

Gap junction mediált direkt sejt-sejt kommunikáció a patkány harántcsíkolt izom korai differenciálódása és regenerációja során

PhD tézisek összefoglalója

Dr. Görbe Anikó

Biokémiai Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Szegedi Egyetem

2007

A gap junctionokon (rés kapcsolatok) keresztüli direkt sejt-sejt kommunikáció igen fontos fiziológiás és patológias folyamatokban vesz részt a szervezetben és ezek a membránba ágyazódó csatornák a legtöbb szövetünkben megtalálhatóak. Jól ismert viszont, hogy a gap junctionokon keresztüli direkt információcsere a felnőtt harántcsíkolt izomban nem jut szerephez, az izomrostokban ezek a csatornák nem is mutathatóak ki, mely érthető, hiszen a többmagvú izomrostokban nincsenek membránhatárok. Azonban a harántcsíkolt izom fejlődése során az izom irányba elkötelezett korai mioblastok proliferációjuk, és későbbi differenciálódásuk után fúzionálnak össze korai miotubulusokká, és ebben a folyamatban a gap junctionok szerepet játszhatnak. Az izomfejlődés ezen korai stádiumában igen sok szabályozó faktor hatása ismert, ilyenek például a miogenikus reguláló faktor család, de ezen túl növekedési faktorok, másodlagos hírvivők aktív részvétele is bizonyított.

Az izomfejlődés vizsgálatára több lehetőség kínálkozik, mi munkák során párhuzamosan ugyanabból a fajból, patkányból származó *in vivo* és *in vitro* modelleken dolgoztunk. *In vivo*, kígyóméreggel indukált izomelhalás talaján induló regenerációs folyamatot vizsgáltunk, mely nagyszerűen modellezi az izomfejlődés szakaszait. *In vitro*, újszülött állatok végtagizmaiból nyert primer izomsejtkultúrákon dolgoztunk, mely modell kiválóan alkalmas funkcionális vizsgálatok és különböző manipulációs kísérletek elvégzésére.

A gap junction membráncsatornák a két szomszédos sejt membránjába rögzült félcsatornából formálódnak és rajtuk keresztül gyors, késedelem nélküli információcsere válik lehetségessé a sejtek között. Egy félcsatorna 6 connexin fehérjéből épül fel, melynek típusai jellegzetes szöveti eloszlást mutatnak. Ismert, hogy a csatornákon keresztül 1 kDa-nál kisebb molekulatömegű ionok, másodlagos hírvivők és egyéb anyagok áramlanak át, és a gap

junction kommunikáció részt vesz a különböző szövetekben zajló proliferációs és differenciációs folyamatokban, továbbá a szívizomban az elektromos ingerület továbbításában és még számos egyéb patológiás folyamatban is.

A mi koncepciónk azon alapult, hogy a miogenezis során az egyedi mioblasztoknak időben és térben szigorúan szabályozottan kell összehangolniuk a differenciálódási programjukat, azaz a sejtciklust szabályozni, az elnyúlt, orsó alakú mioblasztoknak oldalaik mentén összerendeződni, hogy készen álljanak a relatíve gyorsan és szinkronizáltan lezajló fúziós folyamathoz. Ennek a több oldalról szabályozott folyamatnak a koordinálásában a gap junctionokon keresztüli gyors információáramlásnak a mioblasztok és környezetük között igen fontos szerep juthat, és munkánk során ennek a felderítését állítottuk a középpontba.

Első lépésben a gap junctionok megjelenését vizsgáltuk a korai miogenezisben, mind *in vivo* mind *in vitro* rendszerünkben. Különböző connexin fehérjéket kerestünk és teszteltünk immunhisztokémiai módszerrel és mindkét kísérleti modellben csak a connexin43 (Cx43) izotípust sikerült detektálni, mely a legősibb és az egyik legelterjedtebb connexin variáns. A Cx43 időbeni megjelenése mind a regenerációban, mind primer sejt kultúrákban teljesen hasonló mintázatot mutatott. A connexineket már a korai mioblasztok elkezdik termelni (1 nap), majd mennyiségük szignifikánsan emelkedik a fejlődés 2-3 napján a kommunikáló mioblasztokban, viszont közvetlen a fúzió előtt drasztikus csökkenés figyelhető meg a Cx43 expressziójában. A regenerációban sikerült kimutatni, hogy a fúzióra készülődő, differenciálódott mioblasztokban, melyek sejtmembránjában nagy mennyiségű Cx43-ból álló gap junction mutatható ki, a sejtsztódás leállításáért felelős faktorok, mint a p21 és p27 ciklin dependens kináz inhibitorok expressziója megnő, míg a sejtproliferációban kifejeződő Ki67 fehérje termelődése erősen lecsökken. Mindezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy Cx43 fehérjéből álló csatornák szerepet játszhatnak a mioblasztok sejtciklusának szabályozásában, a sejtciklusból való kilépésük és a differenciálódási programjuk szinkronizálásában.

