

A GABAERG RENDSZER VIZSGÁLATÁNAK LEHETŐSÉGE AZ INTRACELLULÁRIS KÁLCIUMSZINT MONITOROZÁSÁVAL

KOCSIS-TÓTH TITANILLA¹ – EMRI ZSUZSA²

¹Biológia BSc szakos hallgató, ² Eszterházy Károly Egyetem, Biológiai Intézet Állattani tanszék, E-mail: emri.zsuzsa@gmail.com

Abstract: γ -Aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the vertebrate brain and also serves signaling and trophic functions in several non-neural tissues. The molecular heterogeneity of the enzymes, receptors of the GABAergic system provide the fundamental basis for the multiple functions of the system (Schwartz 2008). Through the different GABA receptors several intracellular signaling pathways could be activated, the majority of them via the temporary increase in intracellular free Ca^{2+} concentration. The cytosolic free Ca^{2+} concentration normally is very low, the majority of the Ca^{2+} either bonds to special proteins (Ca^{2+} binding proteins) or it is imported into the endoplasmic reticulum or mitochondria (Szabó 2009). Cytoplasmic free Ca^{2+} concentration can be monitored by fluorescent dyes changing their fluorescence upon Ca^{2+} binding (Kao et al. 1989). Following a stimulus the Ca^{2+} could arise from extra- or intracellular sources as well, through voltage- or ligand-gated Ca^{2+} channels or from the intracellular Ca^{2+} stores (Szabó, 2009). The majority of the transmitters including GABA may affect the intracellular Ca^{2+} concentration directly or indirectly. Similar GABA-mediated responses could be detected in different cell types (embryonic stem cells, primary lens epithelial cells or astrocytes and neurons from the nucleus accumbens (Molnár és mtsai 2009, Schwartz és mtsai 2010, 2011). The GABA-A receptor-mediated increase in intracellular Ca^{2+} concentration could be evoked in cell types with high intracellular Cl^- concentration hence depolarizing Cl^- current (such as embryonic

stem cells or primary epithelial lens cells) and it is resulted from the opening of voltage-gated Ca^{2+} channels. The GABA-B receptor-mediated Ca^{2+} responses, however, involved Ca^{2+} outflow from the intracellular Ca^{2+} stores as well. GABA-B agonists and antagonists could also evoke repetitive Ca^{2+} responses or Ca^{2+} oscillation (Molnár és mtsai 2009, Schwirtlich és mtsai 2010, 2011).

Bevezetés

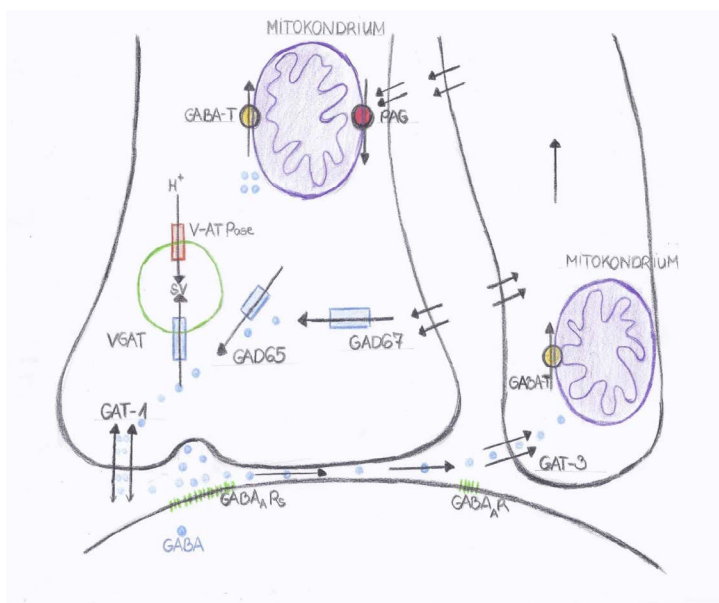
Az újabb molekuláris biológiai és celluláris fiziológiai eredmények azt bizonyítják, hogy a gamma-amino vajsav (GABA) nemcsak mint gátló ingerületátvivő anyag fontos hanem mint a differenciációt, sejtosztódást szabályozó anyag is (Deidda és mtsai, 2014, Schwirtlich és mtsai 2010). A GABA szerepet játszik különböző idegi funkciókban, például a mozgás kialakításában, tanulásban, ezen felül a szaporodásban és a cirkadián ritmusok szabályozásában (Mohler 2006). Mindezekén túlmenően a GABA befolyásolja szinte valamennyi fontos sejtszintű jelenség, így a sejtosztódás, a migráció, axon növekedés, szinapszisok kialakulása és sejtpusztulás folyamatait a fejlődő központi idegrendszerben (Varju 2002). Emiatt a GABA szintézist és felszabadulást irányító enzimek és a GABAerg receptorok számos sejt típusban megtalálhatók és működőképesek (Ong és Kerr 1990, Magnaghi és mtsai 2006, Jenstad és Chaudhry 2013). GABA hatására a sejtmembrán bizonyos ionokkal szembeni áteresztőképessége megváltozik, illetve másodlagos hírvivő rendszerek aktiválódhatnak. Mindkét hatás előidézhethet változást az intracelluláris Ca^{2+} dinamikában, és ezt a változást Ca^{2+} érzékeny fluorescens festékekkel monitorozhatjuk. A továbbiakban a GABA rendszert, és a GABA intracelluláris Ca^{2+} szintre gyakorolt hatásait mutatjuk be, majd röviden kitérünk a GABA rendszer aktiválására előidézhető Ca^{2+} válaszokra.

