

MEMBRÁN RECEPTOROK VIZSGÁLATA SZÍV, AGY ÉS L-SEJTEK TENYÉSZETEIBEN

MADERSPACH KATALIN

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete

A β receptor adenilcikláz enzim vizsgálatára különösen alkalmas objektumok a szövettényészetek. Ilyen rendszereknél nem kell számolnunk ismeretlen idegi és humorális hatásokkal, melyek a válaszreakciót megváltoztatnák. Sok esetben módunk van tiszta tenyészettel dolgozni, amely kizárólag egyetlen sejtfeleséget tartalmaz. Komoly jelentősége van ennek a receptor-kutatásban is, ahol az azonos ingerre adott válaszreakció elsősorban magától a sejttől függ. A kutatók élnek is a szövettényészet adta lehetőségekkel, amint azt számtalan kísérleti adat mutatja.

Az adenilcikláz enzim működésének vizsgálatára igen egyszerű modellrendszerek a fibroblaszt sejtvonalak. Sok más sejthez hasonlóan a fibroblasztok is tartalmaznak katekolaminnal aktiválható adenilcikláz; β receptor blokkoló szerek jelenlétében az aktiválás nem jön létre (15, 16, 17), az enzim proszttaglandin E_1 -el is aktiválható (20, 21). A fibroblasztok adenoszin 3'-5'-ciklikus monofoszfát (cAMP) tartalma függ a tenyészetben a populációs denzitástól, azzal párhuzamosan nő. Az igen nagy sejtsűrűségnél fellépő növekedési kontakt gátlásért is a magas cAMP szint felelős (28). Saját kísérleteinkben (19) kimutattuk, hogy a cAMP szint emelkedése szerepet játszik a sejtmozgás kontakt gátlásának létrejöttében is. Alacsony populációs sűrűségű L-sejt kultúrákhoz adott 5×10^{-5} M izoproterenol (továbbiakban IP) szignifikánsan csökkenti a sejtmozgást; a fellépő kontakt gátlást β blokkoló dikloroizoproterenol (továbbiakban DCI) azonos koncentrációban kivédi. Feltételezzük, hogy a sejt-sejt kölcsönhatások közvetítésében a β receptor—adenilcikláz rendszer szerepet játszhat.

A szövettényészetek alkalmasak olyan bonyolult szervek adenilcikláz rendszerének vizsgálatára is, mint az agy vagy a szív. Különböző módszerekkel nyert és különböző tisztasági fokú tenyészeteken számos vizsgálat történt; az eredményekből a receptorok működésének molekuláris mechanizmusára próbálnak következtetni.

A szervekből sejt-disszociálással nyerhetők a *primer tenyészetek*, melyek meglehetősen komplex rendszerek, egymás mellett megtalálhatók bennük a szövet összes sejtfeleségei. Előnyük, hogy így lehetőségünk van a sejteket kölcsönös kapcsolataikban vizsgálni. Még egy fontos tulajdonságuk, mely

a kutatómunka szempontjából előnyös, hogy a tenyészet indításának pillanatától állandóan fejlődnek, differenciálódnak, szerveződnek és így a jelenségeket *fejlődésükben* tanulmányozhatjuk az ilyen objektumokon.

A rendszert egyszerűsíthetjük, ha a tenyészet indításakor sejtszeparálást végzünk; így egyetlen sejtfeleséget tartalmazó *tiszta tenyészetet* nyerhetünk. A primer tenyészetekkel azonban technikailag meglehetősen nehézkes dolgozni, mivel minden alkalommal újra kell indítani őket. Ezért előszeretettel dolgoznak *klónolt sejtvonalakon*, amelyek sejtjei viszonylag állandó tulajdonságokkal rendelkeznek, jól passzálhatók és gyakran korlátlan ideig fenntarthatók. Ilyen sejtvonalat leginkább tumoros szövetekből szoktak indítani. Ennek hátránya, hogy a tumoros sejtek sokszor éppen az adenileikláz enzim működésének tekintetében térnek el a normál sejtektől. Kimutatták (39), hogy a tumorsejtek cAMP tartalma különbözik a normál sejtektől és ez összefügg a malignitás fokával is. Technikai előnyei miatt mégis sok vizsgálat történt ilyen sejtvonalakon. Különösen részletesen vizsgálták egy egér szimpatikus ganglion tumorból izolált neuroblasztóma sejtvonalat (1), melynek sejtjei bizonyos körülmények között a neuronokhoz hasonló tulajdonságokat mutatnak. SCHUBERT és munkatársai (29, 30, 31, 32) dibutiril cAMP kezeléssel, vagyis az endogén cAMP szint emelésével morfológiai differenciálódást tudtak kiváltani ezekben a sejtekben, amelyet számos biokémiai paraméter változása is követ: neuronokra jellemző enzimek megjelennek, illetve aktivitásuk megnő (18, 29, 30, 31); az adenileikláz enzim prosztaglandin E_1 -gyel aktiválható (33, 29); elektromos, illetve kémiai ingerrel akciós potenciál indukálható (3, 4, 25, 26, 27). A neuroblasztóma kultúrákon kapott eredmények azonban csak komoly megszorításokkal adnak információt a neuronok működésére.

