

Beszámoló jelentés a "NEUROMODULÁCIÓ SEJTSZINTŰ MECHANIZMUSAINAK VIZSGÁLATA IDEG-IZOM ÉS IDEG-MIRIGY KAPCSOLATOKBAN" c. T043216 számú OTKA pályázat teljesítéséről.

A nyálmirigy funkcionális morfológiája:

A táplálkozás, különösen annak kezdeti fázisa, a különböző szervek, mint pl. az ajkak, a radula, a nyelőcső, a bukkális izmok valamint a nyálmirigy komplex, összehangolt működésének az eredménye. Miközben a táplálkozás idegi szabályozásának tanulmányozásában jelentős előrehaladás történt kevés figyelmet fordítottak a nyáleválasztás és kiválasztás mechanizmusának vizsgálatára. Gasztropodák nyálmirigy neuroeffector rendszere a páros nyálmirigyből és a bukkális ganglionokból áll. Ez a modell- rendszer kiváló lehetőséget biztosít a neuro-muszkuláris és neuro-glanduláris szinapszisok, a nyáleválasztás mechanizmusának és a nyál- transzport idegi szabályozásának vizsgálatára. Jelen beszámoló azokat az eredményeinket mutatja be, amelyeket az OTKA támogatásával végeztünk 2003-2006 között, a HPLC, bioassay, immunhisztokémiai molekuláris biológiai valamint elektrofiziológiai (voltage-clamp) módszerek kombinálásával. Vizsgálatainkat kiterjesztettük a) a serotonin (5-HT), dopamine (DA) és néhány neuropeptid mint pl. az FMRFa, APGWa, CARP, a MIP-peptidcsalád és a PACAP modulátoros hatásának vizsgálatára; b) az 5-HT és DA receptor altípusainak jellemzésére; c) a mirigy sejtekben lévő ionáramok leírására és jellemzésére; d) a mirigysejtek közötti kapcsolatok morfológiai (IH) és elektrofiziológiai jellemzésére; e) a programozott sejthalál szerepére a nyálkiválasztásban ; valamint f) a peptidhatás második messenger rendszerének vizsgálatára. Következtetéseinket és az új eredményeket kövér dőlt betűvel emeltük ki a szövegben.

I. Első lépésben a nyáltermelés és kiválasztás morfológiai és fiziológiai alapjait vizsgáltuk. Célunk a nyálmirigyben lévő sejtípusok azonosítása, továbbá a különböző sejtípusok funkcionális szerepének meghatározása volt. Harmadik lépésként a nyálfelszabadulás celluláris mechanizmusát kívántuk feltárni.

A tüdős csigákban a komplex anatómiai szerveződésű nyálmirigy számos acinusból áll melyekből a nyál az interlobuláris vezetékeken keresztül a páros, izmosfalú elsődleges nyálvezetéken keresztül jut el a bukkális üregbe. Korai hisztológiai és hisztokémiai munkákban nagyszámú sejtípus jelenlétet tételezték fel az acinusban (Krijgsman et al. 1955; Walker 1970; Moya et al. 1992). Különböző hisztokémiai eljárás alkalmazásával háromféle sejtípust azonosítottunk: mukocitákat, granuláris és vakuolizált sejteket. Megállapítottuk, hogy a sejtípusok száma és eloszlása eltérő az inaktív (nem táplálkozó) és aktív (táplálkozó)

állatokban. Az aktív állatokban kitégült intralobuláris nyálvezetékeket figyeltünk meg, amelyek sohasem voltak jelen az inaktív állatokban. Az aktív állatokban ezen kívül még egy sejtípust is azonosítottunk: az ún. „cisztikus” sejtet. A cisztikus sejt egyetlen hatalmas nyálcsőből áll, melyet a citoplazma vékony gyűrűként fog közre és a sejtmag a perifériára szorul. A korábban a cisztikus sejtet véletlenszerűen figyelték meg, mivel nem fordítottak figyelmet arra, hogy a csiga aktív (táplálkozó) vagy inaktív állapotban volt-e. A mirigyben mukózus és szerózus sejteket egyaránt kimutattunk és megállapítottuk, hogy **a különböző sejtípusok eloszlása, elhelyezkedése az acínusban nem homogén**. A vakuolizált sejtek a nyálvezeték közelében, míg a mukociták a véredény közelében csoportosultak. A sejtek szabálytalan elhelyezkedése az acínusban valamint eltérő eloszlása az inaktív és aktív állatokban azt sugallta, hogy a nyálmirigyben állandó **megújulási vagy szekréciós ciklus** van jelen (Boer 1967; Kater et al. 1978). Hematoxilin-eozin festéssel egy osztódó sejtréteget találtunk, melynek jelenlétét anti-humán antitesttel is megerősítettük. A sejtek korai proliferációját immuncitokémiai módszerrel is kimutattuk monoclonális (mouse anti-human Ki-67, Histopathology Ltd.) és polyclonális (rabbit anti-human Ki-67) antigénekkal aktív és inaktív állatokban. A Ki-67 kitég histopatológiában az osztódó sejtek kimutatására alkalmazzák.