A GABAerg rendszer

GABA szintézise és lebontása

Az emlős agyban, a GABA elsősorban glutamátból képződik egy dekarboxilációs lépésben, amelyet kétféle glutaminsav dekarboxiláz (GAD) enzim, a GAD65 és GAD67 katalizálhat. A két GAD izoforma fehérje szintű ho-

mológiája nagyfokú, de a kofaktorhoz (piridoxál-foszfát -PLP) való kötődés erősségében és a sejten belüli lokalizációjukban különböznek (Bu és mtsai 1992). A GAD65 túlnyomórészt idegvégződésekben található és a vezikuláris GABA termelődését biztosítja, a GAD67 pedig elsősorban a citoplazmában mutatható ki, és feltehetően a citoplazmatikus GABA-készlet kialakításáért felelős (Buddhala és mtsai 2009). Magát a GABA molekulát a vezikuláris GABA transzporter (VGAT) juttatja be a szinaptikus vezikulába, és kalcium-függő exocitózis révén jut ki az idegvégződésekbe. Ugyanakkor ismert a GABA-szekréció egy úgynevezett nem-vezikuláris formája is, ami kiemelten fontos lehet az egyedfejlődés folyamán (Schwirtlich 2008). A GABA hatását ionotróp GABA-A és GABA-C, illetve metabotróp GABA-B receptorok aktiválása révén feje ki. A GABA-t a plazmamembrán GABA transzporterei (GAT) a pre-szinaptikus GABA-erg idegvégződésekbe és/vagy környező gliasejtekbe juttatják, ahol a mitokondriumokban a GABA transzamináz enzim segítségével szukcinil-szemialdehiddé és glutaminsavvá alakul (Schousboe és mtsai 1977), ezzel zárva a jelátviteli folyamatot (1. ábra).



1. ábra GABAerg rendszer schematikus rajza

GABA receptorok

Molekuláris szerkezetük és funkciójuk alapján két, alapvetően eltérő típusú GABA receptort ismerünk. A GABA-A és a GABA-C receptor ún. ionotrop receptor, vagyis maga a receptor molekula (ill. alapegységei) képezik az ionszarnát (Johnston 1996). Ezek a fehérje alagségek a hozzá kapcsolt transzmitter hatására megváltoztatják konformációjukat, ezáltal a szarna kinyílik vagy bezárul. A GABA-B receptor metabotropikus receptor, esetében a receptor G protein segítségével éri el effektor rendszerét (Boweri és mtsai 1984). A transzmitter kötődése különböző szignáltranszdukciós mechanizmusokat indít be, és ennek eredményeként változik meg a membrán egyes ionokkal szembeni átjárhatósága, és/vagy aktiválódik az adenilát cikláz enzim. Működési sajátosságaik miatt a metabotrop receptorok lassúbb, elhúzódóbb hatást váltanak ki, mint az ionotrop receptorok (Szabó 2009).

