = 69,7 Ci/mmol



2. ábra. A ^3H -DHA kötés sztereospecifitása. A kötőhelyért való vetélkedés mértékét az összkötés százalékában fejeztük ki. —●— = L-alprenolol, —△— = L-propranolol, —□— = D-propranolol



3. ábra. Vetélkedés a ^3H -DHA kötőhelyekért az összekötés százalékában kifejezve. —●— = L-alprenolol, —▲— = L-noradrenalin, —○— = D,L-fenoxibenzamin

benzamin növekvő koncentrációja mellett. A 3. ábrából látható, hogy az alfa-blokkoló vegyület az általunk alkalmazott koncentrációknál nem zavarja a béta-receptor kötődést.

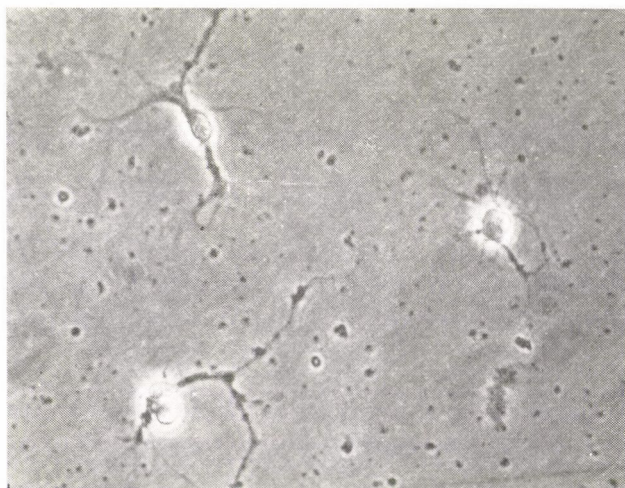
A kötőhely természetéről többet megtudhatunk, ha a kötődés ligand-koncentráció függését matematikai módszerekkel analizáljuk. Az általánosan alkalmazott Scatchard-féle ábrázolásban maximum jellegű görbét nyertünk, amely arra enged következtetni, hogy a kötőhelyek nem függetlenek, hanem ún. pozitív kooperativitásban működnek. Ezt alátámasztják a Hill szerinti ábrázolás eredményei, ahol a nyert egyenes meredeksége eltér 1-től, $n_H > 4$. Feltételezzük, hogy vagy már meglevő, vagy a hormon hatására kialakuló receptormezők találhatók a sejtek felszínén, melyek együttműködve reagálnak.

Ha összehasonlítjuk eredményeinket agyszövetből vagy tumoros eredetű szövettenyészetekből tisztított membránfragmentumokon nyert eredményekkel (például: 3, 14) több lényeges különbséget láthatunk. Intakt sejteken a telítődési ligand koncentráció és a K_D értéke legalább két nagyságrenddel kisebb, ami a kötőhely lényegesen nagyobb affinitását mutatja. A pozitív kooperativitás nem jelentkezik a membrán frakciókon, a matematikai analízisek annak teljes hiányát mutatják. Feltételezzük, hogy intakt sejteken a kooperativitás fenntartása állandó reguláció eredménye, és így a tisztítási folyamat során elvész.

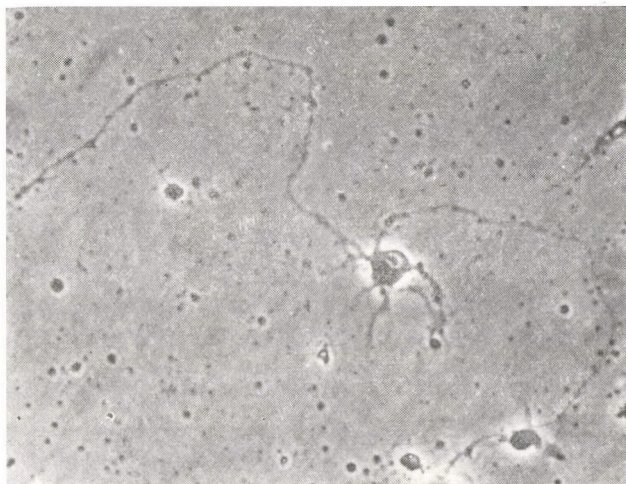
Béta-receptor koncentráció különböző összetételű tenyészetekben

Hogy a bevezetőben leírt feltételezésünket alátámasszuk, olyan tenyészetekben vizsgáltuk meg a ^3H -DHA kötődését, amelyekben glia-sejtek és idegsejtek az *in vitro* differenciálódás során egymástól elválasztva [tisztá neuron (21), ill. tiszta glia tenyészetek] vagy egymással szoros kölcsönhatásban voltak (kevert tenyészetek). Kísérletünk másik csoportjában a külső környezetet módosítottuk: idegsejteket tenyésztettünk béta-agonisták tartós jelenlétében vagy olyan tápoldatban, melyet glia-sejt tenyészetekről vettünk le (ún. glia kondicionált médium, GCM).