Félvékony (1-2 micron) Araldit-ba ágyazott toluidin kékkel festett metszetek analízise jelezte, hogy az exocitózis mellett, a nyálfelszabadulás a sejtek lízisével is létrejöhet, mivel az intralobuláris tárgulatokban sejtörmeléket figyeltünk meg. Feltételeztük tehát, hogy a mucos felszabadulása a cisztikus sejt teljes pusztulásával megy végbe (holocrin mechanizmus). Annak eldöntésére, hogy a sejt pusztulása nekrotikus vagy genetikailag programozott (apoptózis) folyamat speciális kitégeket alkalmaztunk. Az apoptózis jelenlétét kimutató kitég alkalmazásával (Annexin V-CY3, Sigma) megállapítottuk, hogy az aktív csigákban, amelyekben a cisztikus sejtek jelen voltak a nyálfelszabadulás apoptotikus úton is végbemehet, mivel az apoptotikus sejtek száma jelentősen megnőtt. ***Ez új megfigyelés volt, amely nem szerepelt a munkatervben, de amelynek a továbbvitele új eredményekkel kecsegtetett.***

Gerincesekben komplex kapcsolatot tártak fel a sejt proliferáció és a sejtek pusztulása között nyálmirigyben. Kimutatták, hogy az acinus és a vezeték sejteiben jelen van a proliferáció és apoptózis, amely folyamatok biztosítják a sejtek szabályozott megújulását, újratermelődését, amely tulajdonság számos exocrin mirigyre jellemző, és amely pathológiás esetekben válhat/válhat jelentőssé (Actis et al.2002).

II. A következő kísérletek célja a nyálfelszabadulás celluláris mechanizmusának a megismerése volt. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az exogén vagy az idegingerlésére felszabaduló transzmitter képes programozott sejthalált (PCD) kiváltani. Vizsgáltuk továbbá a citochrom c felszabadulást, a caspase-9 és caspase-3 enzimek aktiválódását annak érdekében, hogy a PCD intracelluláris útvonalát felfedjük. A caspázok aktiválódását active caspase antitestekkel immunhisztokémialag határoztuk meg.

Megállapítottuk, hogy a csiga nyálmirigy ideális modellnek bizonyult a transzmitter szabályozott PCD molekuláris mechanizmusának a tanulmányozására. Előző eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy az exocitotikus nyálfelszabadulás mellett a másik lehetséges mechanizmus a nagymennyiségű mucus felszabadítására: a sejtek teljes pusztulása. Annak tisztázására, hogy a nyálfelszabadulás PCD útján valósult meg többféle megközelítést alkalmaztunk. Egész nyálmirigyben a PCD sejtek kvantifikálása nem lehetséges ezért 16 μ cryosztát metszeteket készítettünk és a TUNEL-módszert (TACS-XL DAB) alkalmaztuk a PCD sejtek meghatározására egy adott területen (1 mm²). A TUNEL módszerrel a DNS fragmentációja detektálható (az apoptosist kísérő alapjelenség) és a DAB módszernek köszönhetően a PCD sejtek magjai barna színezetet kapnak és fénymikroszkópos szinten azonosíthatók. Azt találtuk, hogy az aktív állatokban a PCD sejtek száma magasabb az inaktív állatokhoz képest. Fiziológus ingerek hatására, mint pl. exogén transzmitter (DA, 5-HT, ACh) alkalmazása vagy idegingerlés hatására az PCD sejtek száma szintén megnőtt. Kimutattuk, hogy a kiválasztott nyál mennyiségét az exogén transzmitterek a következő hatásossági sorrendben stimulálták: DA ($K_D = 1.7 \times 10^{-7}$ M) > 5-HT ($K_D = 1.2 \times 10^{-6}$ M) > ACh ($K_D = 1.15 \times 10^{-5}$ M). **A DA tehát hatásosan növelte a kiválasztott nyál mennyiségét és a PCD sejtek számát is.** Az eticlopride egy D2 receptor antagonistája jelenlétében a DA nem növelte a PCD sejtek számát, melynek alapján feltételeztük, hogy **a DA indukált PCD a nyálfelszabadulás fiziológiai útja.**