A GABA-A-receptor aktiválásakor Cl^- szarna nyílik ki, és ezen az elektrokémiai gradiensnek megfelelően Cl^- áramlik át. Általában a Cl^- a sejt belsőjébe áramlik az extracelluláris térből, a sejtmembrán hipepolarizációját okozva, de számos neurontípus esetében kimutatták, hogy embrionális korban a bennük levő nagy mennyiségű Cl^- miatt a kloridgradiens fordított irányú: GABA hatására az ionszarnán keresztül Cl^- kiáramlás történik, azaz a membrán depolarizálódik, tehát ebben az esetben a GABA serkentő transzmitterként viselkedik (Leinekugel és mtsai 1999). A metabotrop GABA-B receptor heterodimer protein, GABA-BR1 és GABA-BR2 receptor-alegységekből épül fel. Attól függően, hogy a sejttesten dendriteken vagy az axonvégződésen helyezkedik-e el a receptor más hatást eredményez aktiválása. A sejttesten vagy dendriteken elhelyezkedő GABABR-ok aktivációjakor elnyújtott posztzinaptikus gátlás alakul ki K^+ szarnák nyitásával, vagy cAMP keletkezik és aktivál különböző kináz és foszfatáz enzimeket, míg a preszinaptikus receptor aktiválásakor csökken a Ca^{2+} beáramlás az axonvégződésbe, és így kisebb lesz a neurotranszmitter felszabadulás (Chalifoux és Carter 2011). A GABA-B receptor génexpressziós változásokat is előidézhet, a G-fehérjékhez kapcsolt jelátviteli útvonalak aktiválása révén (Ong és Kerr 2000).

GABAerg rendszert moduláló anyagok

GABAerg rendszeren GABA-n kívül a GABA lebontás egyik lehetséges terméke a gamma-hidroxi-butirát (GHB) is hathat. Elégé kis affinitással rendelkezik a GABA-B receptorhoz, emiatt a szervezetben fiziológiásan keletkező GHB hatását a GABA-B receptorokon sokan megkérdőjelezzik. Patológiásan keletkező vagy külsőleg bevitt GHB viszont bizonyítottan aktiválja a GABA-B receptorokat (Emri és mtsai 1996). Farmakológiailag a GABA-A receptort szelektíven muscimollal, míg a GABA-B receptorokat baclofennel (béta-(4-chloro-phenyl)-gamma-aminobutirát) aktiválhatjuk. A GABA-A receptort bicucullinnal, gabapentinnel míg a GABA-B receptort CGP55845 (3-Aminopropil-dietoximetil-foszfiniksav) gátolhatjuk (Olsen és DeLorey 1999).

Sejten belüli másodlagos hírvivő rendszerek

A sejtekben egymással kapcsolatban levő többféle mechanizmussal is aktiválható jelátviteli útvonalak alkotnak hálózatot. A hálózat egyik központi eleme az intracelluláris szabad Ca^{2+} amelynek a nyugalmi szintje igen alacsony. Azok az enzimek, amelyek a cAMP szintjét befolyásolják: Ca^{2+} -kalmodulin szabályozás alatt állnak, vagyis a sejten belüli Ca^{2+} szinttel is regulálhatók. A protein kináz A enzimek foszforilálhatnak Ca^{2+} -ioncsatornákat, Ca^{2+} pumpákat, így megváltoztatva azok aktivitását és ezzel a sejten belüli Ca^{2+} koncentrációváltozás dinamikáját. A sejtmembránban előforduló szfingolipidből is keletkezhet másodlagos hírvivő molekula. Több különböző szfingomielináz is hidrolizálhatkja a szfingolipideket. A hidrolízis során ceramid keletkezik, amiről kimutatták, hogy részben protein kinázok, cereamid-aktivált protein kinázok (CAPK), részben pedig foszfatázok, cereamid-aktivált protein foszfatázok (CAPP) aktivátora (Darvas és László 2005). Az alábbiakban a legfontosabb intracelluláris hírvivő rendszereket és kapcsolatukat az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációval ismertetjük röviden.