A morfológiai differenciálódást vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy 10^{-10} – 10^{-11} M béta-agonista L-noradrenalin vagy L-izoproterenol 48 órás kezelés alatt jelentősen elősegítette az idegsejtek fejlődését. Ez megmutatkozott a fokozott nyúlványképződésben és arborizációban, később a sejttest megnöve-



4. ábra. Öt napos idegsejt tenyészet polilizin rétegen (21), 8 napos csirkeembrióból indítva. Kontroll, 400×



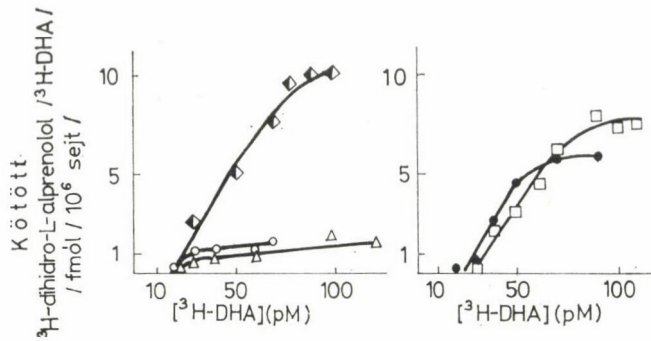
5. ábra. Öt napos idegsejt tenyészet, amely a 3. naptól (48 órán keresztül) 10^{-10} M L-noradrenalin jelenlétében fejlődött. A nyúlványok és a sejttest egyaránt fejlettebbek mint a kontrollban. 400 $\times$



6. ábra. Öt napos idegsejt tenyészet, amely a 3. naptól (48 órán keresztül) 10^{-10} M L-izoproterenol jelenlétében fejlődött. A nyúlványok és a sejttest egyaránt fejlettebbek mint a kontrollban. 400 $\times$

kedésében (4., 5. és 6. ábra). GCM 24 órás jelenléte szintén fokozta a nyúlványképződést.

A ^3H -DHA kötés koncentráció függését különböző tenyészetekben a 7. ábra mutatja. Idegsejt, illetve glia-sejt tenyészetekben igen alacsony a kötés. Lényegesen magasabb a kevert tenyészetekben, ahol az idegsejtek és a glia-sejtek egymással szoros kontaktusban differenciálódtak. A receptorhelyek



7. ábra. ^3H -DHA kötés koncentráció függése különböző tenyészetekben. — $\triangle$ — = gliasejtek, — $\circ$ — = idegsejtek (polilizinen), — $\diamond$ — = idegsejtek (polilizinen) melyek β -agonisták (L-noradrenalin vagy L-izoproterenol) jelenlétében fejlődtek 48 óráig keresztül, — $\bullet$ — = idegsejtek + gliasejtek kevert tenyészetben, — $\square$ — = idegsejtek + gliasejtek kevert tenyészetben (polilizinen)

nagyobb koncentrációja alátámasztja azt a feltevésünket, hogy az idegsejt-gliasejt kommunikáció az adenilcikláshoz kapcsolt béta-receptoron keresztül mediálódhat.

Béta-agonisták tartós jelenléte már igen kis koncentrációban is megnövelte az idegsejtek ^3H -DHA kötését, ez elérte, sőt meghaladta a kevert tenyészeteknél mért értéket. GCM-mal rövidebb kezelés is kifejezett emelkedést okozott a ^3H -DHA kötésben (még fel nem dolgozott adataink).

Az eredményeket az 1. táblázat foglalja össze, ahol a disszociációs állandók közelítő értékei, valamint a maximális kötő kapacitás ($B_{\max}$) van feltüntetve, 10^6 sejtre vonatkoztatva. $B_{\max}$ számszerűen jellemzi a tenyészetben a béta-receptor koncentrációt. Ezek az adatok igazolják, hogy béta-agonisták az adenilcikláz rendszeren keresztül vagy egyéb módon is, befolyásolják az idegsejtek fejlődését tenyészetben. A béta-agonisták jelenlétében fejlődött, differenciálódottabb sejtekben a kevert ideg-glia tenyészetekéhez hasonló a béta-receptor koncentráció, ami ismét alátámasztja, hogy a glia-sejtek az

1. táblázat

A disszociációs konstans (K_D), a maximális kötőkapacitás ($B_{\max}$), valamint az egy sejtre jutó kötőhelyek számának (B) értéke különböző tenyészetekben

Tenyészet	K_D (pM)	$B_{\max}$ (fmól/ 10^6 sejt)	B
Neuron (polilizin)	40	2,4	1440
Glia	53	2,1	1260
Neuron + glia	58	10,9	6540
Neuron + glia (polilizin)	58	12,9	7740
Neuron (polilizin) β -agonista előkezelt	59	16,5	9900

adenilcikláz rendszer közvetítésével kölcsönhatásba léphetnek az idegsejtekkel és ezen az úton befolyásolhatják, szabályozhatják differenciálódásukat.