A caspázok inaktív precursorként vannak jelen a sejtekben, de amint a sejt PCD szignált kap proteolízis útján az enzimek aktív molekulává alakulnak. A következő lépésben a PCD intracelluláris utvonalát kiderítendő az aktív caspáz-9 jelenlétét mutattuk ki. A caspáz-9 egy ún. iniciátor molekula, amely az apoptózis korai fázisában jelenik meg. Az aktív caspáz-9 jelenlétét közvetett úton a Mitocapture apoptosis detection-kittel (MBL, Japan) mutattuk ki, amely a mitochondrium transzmembrán potenciál változását detektálja, és amely szintén a PCD korai szakaszára jellemző. A DA stimulált sejtuszuspenzióban az active caspáz-9-t tartalmazó sejtek száma szignifikánsan megnőtt. A következő kísérletsorozatban a végrehajtó (executor) aktív caspáz-3 molekula jelenlétét mutattuk ki. A caspáz-3 molekula a

citoplazmában lokalizálódott, a mucos és a sejtmag nem tartalmazott aktív kaszpáz-3 molekulát. A fiziológiai ingerek, amelyekkel PCD-t lehetett kiváltani növelték a kaszpáz-3 pozitív sejtek számát is.

Konklúzió *A csiga mirigysejtjeiből a mucos felszabadulása a mitochondrium-kaspáz mediált programozott sejthalál útján történik. Eredményeink egy új típusú, transzmitter mediált PCD mechanizmus jelenlétét bizonyították a nyálmirigyben, amely a mitochondrium-caspase –függő útvonalon valósul meg. Az aktív állatok mirigysejtjeiben a PCD-re jellemző tipikus morfológiai változásokat figyeltünk meg, mint pl. a szóma zsugorodását, DNS fragmentációt és membrane hólyagok (blebbing) kialakulását. A nyálmirigy ideg ingerlése vagy az exogén DA növelte a PCD-t mutató sejtek számát inaktív és aktív állatokban egyaránt, kb. egyenlő mértékben annak ellenére, hogy az aktív állatokban PCD –t mutató sejtek száma magasabb volt. A D2 receptor antagonistá és a tetraethylammonium (TEA) a delayed K-áramot gátló koncentrációban csökkentette DA-indukált PCD sejtek számát. Feltételezzük, hogy a PCD-t nemcsak gének, hanem olyan fiziológiás ingerek, mint pl. a transzmitterek és az ion-homeosztázis változása is képes szabályozni.*

III. A nyálmirigy sejtek elektromos tulajdonságainak a meghatározása volt, különös tekintettel a 1) sejtközi ingerületterjedésre, 2) a mirigysejt ionáramainak jellemzésére.

A kísérletekben elektrofiziológiai, elektronmikroszkópi és immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk. Az ultrastrukturális vizsgálatok alapján legalább kétféle kapcsolat volt felfedezhető a szomszédos mirigysejt között: i) desmosome-szerű (zonula adherens) és ii) gap junction- szerű struktúrák. A membrán kapcsolatok fehérjéinek meghatározására a *Drosophila* innexin- és a gerinces agyra jellemző connexin-36 antiszérumokat alkalmaztuk. A connexin-36 antitesttel nem kaptunk pozitív reakciót, míg ellenben az anti-innexin2 (Stebbins et al. 2000), pozitív immunoreakciót adott. A háttéraktivitást csökkentve (PhotoShop 7.0) világossá vált, hogy az innexin2 immunoreaktivitás a mirigy sejtek közötti membránra lokalizálódik és a citoszólban pozitív jel nem található. **A sejtek közötti elektromos kapcsolat az acinusban lévő sejtek szinkronizált működését biztosítja, hiszen az innerváció szegényes, valódi szinaptikus kapcsolatokat nem találtunk.** Az elektromos jel kb. hét sejten keresztül megközelítően 60-65 %-al csökkent, mivel a kapcsoló vagy áttevődési együttható kb. 70 μ távolságra 0.24 volt.