A sejt kultúrákban nevelődött izomsejteken jól nyomonkövethető volt a Cx43 fehérjék termelődési folyamata és sejten belüli elrendeződése a fejlődés korai stádiumaiban. Míg a proliferáló mioblasztokban a citoplazmában a sejtmag körül láthatóak a connexinek, addig a differenciálódó izomsejteken már elsősorban a sejtmembránba vándorolt csatornafehérjék a szembetűnőek. Az előbb leírt mintázatot funkcionális vizsgálatokkal egészítettük ki, mely során fluoreszkáló festék vándorlását követtük nyomon a gap junctionokon keresztül. A festéktranszfer a legaktívabban a még főleg proliferáló sejteket tartalmazó kultúrákban zajlott, ahol mioblasztok elszórtan helyezkedtek el, egy-két szomszédos sejttel érintkezve. Az egyre

konfluensebbé váló kultúrákban, mely főleg differenciálódott, de még fúzió előtti állapotban lévő izomsejteket tartalmaznak, a festéktranszfer intenzitása csökkent, majd a fúzió idején konfluens kultúrában látványosan lecsökkent és alig észlelhető. A korábbi eredményeinkkel összevetve, a funkcionális vizsgálatok tapasztalatai is azt mutatták, hogy a gap junction kommunikáció szabályozó szerepet kaphat a mioblasztok differenciálódási programjának koordinálásában és ezzel a szinkronizált fúziós folyamat előkészítésében.

Az eddigi eredményeink megerősítésére mioblaszt kultúrákon manipulációs vizsgálatokat végeztünk, ahol az izomsejteket transzfektálva megnöveltük (vad típusú Cx43) vagy lecsökkentettük (domináns negatív Cx43) az aktívan működő gap junctionok számát és ezen beavatkozások hatását vizsgáltuk a sejtproliferációra (sejtszám) és a fúzióra (miotubulusok száma). A transzfeckcióhoz pIRES-eGFP vektort használtuk, ahol kontrollként csak eGFP-vel (green fluorescens protein) transzfektált sejtek szolgáltak, és a sikeresen manipulált sejtek így fluoreszcens mikroszkópban jól nyomonkövethetőkké váltak. Ebben a rendszerünkben is végeztük funkcionális vizsgálatokat, ahol már a gap junctionokon átjutó festék mellett egy nagyobb molekulatömegű festéket is alkalmaztunk, mely csak a membránjának integritását elvesztett, azaz fuzionáló szomszédos izomsejtekbe jut át. Így a gap junction funkcionális kommunikáció és a mioblaszt fúzió együttes jelenlétét kiválóan lehetett vizsgálni.

A vad típusú Cx43-at kifejező sejtek szignifikánsan intenzívebb funkcionális gap junction kommunikációt mutattak a kontrollhoz viszonyítva, valamint lényegesebben korábban kezdtek fuzionálni, továbbá ezekben a kultúrákban több miotubulus alakult ki. Ezzel szemben a domináns negatív Cx43-at tartalmazó izomsejtek, melyekben még a meglévő gap junctionok sem tudnak működni a beépülő domináns negatív forma miatt, sokkal tovább maradtak a proliferációs stádiumban, azaz számuk szignifikánsan magasabb volt a kultúrákban a kontrollhoz viszonyítva. Ezek az izomsejtek funkcionális kommunikációt alig mutattak, és a fúziós folyamatot jelző festéktranszfer is csak később, lényegesen kisebb mértékben alakult ki mint a kontrollban. Ezek az eredmények tehát megerősítik és bizonyítják azt a korábbi feltételezésünket, mely szerint a harántcsíkolt izom korai fejlődése során, az izomsejtek differenciálódásának és fúzióra való felkészítésének a szabályozásában a Cx43 gap junctionok fontos szerepet játszanak.