A glia-sejtek és idegsejtek közötti információ átadásban más faktorok mellett béta-agonista természetű kémiai anyagok is részt vehetnek. Ezt a két utóbbi feltételezést a glia kondicionált médiummal kapott eredményeink erősen alátámasztják. Szintűgy azok a korábbi adatok, melyek szerint glia-sejtekben is mutattak ki transzmitter jellegű anyagokat, illetve azok anyageseréjében szereplő enzimeket (27).

Következtetéseink

- Eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, hogy a béta-receptor—adenilcikláz rendszer egyik fontos közvetítője a külvilágból érkező hormonális hatásoknak, melyek az idegrendszer fejlődését befolyásolják.
- Az idegrendszer két fő sejttypusának, az idegsejteknek és glia-sejteknek együttműködése ezen az úton is megvalósulhat, és ennek szintén szabályozó szerepet tulajdoníthatunk az idegsejtek fejlődésében.
- Az ideg-glia kommunikáció mediátora — egyebek mellett — béta-receptor agonista természetű anyag (vagy anyagok) lehet(nek), melyek az intercelluláris térbe jutva fejtik ki hatásukat béta típusú, adenilciklázhoz kapcsolt membrán receptoron, esetleg más módon is.
- Eredményeink igazolják, hogy intakt monolayer tenyészetekben megközelíthetők és jól karakterizálhatók a membrán receptorok, és lehetséges azok funkciójának megismerése.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Tóth Gézának a triciált alprenolol előállításáért, Szabó Máriának, Németh Józsefnének és Nagy Sándornének lelkiismeretes munkájukért.

IRODALOM

1. ADLER, R.—TEITELMAN, G.—SUBURO, A. M.: *Develop. Biol.* **50**, 48—57 (1976).
2. BLOOM, F. E.: *Federation Proc.* **38**, 2203—2207 (1979).
3. BYLUND, D. B.—SNYDER, S. H.: *Mol. Pharmacol.* **12**, 568—580 (1976).
4. DEVELLIS, J.—KUKES, G.: *Texas Rep. Biol. Med.* **31**, 271—293 (1973).
5. GILMAN, A. G.—SCHRIER, B. K.: *Mol. Pharmacol.* **8**, 410—416 (1972).
6. GREENBERG, D. A.—SNYDER, S. H.: *Mol. Pharmacol.* **14**, 38—49 (1978).
7. GREENGARD, P.: *Federation Proc.* **38**, 2208—2217 (1979).
8. HEIDEMANN, Th.—CHANCEUS, J. P.: *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 317—357 (1978).
9. HELDIN, C. H.—WESTERMARK, B.—WASTESON, A.: *Nature* **282**, 419—420 (1979).
10. HEUMANN, R.—ÖCALAN, M.—HAMPRECHT, B.: *Febs Letters* **107**, 37—41 (1979).
11. LATZKOVITS, L.: „Dynamic properties of glia cells” Pergamon Press (1978).
12. LAWRENCE, Th. S.—BEERS, W. H.—GILULA, N. B.: *Nature* **272**, 501—506 (1978).

13. LEFKOWITZ, R. J.—MUKHERJE, Ch.—COVERSTONE, M.—CARON, M. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 703—709 (1974).
14. LUCAS, M.—BOCKAERT, J.: *Mol. Pharmacol.* **13**, 314—329 (1977).
15. MADERSPACH, K.: *Cell. Molec. Biol.* **26**, 335—340 (1980).
16. MADERSPACH, K.—SENSENBRENNER, M.: *Experientia* **33**, 358—360 (1977).
17. PATTON, M. W.—NAHORSKI, S. R.—ROGERS, K. J.: *J. Neurochem.* **27**, 807—812 (1976).
18. PERKINS, J. P.—MOORE, M. M.: *Mol. Pharmacol.* **9**, 774—782 (1973).
19. PRASAD, K. N.: *Biol. Rev.* **50**, 129—265 (1975).
20. ROTMAN, A.: *Brain Res.* **146**, 141—144 (1978).
21. SENSENBRENNER, M.—MADERSPACH, K.—LATZKOVITS, L.—JAROS, G. G.: *Dev. Neurosci.* **1**, 90—101 (1978).
22. SENSENBRENNER, M.—MANDEL, P.: *Exp. Cell Res.* **87**, 159—167 (1974).
23. SCHMITT, H.—POCHET, R.: *Febs Letters* **76**, 302—305 (1977).
24. TAKASU, N.—CHARRIER, B.—MAUCHAMP, J.—LISSITZKY, S.: *Eur. J. Biochem.* **90**, 131—138 (1978).
25. TAYLOR, D. P.—PERT, C. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 660—664 (1979).
26. VAUQUELIN, G.—GEYENET, P.—HANOUNE, J.—STROSBERG, A. D.: *Life Sci.* **23**, 1791—1796 (1978).
27. VARON, S.—SAIER, M.: *Exp. Neurol.* **48**, 135—162 (1975).
28. WATLING, K. J.—DOWLING, J. E.—IVERSEN, L. L.: *Nature* **281**, 578—580 (1979).
29. WIEGANT, V. M.—GISPEN, W. H.: „Molecular and functional neurobiology” Elsevier (1976).