A nyálmirigy különböző sejtjeiben mért nyugalmi membrán potenciál (MP) homogén eloszlása egy Gauss-görbével volt leírható, az MP átlagértéke -56.6 ± 9.8 mV, (n=483), és a

mirigy sejtek bemeneti ellenállása 2-5.5 M Ω között volt. Korábbi szerzők eredményei e tekintetben nagy szórást mutattak, amely eredményeink alapján az alacsony ellenállású elektródák alkalmazásának tulajdonítható. Mi azt találtuk, hogy stabil MP-t kizárólag 20 M Ω feletti ellenállású elektródákkal lehetett elérni. A nyugalmi MP tízszeres extracelluláris K-ion koncentrációváltozásnál -41 mV-al változott, jelezve az elektrogén Na-pumpa valamint a Cl-ion részvételét az MP kialakításában. ***Kísérleteink fontos megfigyelése volt a mirigysejt relative érzéketlensége a magas extracelluláris K-koncentrációval szemben.*** Normál ion-összetételű fiziológias oldatban 24 mM-ig, Na-mentes oldatban 80 mM-ig kompenzált a sejt, azaz a MP nem változott, amely részben az ion-pumpák ellenhatásával ill. a sejtmembrán asszimmetrikus tulajdonságával magyaráztunk (a bazális és luminális membránok eltérő transport tulajdonsággal bírnak). ***Bizonyítottuk az elektrogén Na-pumpa, valamint a Na, K, 2Cl szerepét a nyugalmi membrán potenciál és a szekretoros potenciál kialakításában.*** Voltage-clamp kísérletekben először írtuk le és jellemeztük a feszültségfüggő ionkonductanciákat a mirigysejtekben. Négy feszültség-függő ionáramot találtunk, három kifelé irányuló K-áramot (delayed rectifier I_K, tranzienis I_A -áram és Ca-aktivál K-áram), valamint egy befelé irányuló áramot, amelyet Ca-áramként azonosítottunk (Cd-al blokkolható volt). Az I_A gátolható volt 4-AP-el, míg az I_K-t TEA blokkolta. Az Ca-aktivált ill. függő konductanciáknak fontos szerepet tulajdonítanak a szekréció létrehozásában számos exocrine mirigyben (Petersen 1988). A K-áramok számos fontos sejtfunkcióban vesznek részt a nem-ingerlékeny sejtekben is úgymint, az MP kialakítása, izomkontrakció, szignál transzdukció, sejtterefogat meghatározása, proliferáció, immunválasz stb.

Az utóbbi időben számos bizonyíték halmozódott fel, amely a K-, Ca- és Cl-áramok részvételét bizonyították a PCD-ben (Yu 2003), ezért feltételeztük, hogy a nyálmirigyben található K-ioncsatorná(k) aktiválódása fontos láncszem lehet a nyálfelszabadulás kiváltásában. ***Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a DA indukált PCD sejtek számát K-csatorna blokkoló TEA jelentősen csökkentette azt sugallva, hogy a feszültségfüggő K-ioncsatornák rész vesznek a PCD kialakításában, vagy a sejtterefogat megváltoztatásával, vagy egyéb más folyamaton keresztül.***

IV. A peptiderg és aminerg neuromoduláció vizsgálata különös tekintettel a szignál transzdukcióra valamint a vezikula populáció dinamikájára.

Korábban kimutattuk, hogy azok az idegvégződéses, melyek a nyálmirigyet és a vezetékét innerválják DA-t és 5-HT-t szabadítanak fel elsődleges transzmitterként (Kiss et al. 2003). A molluszkák neuromuszkuláris kapcsolatára jellemző a preszinaptikus oldalon a szinaptikus

vezikulák jelenléte, a keskeny szinaptikus rés valamint a nemspecializálódott posztszinaptikus membrán. Klasszikus szinaptikus kapcsolatokat nem találtunk. Az idegrostokat vezikulákat tartalmazó varikozitások jellemzik mely varikozitások a transzmitterek és modulátor anyagok felszabadulásának helyei (volume transmission, Cloney and Florey, Heyer et al., 1973). A szinaptikus vezikulák dinamikájának nyomon követése a nyálmirigyben FM –festékek alkalmazásával történt. A gyors motoros végződések szinapszisában a szinaptikus vezikulák az úgynevezett azonnal mobilizálható és a tartalék vagy rezerv poolban csoportosulnak. A két pool mobilitása az újrahasznosítás (recycling) során különböző, amely mobilitás a vezikulákba záródó és ingerlésre felszabaduló styryl-festékekkel nyomonkövethető.