Számos vizsgálat történt glia sejtvonalakon is. Ezeket leggyakrabban asztrocitóma és glioblasztóma tumorokból izolálják, de normál sejtpopulációból is nyerhetők. A gliasejtek adenileikláz enzimje katekolaminokkal aktiválható, epinefrin, norepinefrin, izoproterenol csökkenő mértékben emeli a cAMP szintet, a hatás β blokkoló szerekkel kivédhető (5, 34). Prosztaglandin E_1 szintén aktiváló hatású, foszfodiesteráz enzim gátló teofillin tovább fokozza a cAMP akkumulációt a gliasejtekben (8). GILMAN és NIERENBERG (8) szerint a gliasejtek adenileikláz enzimjének a neuron-glia kommunikációban van szerepe, neuron eredetű anyagok hatásukat a gliasejtek cikláz-receptorán keresztül fejthetik ki.

Mint említettem, a fenti rendszereknél komplexebb, de ennek megfelelően jobb modellrendszereknek látszanak a neuroglia primer tenyészetek, ahol idegsejtek és gliasejtek kölcsönhatásukban és fejlődésükben vizsgálhatók. Primer tenyészetet leginkább embrionális szövetekből szoktak készíteni és előszeretettel alkalmazzák a csirkeembriót mint objektumot, de történtek vizsgálatok emlős szövetekből is. A csirkeembrió neuroglia tenyészet *in vitro*

morfológiai differenciálódását SENSENBRENNER és munkatársai (2, 35) részletesen leírták. Patkányembrió agytenyészetben GILMAN és SCHRIER (9) az adenilcikláz tulajdonságait vizsgálták: az enzimet izoproterenol-aktiválhatónak találták, az aktiválást dikloroizoproterenol kivédte. Proszttaglandin E_1 szintén aktiválta az enzimet. Megfigyelték, hogy a kapott cAMP szint emelkedés a tenyésztési idővel fokozatosan nőtt. Feltételezik, hogy a neuroglia primer tenyészet alkalmas modellrendszer az idegsejtek és gliasejtek adenilcikláz rendszerének vizsgálatára.

Hasonlóképpen jó modellrendszernek találták a szívizomműködés vizsgálatára az embrionális szívizomból indított primer kultúrákat, amelyek egyedileg pulzáló mioblasztokat tartalmaznak. Ezekből viszonylag egyszerű módszerekkel eltávolíthatók a fibroblasztok és így tiszta, csak mioblasztokat tartalmazó tenyészetek készíthetők. Csirke és patkányembrióból nyert tenyészetek *in vitro* morfológiai differenciálódását — szerveződését részletesen vizsgálta több munkacsoport is (10, 11, 12, 13, 14, 40). Elektrofiziológiai-, és membrántulajdonságok szempontjából SPERELAKIS és munkatársai (23, 24, 36, 37, 38) vizsgálták a mioblaszt kultúrákat. Megállapították, hogy az *in situ* vagy átáramoltatott szíven megismert farmakológiai hatások ezen a rendszeren is kimérhetők.

Kísérleteinkben csirkeembrió neuroglia és mioblaszt tenyészeteket vizsgáltunk és arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a jól követhető *in vitro* morfológiai differenciálódás együtt jár-e valamilyen változással az adenilcikláz enzim hormon-érzékenységében.