Diacilglicerín (DAG)

A foszfolipáz C elbontja a plazmamembrán inozitol foszfolipidjei közül a foszfatidil-inozitol-biszfoszfátot (PIP2). A reakciók során inozitol triszfoszfát (IP3) és diacilglicerín (DAG) keletkezik. A PIP2-ből származó másik mo-

lekula a hidrofób jellegű DAG, a plazmamembránban marad protein kináz C-t aktiválja (C-kináz vagy PKC). Ez az enzim alap állapotban a citoszolban van, de amikor a Ca^{2+} -koncentráció megemelkedik, a membránhoz helyeződik, ahol aktiválódik. Hatását a legtöbb sejtben transzkripciós szinten feje ki. A DAG-ból további lépések során arachidonsav is keletkezhet, amelyről szintén kimutatták, hogy sejtben belüli hírvivő molekula (Darvas és László 2005).

Inozitol-trifoszfát IP3

Az IP3 a membránon található lipid bomlásterméke és a plazmamembrán-receptor ligand általi aktivációját a citoszol felé közvetíti. Az IP3 egy víz oldékony molekula, ami igen gyorsan a citoszolba diffundál, és a SER membránján lévő IP3 receptorhoz kötődik. (Darvas és László 2005) Az IP3 azáltal, hogy a receptorhoz kötődik, indukálja az IP3-receptor- Ca^{2+} -release-csatornák kinyitását., amely működésük alapján hasonlítanak a szarkoplazmás retikulum Ca^{2+} ioncsatornáihoz. Az IP3 – receptor működésének legfontosabb szabályozója maga az általa szállított ion, a kalciumion: az IP3 Ca^{2+} -mobilizáló képessége függ az éppen aktuális citoszolikus Ca^{2+} koncentrációtól. (Szabó 2009)

Intracelluláris Ca^{2+} , Ca^{2+} raktárak

A citoszolban található Ca^{2+} 80-90%-a intracelluláris proteinekhez és membránfelszínekhez kötött állapotban található, a maradék képezi a szabad Ca^{2+} -t. Nyugalmi szabad Ca^{2+} koncentrációja a sejtek nagy részében alacsony, 100 és 200nM között van. A kis Ca^{2+} -koncentráció egyrészt lehetővé teszi a magasabb rendű szervezetekre jellemző, foszfátvegyületeken alapuló anyagcserét anélkül, hogy hidroxapatit kristályok válnának ki a citoszolban, másrészt lehetővé teszi az ion másodlagos hírvivőként való felhasználását: már kis mennyiségű ion energiaigényes mozgatása is nagy Ca^{2+} -koncentráció változásokat eredményez (Szabó 2009). A kalciumionok diffúziója a citoszolban sokkal lassabb és sokkal behatároltabb, mint akármelyik más másodlagos hírvivőé (pl: IP3) az igen nagyszámú, majdnem teljesen immobilis Ca^{2+} -kötőhely miatt (2. ábra). Az extracelluláris tér felől sejtbe érkező Ca^{2+} nagyon lassan vagy egyáltalán nem érne el a sejt belső régióit, nagyobb sejtekben csak lokális hírvivő lenne. Emiatt a legtöbb sejtben a Ca^{2+} szint