Vizsgálatainkban arra voltunk kíváncsiak , hogy a csiga nyálmirigyében található nem-szinaptikus (volume synapse) végződések vizsgálatára alkalmazható –e az említett festék. Megállapítottuk, hogy az FM-1-43, valamint az FM2-10 segítségével megjelölhető a varikozitások és végződések vezikula populációja. A n. salivaris ingerlésekor valamint 40mM KCl hatására az idegvégződések depolarizálódtak és a festékekkel a vezikulák jelölhetőek voltak. A kísérletek egyik célja a monoamin- és a peptidtartalmú vezikulák felszabadulási dinamikájának tanulmányozása volt. A kísérletek kezdeti stádiumban vannak, befejezésük a 2007-év első hónapjaira tevődik át. A késés oka elsősorban az volt, hogy anyagi forrás csökkentése miatt a festékek későn kerültek beszerzésre. A továbbiakban a különböző frekvenciájú idegingerlés hatására történő vezikula felszabadulást vizsgáljuk az előzőleg festékekkel jelölt végződésekből. A kísérletek folyamatban vannak.

Kísérleteinkben a nyálvezeték izomsejtjei tartós kontrakcióval válaszoltak az exogén DA-ra a D1 receptorokon keresztül. Ezzel ellentétben az 5-HT-nak kettős hatását figyeltük meg az 5-HT1 vagy az 5-HT3 típusú receptorokhoz kapcsolódva. Előzőleg immunhisztokémiai módszerrel kimutattuk az 5HT és különböző endogén neuropeptidek kolokalizációját az éticsiga nyálvezetékében és a nyálmirigyben. A vizsgált endogén neuropeptidek kismértékű, dózis-függő relaxációt váltottak ki a következő hatásossági sorrendben: FMRFa > GSPFVYa > CARP > APGWa. Korábbi vizsgálatokból ismert volt, hogy az 5HT-nak kettős hatása van, nagy koncentrációban kontrakciót alacsony koncentrációban relaxációt vált ki. Az endogén neuropeptidek mindkét izomválaszt modulálták, de eltérő volt a neuropeptidek hatásossági sorrendje. Az 5HT-indukált kontrakciót az APGWa > FMRFa > GSPFVYa csökkentette a CARP azonban növelte azt. Az 5HT-idukált relaxációt az APGWa > GSPFVYa > CARP > FMRFa csökkentette. Idegingerléskor az izom összehúzódik és mind az 5HT mind a neuropeptidek felszabadulhatnak. Az izomválaszt a neuropeptidek a következő hatásossági sorrendben csökkentették: APGWa > GSPFVYa > FMRFa > CARP. Eredményeink

egyértelműen bizonyították a neuropeptidok moduláló hatását az 5HT által kiváltott izomválaszokra. ***A neuropeptidok hatásossági sorrendjének változása azt is jelenti, hogy a posztzinaptikus hatás mellett preszinaptikus hatás is jelen lehet, de több neuropeptid egyidejű felszabadulása (koktél) sem kizárt.*** A neuropeptidok és transzmitter koktélok hatását nem vizsgáltuk, a jelenség tisztázására további kísérletek szükségesek.