A ciklikus AMP tartalom vizsgálata differenciálódó szövettenyészetekben

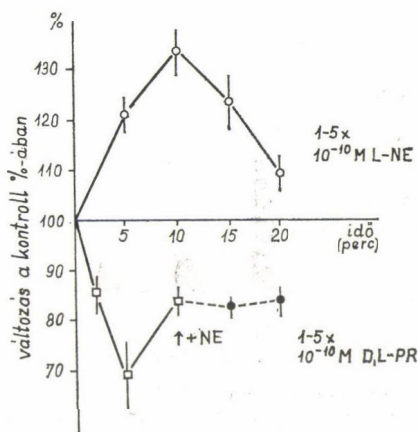
Primer tenyészeteket készítettünk 8 és 11 napos csirkeembrió előagy-féltekékből és szívkamrákból sejt-disszociálással MARK és STRASSER (22) módosított módszere alapján. Kalcium-magnézium mentes Hank-oldatban oldott 0,05%-os tripszint (Difco) alkalmaztunk, 37°-on $2-3 \times 5$ perces tripszinezést végeztünk, minden lépésben jéghideg borjúsavóval állítottuk le az emésztést. A frakciókat egyesítettük, centrifugáltuk, Ca^{2+} — Mg^{2+} mentes Hank-oldattal mostuk a sejteket, majd szélesztettük plasztik tenyésztőedényekbe 80–100 000 sejt/cm² denzitásban. A tenyésztéshez Eagle minimal médiumot (Difco) használtunk, amelyet a szívizom tenyészeteknél 10%, az előagy tenyészeteknél 20% embrionális borjúsavóval (Flow) egészítettünk ki. A szívizom tenyészetekből 90 perces előülepítéssel szeparáltuk a fibroblasztokat. Az előagy tenyészetek a teljes sejtpopulációt tartalmazták. 5% CO₂-ot tartalmazó levegővel áramoltatott inkubátorban 24, 48, 72 óráig, vagy hosszabb ideig tenyésztettük a sejteket.

A tenyészetek morfológiai differenciálódását az 1—3 számú (szív) és 4—6. számú (előagy) ábrák mutatják. A szeparált mioblasztok már 1 órával a tenyésztés után pulzálni kezdenek, 24 órás tenyészetben (1. ábra) a sejtek kör alakúak, külön állnak és egyedi frekvenciával dobognak. 48 óra múlva (2. ábra) differenciált alakot mutatnak, kezdenek kinyúlni és ún. pulzáló centrumokba gyülekeznek, melyben a sejtek szinkron vernek. Idősebb tenyészetben fokozatosan kialakulnak a fuzionált sokmagvú izomelemek, folyamatos sejtréteget képeznek, amely egységesen pulzál (3. ábra, 8 napos tenyészet). Az előagy tenyészetekben a sejtek csoportokba aggregálódva üledpednek ki, 24 óra múlva (4. ábra) kezdenek kivándorolni a gliasejtek és kinyúlnak a neuronok nyúlványai, 48 órás tenyészetben (5. ábra) kezd létrejönni a gliasejtek összefüggő rétege, melynek tetején alkotnak hálózatot a neuronok (6. ábra, 8 napos tenyészet).

A hormonérzékenység tesztelésére párhuzamosan két rendszert alkalmaztunk: a szívizomsejtek pulzálás frekvenciájának változását, valamint a szív és előagy tenyészetek cAMP tartalmának mérését GILMAN módszerével (7) a jelzett cAMP hígulása alapján. A vizsgált hormonok L-norepinefrin (továbbiakban NE) és néhány esetben D,L-izoproterenol (IPNE) $1-5 \times 10^{-10}$ M koncentráció tartományban. Megvizsgáltuk egy β blokkolószert, a D,L propranolol (PR) hatását is a hormonnal azonos koncentrációban. Ezeket az anyagokat a szívizomsejtek pulzálás frekvenciájának mérésénél közvetlenül a tápoldatba tettük. A cAMP tartalom mérésénél az inkubációs elegy egy Ca-mentes izozmotikus oldat volt, az inkubációs idő 10 perc, PR előkezelésnél $5 + 10$ perc, 37° -on 5% CO_2 -dal áramoltatott inkubátorban.

A szövettényészetek mioblasztjainak pulzálás frekvenciája igen könnyen mérhető mikroszkóp alatt; egyszerű és érzékeny módszer hormonok és drogok kronotróp és inotróp hatásainak kimutatására. Ez a rendszer kínálkozott gyors kontrollnak, hogy megállapíthassuk, tenyészetünk érzékeny-e a hormonokra, alkalmas-e az objektum arra, hogy a cAMP szint változásait teszteljük, hogy milyen koncentráció tartomány és inkubációs idő a legoptimálisabb.