emelkedésének két forrása ismert: a Ca^{2+} a citoszolba kerülhet a sejten kívüli térből ligand- vagy feszültség függő ioncsatornákon keresztül (2. ábra), vagy a sejten belüli raktárakból az endoplazmatikus retikulumból (ER) és a mitokondriumokból (2. ábra) (Darvas és László 2005). A mitokondriumok jelentős, relatíve nagy kapacitású, csekély affinitású intracelluláris Ca^{2+} raktárak. A raktárban a kalciumionok felvételét a mitokondrium belső membránjában található (elektrogén) „független szállító” végzi, mely az újabb kutatások szerint inkább ioncsatorna, mint karriermolekula. Az emlőssejtek gyorsan reagáló kalciumraktárát az endoplazmatikus retikulum (ER) adja. Az ER vesz részt a citoszol Ca^{2+} -koncentrációjának szabályozott, gyors változásaiban, a Ca^{2+} forgalom, jelentős része az ER speciálizálódott részeiben játszódik le: mint például az izomsejtek szarkoplazmatikus retikulumban (SR), nem izomsejtek kalcioszómájában. A mitokondriumok és a Ca^{2+} forgalomra specializálódott ER területeken kívül számos további, lassan reagáló kalciumraktár is található a sejten belül amelyeknek neutrális vagy alkalikus pH-juk van, ATP-függő Ca^{2+} -felvételre képesek, és se IP_3 -receptor és se rianodin receptor nincs rajtuk. A legvalószínűbb ilyen raktárak a transz-Golgi hálózat és az ER kalciumforgalomra nem specializálódott részei lehetnek. (Szabó 2009)

Ca^{2+} felszabadulás belső raktárakból.

A SER-ből való Ca^{2+} felszabadulást kiváltható ligand- vagy feszültség-függő Ca^{2+} -csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramlással vagy G proteinhez kötött receptorok aktiválásával. A különböző mechanizmusok között az IP_3 molekula létesít kapcsolatot. A G proteinek foszfolipáz C enzimet aktiválják, ez az enzim foszfatidil-inozitol-bisz-foszfáton keresztül IP_3 -at és DAG-ot állít elő. Az IP_3 Ca^{2+} csatornákat alakítja ki a SER felületén, és lehetővé teszi a Ca^{2+} kiáramlást a SER-ből. Az IP_3 kialakulását a Ca^{2+} -calmodulin-függő protein kináz-II és a cGMP-függő protein kináz szabályozza (Mikoshiha 2007). A Ca^{2+} -függés haranggörbével írható le, emelkedő Ca^{2+} -koncentrációk mellett az IP_3 hatása fokozódik, maximális a Ca^{2+} -mobilizáló képesség $\sim 300\text{nM}$ intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mellett figyelhető meg, ettől nagyobb Ca^{2+} -koncentráció már gátolja az IP_3 indukálta Ca^{2+} -felszabadítást. A kezdeti Ca^{2+} -felszabadulás pozitív visszacsatolással fokozza a kalciumion-kiáramlást, a Ca^{2+} fokozatos citoszolikus akkumulációja pedig aktiválja a nega-

tív visszacsatolást. Az IP₃ legnagyobb része gyorsan lebomlik, kisebb része viszont tovább foszforilálódhat és így elnyúltabban növeli a Ca²⁺ szintet. (Darvas és László 2005). A receptor feedback- (visszacsatolás) szabályozása igen nagyfokú hasonlóságot mutat a kalcium-indukált Ca²⁺ felszabadulás (CICR) mechanizmusával. CICR kialakításában a SER rianodin receptorai vesznek részt. Az IP₃- és a rianodinreceptorok egy sejtben egyszerre is jelen lehetnek, biztosítva ezzel a Ca²⁺- függő folyamatok többirányú szabályozhatóságát (Mikoshiha 2007).