Annak ellenére, hogy a nyálmirigyet a CNS közvetlenül innerválja sem DA sem 5-HT tartalmú szómákat a bukkális ganglionban mindezideig azonosítani nem sikerült. Mi azt találtuk, hogy ***az 5-HT tartalmú rostok a cerebrális ganglion óriás neuronjából az MGC-ből származnak.*** A sejt nyúlványokat a szóma intracelluláris feltöltésével követtük nyomon és azt találtuk, hogy azok közvetlenül a nyálmirigybe is eljutnak. Továbbá immuncitokémiai bizonyítást nyert, hogy a bukkális ganglion neuronjaiban az 5HT és különféle neuropeptidok kolokalizálnak. A neuronok és a nyálmirigybe vezető nyúlványaik különféle peptideket tartalmaznak úgymint: APGWa (red pigment concentrating hormone), DS (Mytilus inhibitory peptide), CARP (myomodulin-CARP) és FRMFa (FMRFa related peptides). Feltételezzük, tehát hogy a neuropeptid moduláció a neuromuszkuláris szinapszisban fiziológiailag jelen van és ez a transzmitterhatás csökkentésében (gátlás) nyilvánult meg. ***A többféle neuropeptid jelenléte alapján feltételezzük, hogy az 5HT hatásának közvetlen ill. közvetett modulációja valósul meg.***

Elsőként írtuk le a pituitary cyclicAMP moduláló peptid, jelenlétét a központi idegrendszerben és a periférián. A PACAP-LI peptidet az anti-PACA27-re adott pozitív válasz alapján azonosítottuk. Megállapítottuk, hogy ellentétben a gerincesekkel a PACAP27 dominál a PACAP38-al szemben. Az arány 2:1 inaktív állatokban és 10:1 aktív állatokban. A PACAP meghatározását RIA és IH módszerrel végeztük. Western blot kísérletben bizonyítottuk, hogy a CNS-ben a PACAP proPACAP formában van jelen (~ 14 kDa-os molekula), valamint a PAC1 receptor jelenlétét is kimutattuk. Nyálmirigyben a PACAP hatásosan antagonizálta a DA PCD-t indukáló hatását. Az eredmények feldolgozása és publikálása folyamatban van. ***A PACAP és receptorainak jelenléte a CNS számos sejtjében arra enged következtetni, hogy a peptid számos fiziológiai funkcióban vesz részt, többek között az aktív és inaktív (feltehetően a hibernáló) állapot szabályozásában is.*** Az eredményeket feldolgoztuk, az anyag kéziratban van, publikálására 2007-ben sor kerül.

V. A peptidhatás második messenger rendszere, a neuropeptidhatás deszenzitizációjának mechanizmusa.

A gerinctelen állatok számos aminerg és peptiderg receptora G-protein kapcsolt ezidáig azonban a puhatestűekben a G-protein kapcsolt receptor kinázok jelenlétét és funkcionális szerepét még nem bizonyították. Mindezideig a MIP-receptorok és az ion-csatornák között meglévő szignalizáció útvonala ismeretlen volt. ***Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a feltételezett MIP-receptorok G-protein kapcsoltak és deszenzitizálódnak.*** A MIP kiváltott egy ligand aktivált K-áramot, amelyet az adenil cikláz aktivációja valamint a foszfolipáz utvonal blokkolói gátoltak. A GTP γ S perzisztens hatása és a receptor MIP-aktivált K-ioncsatornák szupresszálása GTP β S-el bizonyította a G-protein részvételét a szabályozásban. Megállapítottuk, hogy a peptid pertussis toxin érzéketlen G α_i alegységhez kapcsolódva az adenil cikláz gátlásával valósult meg. Cell-attached patch kísérletekben azt találtuk, hogy az extra patch applikált peptid befolyásolta a K-áramot jelezve a szolubilis messenger molekulák részvételét. Kimutattuk, hogy a MIP-receptorok G-proteinhez kapcsoltak, továbbá hogy a MIP-receptor és a K-ioncsatorna közötti szignál transzdukcióban az α_i alegység mellett a $\beta\gamma$ dimer is részt vesz, amely biztosítja a ***divergáló intracelluláris szignalizációs útvonalat.***