Katekolaminok frekvencianövelő hatását csirkeembrió mioblasztokra ERTEL és munkatársai (6) írták le, patkány mioblasztokra WOLLENBERGER és HALLE (11, 12, 40). Eredményeikkel összhangban azt találtuk, hogy $1-5 \times 10^{-10}$ M L-NE beadását követően azonnal jelentkezik a pozitív inotróp hatás. A reakció időbeli lefolyását a 7. ábra mutatja. A frekvencia változását az alapfrekvencia százalékában adtuk meg, önkontrollt alkalmazva. Minden pont 20—30 sejten mért érték átlaga. Az ábráról leolvasható, hogy a frekvencianövekedés 10 perc múlva éri el a maximumát, és 20 perc múlva már közelít az alapértékhez. Ez ellentétben van ERTEL és munkatársainak (6) eredményeivel, akik mindaddig magasnak találták a pulzálás frekvenciát, amíg a hormon jelen volt a tenyészetben. A hatásos koncentráció tartomány

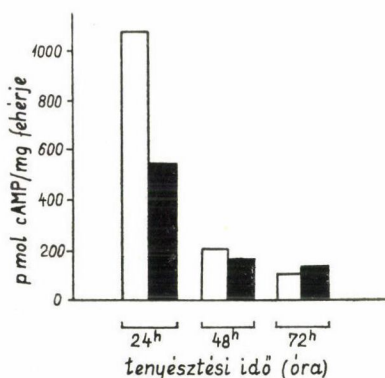


7. ábra. Szívizom sejtek pulzálás-frekvenciájának változása —○— = L-norepinefrin(NE), —□— = D, L-propranolol (PR) és —●— = D, L-PR + L-NE együttes hatására a beadástól számított idő függvényében

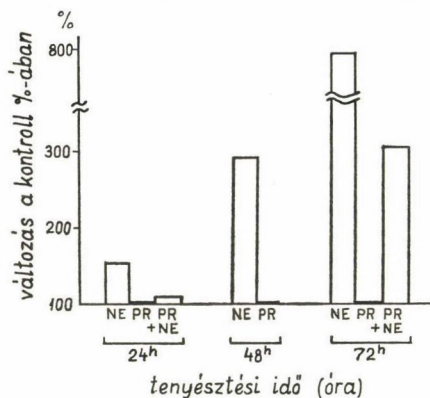
igen szűk: $1-5 \times 10^{-10}M$; $10^{-9}M$ L-NE már túl sok és a sejtek tetanuszban megállnak, $10^{-11}M$ pedig már nem befolyásolja lényegesen a frekvencia értékét. A jelzett koncentráció tartományban kapott változások szignifikánsak, a NE hatására 10 perc alatt $33,8 \pm 4,6\%$ -kal emelkedett a pulzások gyakorisága. A β blokkoló PR azonos koncentrációban érdekes módon jelentősen csökkentette a pulzálás frekvencia értékét 5 perc alatt $31,2 \pm 7,1\%$ -kal, a negatív inotróp és gyakran kronotróp hatást 10 perc múlva adott L-NE még kétszeres koncentrációban sem tudta megszüntetni (10 perccel később $16,5 \pm 2,9\%$ -kal alacsonyabb a kontrollnál).

A kimért frekvenciaváltozások függetlenek az embrió korától és a tenyésztési időtől.

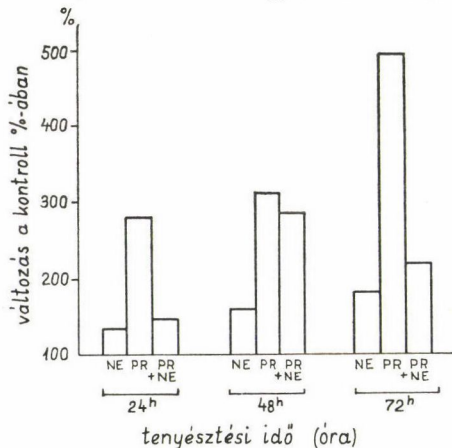
A cAMP tartalom mérésének eredményeit szemlélteti a 8., 9. és 10. ábra. A 8. ábra a kezeltlen tenyészetek cAMP tartalmát mutatja pmol-cAMP/mg fehérje értékben kifejezve. A tenyésztési idő előrehaladtával a cAMP alapszintje csökkenő tendenciát mutat. A 9. és a 10. ábrán a kezelések hatására létrejövő változás mértékét a kontroll érték százalékában adtuk meg a tenyésztési idő függvényében. Minden pont 3–4 meghatározás átlaga. A 9. ábráról a szívizomtenyészetben kapott eredményeket olvashatjuk le. $10^{-10}M$ L-NE 10 perces kezelés alatt jelentősen megnöveli a sejtek cAMP tartalmát. Az azonos hatásra kapott válaszreakció a differenciálódási folyamat előrehaladtával fokozatosan erősödik (24 órás: 51%, 48 órás: 194%, 72 órás: 640%-os emelkedés). A hormonkezelés előtt 5 perccel beadott β blokkolószert ($10^{-10}M$ D,L-PR) a megvizsgált esetekben a NE aktiváló hatását 60–70%-kal csökkentette. A PR önmagában nem volt hatással a mioblasztok cAMP tartalmára.



8. ábra. Tenyészetek cAMP tartalmának (p mol cAMP/mg fehérje) változása a tenyésztési idővel. □ = szívizom tenyészetekben, ■ = előagy tenyészetekben



9. ábra. 24, 48 illetve 72 órás szívizom tenyészetek cAMP tartalmának (p mol cAMP/mg fehérje) változása 10^{-10} M L-norepinefrin (NE), 10^{-10} M D,L-propranolol (PR) valamint 10^{-10} M D,L-PR + 10^{-10} M L-NE együttes hatására



10. ábra. 24, 48 illetve 72 órás előagy tenyészetek cAMP tartalmának (p mol cAMP/mg fehérje) változása 10^{-10} M L-norepinefrin (NE), 10^{-10} M D,L-propranolol (PR) valamint 10^{-10} M D,L-PR + 10^{-10} M L-NE együttes hatására

A fentiekhez hasonló tendencia mutatkozik a fejlődő előagytenyészeteknél is. Az eredményeket a 10. ábra mutatja. 10 perces NE kezelés 10^{-10} M koncentrációban jelentősen megemelte a cAMP szintet, a válaszreakció mértéke a tenyésztési idő előrehaladtával fokozatosan nőtt (24 órás: 35% — 48 órás: 60% — 72 órás: 80%-os emelkedés). A β blokkoló PR önmagában is jelentősen megemelte a cAMP szintet. NE-nel együtt kevésbé. A válaszreakció fokozódó jellege itt is megmutatkozik a tenyészetek differenciálódásával párhuzamosan.

A cAMP szint változásaiban nem találtunk eltérést a 8 és 11 napos embriókból indított tenyészetek között. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy tenyésztéskor a sejtek mintegy „dedifferenciálódnak”, egy korábbi fejlődési foknak megfelelő állapotba kerülnek és ez a már kialakult különbségeket megszünteti. Ezt az elképzelést SPERELAKIS és munkatársainak (23, 24, 36) eredményei vetik fel, akik kimutatták, hogy pulzáló szívizomtenyészetek cAMP tartalma a fiatalabb embriószívvel egyezik meg. Ugyancsak fiatalabbnak megfelelő állapotba kerül vissza a Na-K transzport mechanizmusa.

Eredményeink alapján úgy látszik, hogy az embrionális eredetű, in vitro differenciálódó kultúrák morfológiai változásával párhuzamosan megváltozik a β receptor—adenilcikláz rendszer hormon-aktíválhatósága is; a fejlődéssel párhuzamosan az azonos ingerre kapott válaszreakció mértéke fokozódó tendenciát mutat.