A receptor deszenzitizáció egyik lehetséges mechanizmusa a receptor foszforilációja különböző protein kinázokkal. Jelen kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a deszenzitizáció G-protein kapcsolt receptor kinázzal történik. Az éticsiga agy homogenizátumából Western-blot segítségével és emlős GRK2/3 emlős antitesttel elsőként mutattuk ki GRK-szerű immunreakció jelenlétét. Az immunreaktív sáv kb. 80 kDa körül volt megfigyelhető, amely egyezett az emlősökön kapott eredményekkel. Pozitív kontrollként hal és patkány agy homogenizátumon paralell végeztük el a WB analízist, ahol szintén 80 kDa körül kaptunk pozitív immunjelölést. Nemcsak az agy homogenizátumában, hanem a szem és nyálmirigy homogenizátumban is megfigyeltük ezt a sávot. Annak bizonyítására, hogy a GRK2/3 enzim funkcionális jelentőséggel bír a MIP-receptor deszenzitizációjában a kontrol és agonista (neuropeptid) aktivált sejteket metabolikusan $^{32}\text{P}_i$ -vel jelöltük. A szolubilis és membrán-kötött fehérje frakciókat blottoltuk és a 80 kDa körüli sávot szeparáltuk és mértük a $^{32}\text{P}_i$ aktivitást. Eredményeink szerint a citoszolban lévő foszforilált GRK mennyisége kb. annyival csökkent amennyivel a membrán-kötött frakció aktivitása nőtt (50%). Anti-GRK2/3 intracelluláris injektálásával a peptid indukált deszenzitizáció gátolható volt. ***Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a GRK-nak funkcionális szerepe van a receptor deszenzitizációban az éticsigában.***

VI. 5HT és dopamin receptorok interakciója:

Megállapítottuk, hogy az 5HT koncentráció függő módon 10^{-8} és 10^{-4} M között gátolta a DA-által kiváltott izomösszehúzóásokat a nyálvezetékben. Ez a jelenség, eltérően az 5HT szezonális hatásától mindig megfigyelhető volt. Feltételeztük, hogy a jelenség a DA/5-HT receptor-interakció eredménye ill. a receptorok heteromér- komplex expressziójának tulajdonítható. Feltételezésünket kettős receptor-immun jelöléssel kívántuk tisztázni. A munka konfokális mikroszkóp hiányában 2007 első félévére tolódott. A talpizomban és a szívizomban viszont a DA gátolta az 5-HT hatását. A DA- és 5-HT receptorok antagonistikus hatásának lehetséges mechanizmusát a szív és talpizomban vizsgáltuk részletesen.

Irodalmi adatok szerint a szerotonin a puhatestű, különösen a kagyló izom tónusos kontrakciójának relaxációját okozzák a cAMP közreműködése révén. Az 5HT inaktív csiga kontrahált talpizmának is a relaxációját okozza, ezáltal aktiválja az állatot. A talpizom azonban nemcsak 5HT-t, hanem DA-t is tartalmaz. Az inaktív állat talpizmában az 5HT koncentrációja nagyobb a DA koncentrációjánál, 5HT túlsúly érvényesül. Az állat aktiválódásakor a talpizomban mindkét monoamin szintje nő, a növekedés azonban olyan, hogy a szerotonin túlsúlya az aktivitásban tovább nő. **Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy a két klasszikus transzmitter milyen szereppel bír a *Helix pomatia* aktív (arousal) és inaktív (aestivated) állapotának szabályozásában, különös tekintettel a receptor interakcióra és az intracelluláris szignalizációs útvonalra.** Izolált talpizom szeleteken vizsgálva az 5HT hatását megállapítottuk, hogy az 5HT jelentősen $100 \mu\text{M}$ -os koncentrációban 400 %-al növelte a cAMP koncentrációját. A DA ugyancsak növelte a talpizom cAMP koncentrációját de hatása lényegesen gyengébb, $100 \mu\text{M}$ -os koncentrációban is csak 60 %-al növelte a szintet. Ha az 5HT és a DA együttes hatását vizsgáltuk megállapítottuk, hogy hatásuk nem additív (nem külön receptorokon hatnak), sőt a DA jelenlétében a szerotonin hatása mérséklődött. A $100 \mu\text{M}$ 5HT és $100 \mu\text{M}$ DA együttes hatásakor a cAMP koncentrációja csak 200 %-al nőtt. Az hogy a DA képes az 5HT receptorhoz bekötődni igazolta a leszorításos vizsgálat is. A puhatestűekben az ^3H -LSD az egyetlen 5HT ligand mely nagy affinitással kötődik a receptorhoz, a ligand leszorítása a receptorokról azonban eltérő volt a központi idegrendszerben és az izomban. Az idegrendszerben a DA és az 5HT 50%-ban gátolta a ^3H -LSD kötődését, $10 \mu\text{M}$ ill. $1.3 \mu\text{M}$ -ban, ezzel ellentétben, az izomban 30%-ban blokkoltak $100 \mu\text{M}$ koncentrációban. In vivo kísérletekben az inaktív csigába injektált 5HT aktiválta az állatot növelve a talp cAMP koncentrációját. Ha az 5HT-t DA-al együtt injektáltuk a DA megakadályozta a cAMP koncentrációjának növekedését és késleltette az állat aktiválódását.

Vizsgáltuk a protein foszforilációt 5HT, 8-Br-cAMP (a cAMP membrán permeábilis analógja) valamint egy kardioaktív peptid, az SCP_B hatására. Az SCP_B hatása szintén az intracelluláris cAMP növekedés függvénye. A szívizom SDS-PAGE analízise egy 50 kDa-os, ismeretlen funkciójú fehérje foszforilációját mutatta ki. Ezzel ellentétben, a talpizomban egy 600 kDa fehérje foszforilációja nőtt meg az 5HT, 8-Br-cAMP és SCP_B hatására. Hasonló fehérjemolekulát a kagyló záróizmában korábban már kimutattak, amely kevés energiaráfordítással képes az izmot összehúzó állapotban tartani. A nagymolekulasúlyú fehérje foszforilálása az izom relaxációját eredményezte. Gerincesek simaizmaiban fedezhető fel hasonló alacsony ATP felhasználásával megvalósuló kontrakció, melynek megértéséhez jelen modell segítséget adhat. ***Megállapítottuk, hogy a szerotoninnak mint transzmitternek a talpizomban adenil cikláshoz kapcsolt receptora van, a DA azonban csak modulátor szerepet tölt be azáltal, hogy az 5HT receptor helyekhez kötődve gátolja az 5HT kötődését, ezáltal képes az 5HT stimulált adenil cikláz mérséklésére. A gerinctelenek 5HT-receptorainak besorolása a gerinces 5HT –receptorokhoz megfelelő és szelektív antagonisták hiányában csak részben sikeres. Eredményeink az 5HT receptor altípusok jellemzéséhez nyújt újabb adatokat gerinctelenekben.***

Eredményeink feldolgozás alatt vannak, publikálásra 2007-ben kerül sor.

Az OTKA pályázati anyagból a következő kéziratok vannak készülöben ill. elküldés előtt:

- 1) Pirger Zs., Kiss T.: Mitochondrial-caspase dependent programmed cell death is a physiological way of mucus release from the salivary gland.
- 2) Hernádi L., Pirger Zs., Kiss T., Reglödy D.: Activity dependent expression and distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like peptide and its receptors in snail.
- 3) Kiss T., K. Elekes, Z. László, Zs. Nagy.: Peptidergic modulation of a serotonin evoked responses of the salivary duct musculature in the snail, *Helix pomatia*.
- 4) Hiripi L., Elekes, K., Pirger Zs., Kiss, T.: Activity state of *Helix* is regulated by 5HT receptor coupled to adenyl cyclase.

References

- Boer, H.H., 1967. Light and electron microscopical investigations on the salivary glands of *Lymnaea stagnalis* L. *Zeitschrift für Zellforschung* 76, 228-247.
- Kater, S.B., Murphy, A.D., Rued, J.R., 1978. Control of the salivary glands of *Helisoma* by identified neurones. *J. exp. Biol.* 72, 91-106.
- Kiss, T., Hiripi, L., Papp, N., Elekes, K., 2003. Dopamine and serotonin receptors mediating contractions of the snail, *Helix pomatia*, salivary duct. *Neuroscience* 116, 775-790.

- Krijgsman, B.J., Divaris, G.A., 1955. Contractile and pacemaker mechanism of the heart of molluscs. *Biol. Rev.* 30, 1-39.
- Moya, J., Serrano, M.T., Angulo, E., 1992. Ultrastructure of the salivary glands of *Arion ater* (Gastropoda, pulmonata). *Biol. Structures Morphogenesis* 4, 81-87.
- Petersen, O.H., 1988. The control of ion channels and pumps in exocrine acinar cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A, 717-720.
- Stebbing, L.A., Todman, M.G., Phelan, P., Bacon, J.P., Davies, J.A., 2000. Two *Drosophila* innexins are expressed in overlapping domains and cooperate to form gap-junction channels. *Mol Biol Cell* 11, 2459-2470.
- Walker, G., 1970. Light and electron microscope investigations on the salivary glands of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller). *Protoplasma* 71, 111-126.
- Yu, S.P., 2003. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 70, 363-386.