IRODALOM

1. AUGUSTI-TOCCO, G.—SATO, G.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **64**, 311—315 (1969).
2. ATHIAS, P.—SENSENBRENNER, M.—MANDEL, P.: Differentiation **2**, 99—106 (1974).
3. CHALAZONITIS, A.—GREENE, L. A.—NIRENBERG, M.: Brain Research **68**, 235—252 (1974).
4. CHALAZONITIS, A.—GREENE, L. A.: Brain Research **72**, 340—345 (1974).
5. CLARK, R. B.—PERKINS, J. P.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68**, 2757—2760 (1971).
6. ERTEL, R. J.—CLARKE, D. E.—CHAO, J. C.—FRANKE, F. R.: J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics **178**, 73—80 (1971).
7. GILMAN, A. G.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **67**, 305—312 (1970).
8. GILMAN, A. G.—NIRENBERG, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68**, 2165—2168 (1971).
9. GILMAN, A. G.—SCHRIER, B. K.: Molecular Pharmacology **8**, 410—416 (1972).
10. GOSHIMA, K.: Exp. Cell Res. **84**, 223—234 (1974).
11. HALLE, W.—WOLLENBERGER, A.: Zeitschrift für Zellforschung **87**, 292—314 (1968).
12. HALLE, W.—WOLLENBERGER, A.: Amer. J. Cardiology **25**, 292—299 (1970).
13. HARARY, I.—FARLEY, B.: Exp. Cell Res. **29**, 451—465 (1963).
14. HARARY, I.—FARLEY, B.: Exp. Cell Res. **29**, 466—474 (1963).
15. JOHNSON, G. S.—MORGAN, W. D.—PASTAN, I.: Nature **235**, 54—56 (1972).
16. JOHNSON, G. S.—PASTAN, I.: Nature New Biology **237**, 267—268 (1972).
17. JOHNSON, G. S.—PASTAN, I.: J. Nat. Cancer Inst. **47**, 1357—1364 (1971).
18. LANKS, K. W.—DORWIN, J. M.—PAPIRMEISTER, B.: J. Cell Biol. **63**, 824—830 (1974).
19. MADERSPACH, K.—FARKAS, T.: Life Sci. **12**, 413—418 (1973).
20. MANGANIELLO, V.—VAUGHAN, M.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 269—273 (1972).
21. MANGANIELLO, V.—BRESLOW, J.: BBA **362**, 509—520 (1974).
22. MARK, G. E.—STRASSER, F. F.: Exp. Cell Res. **44**, 217—233 (1966).
23. MCLEAN, M. J.—SPERELAKIS, N.: Exp. Cell Res. **86**, 351—364 (1974).
24. MCLEAN, M. J.—LAPSLEY, R. A.—SHIGENOBU, K.—MURAD, F.—SPERELAKIS, N.: Developmental Biol. **42**, 196—201 (1975).

25. NELSON, P.—RUFFNER, W. NIRENBERG, M.:—Proc. Nat. Acad. Sci. USA **64**, 1004—1010 (1969).
26. NELSON, P. G.—PEACOCK, J. H.—AMANO, T.—MINNA, J.: J. Cellular Physiol. **77**, 337—352 (1971).
27. NELSON, P. G.—PEACOCK, J. H.—AMANO, T.: J. Cellular Physiol. **77**, 353—362 (1971).
28. OTTEN, J.—JOHNSON, G. S.—PASTAN, I.: BBRC **44** 1192—1198 (1971).
29. PRASAD, K. N.: Proc Soc. Exp. Biol. and Med. **140**, 126—129 (1972).
30. PRASAD, K. N.—MANDAL, B.: Exp. Cell Res. **74**, 532—534 (1972).
31. PRASAD, K. N.—VERNADAKIS, A.: Exp. Cell Res. **70**, 27—32 (1972).
32. SCHUBERT, D.—JACOB, F.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **67**, 247—254 (1970).
33. SCHUBERT, D.—HUMPHREYS, S.—DEVITRY, F.—JACOB, F.: Developmental Biol. **25**, 514—546 (1971).
34. SCHULTZ, J.—HAMPRECHT, B.—DALY, J. W.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 1266—1270 (1972).
35. SENSENBRENNER, M.—MANDEL, P.: Exp. Cell Res. **87**, 159—167 (1974).
36. SHIGENOBU, K.—SPERELAKIS, N.: Developmental Biol. **39**, 326—330 (1974).
37. SPERELAKIS, N.—SHIGENOBU, K.: J. Molec. and Cell. Carciol. **6**, 449—471 (1974).
38. SPERELAKIS, N.—FORBES, M. S.—SHIGENOBU, K.—COBURN, S.: J. Molec. and Cell. Cardiol. **6**, 473—483 (1974).
39. TISDALE, M. J.—PHILLIPS, B. J.: Exp. Cell Res. **88**, 111—120 (1974).
40. WOLLENBERGER, A.: Circulation Res. **15**, 184—201 (1964).