Az ER/SR lumenében felvett kalciumionok egy része szabad marad, túlnyomó többségük azonban kalciumokat raktározó fehérjékhez kötődik. A két legjelentősebb kalciumraktározó fehérje, a kalszekvesztrin (CSQ) és a kalretikulín (CR) nagy mennyiségben fordul elő, csekély affinitású, nem specifikus kalciumkötő helyük van. Elsődleges szerepük a Ca²⁺- raktározás biztosítása a gyorsan mobilizálható kalciumraktárakban, valamint ezzel egyidejűleg az intraluminális kalciumion koncentráció-változások pufferolása. A stabil intraluminális Ca²⁺- koncentráció igen fontos szerepet játszik az ER egyéb funkcióiban is, többek között számos intraluminális és integráns fehérje harmadlagos struktúrájának létrehozásában és fenntartásában (Szabó 2009). A citoszól alacsony Ca²⁺ koncentrációjának fenntartásában a Ca²⁺-ATP-áz enzimfehérjék játszanak fontos szerepet, ezek pumpálják ki a sejt belsejéből a Ca²⁺-kat jelentős koncentrációgradiens (külső oldalon kb. 1-2 mM a Ca²⁺ koncentráció) ellenében (Bonting és mtsai 1980). A plazmamembrán-kalciumpumpák távolítják el a sejtaktiváció, ingerlés következtében citoszólba került Ca²⁺-kat és állítják vissza az eredeti intracelluláris Ca²⁺ szintet. A plazmamembrán kalciumpumpái calmodulin hatására aktiválódnak. A kalmodulin molekula kooperatív módon köt 4 Ca²⁺-ot (azaz az első Ca²⁺ kötődése elősegíti a következő Ca²⁺ kötődését és így tovább). A kalmodulin konformációját Ca²⁺ kötés oly módon változtatja meg, hogy a Ca²⁺-kalmodulin komplex képessé válik számos intracelluláris enzimhez való kötődésre és azok aktiválására. (Szabó 2009). Az SR-membrán Ca²⁺ - ATP-áz fehérjei, szemben a plazmamembrán-kalciumpumpával, nem igénylenek kalmodulint működésükhöz. Az SR-kalciumpumpa- mely egy ATP- és egy kis, valamint egy nagy affinitású Ca²⁺-kötő hellyel rendelkezik. többlépcsős folyamatban juttatja át a Ca²⁺ a citoszólból az SR belsejébe. Az egyes ionpumpák -fehérje-alegységeinek molekulatömege hasonló, és aminosavszekvenciájuk nagyon

konzervatív (sok részletben azonos), ami arra enged következtetni, hogy e fehérjék evolúciója valószínűleg egy közös „ősből” (prekurzorból) eredt, és az evolúció során fejlődtek ki a specifikus ionkötő helyek. Ca^{2+} -kalmodulin komplex számos eukarióta sejtben aktiválja a plazmamembrán Ca^{2+} ATP-ázt, ezzel fontos negatív visszacsatolást biztosít a citoszol Ca^{2+} koncentrációjának szabályozásában (Reis és mtsai 1996).

A kalciumszignál sejtben belüli tovaterjedésének kulcsa az intracelluláris raktárak térben és időben koordinált aktiválása az igen szolubilis IP3 gyors eloszlásával és/vagy önmagát erősítő, regeneratív Ca^{2+} felszabadulással (CICR). Az IP3 hatását utánozzák a Ca^{2+} ionofórok, mint például az A23187 ill. az ionomicin. Az ionofórok olyan kis hidrofób molekulák, amelyek jelentősen megnövelik a plazmamembrán ionokkal szembeni átjárhatóságát. (Darvas és László 2005)

Ca^{2+} aktivált sejtválaszok

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció extracelluláris jelek által kiváltott emelkedés számos sejtválaszt indít el. A Ca^{2+} koncentrációt, mint jelet, a kalciumot specifikusan kötő fehérjék továbbítják a kalciumfüggő sejtválaszok során. Az eukarióta sejtekben az egyik ilyen fehérje a kalmodulin. Ca^{2+} -kalmodulin komplex legjobban ismert szabályozó szerepe a Ca^{2+} -kalmodulin függő proteinkinázokon (CaM-kináz) keresztül nyilvánul meg. A CaM-kinázokat a Ca^{2+} -kalmodulin komplex aktiválja. Az aktivált kináz pedig a fehérjék treonin oldalláncait foszforilálja, és ezzel megváltoztatja a célfehérjék működését. A citoszol Ca^{2+} -koncentráció változását követő sejtválasz attól függ, hogy milyen CaM-kináz és célfehérje kombináció található a sejtben. A szűk szubsztrátspecifitású CaM-kinázok csak egy meghatározott célfehérje működését szabályozzák, mint például a glikogén-foszforiláz enzim, amely a glikogén lebontását aktiválja, vagy a miozin könnyűlánc-kináz, amely a simaizom összehúzódását aktiválja (Walsh 1991). A CaM-kinázok másik csoportja széles szubsztrátspecifitású, ún. multifunkcionális CaM-kinázoknak nevezzük. Ezek a CaM-kinázok nem rendelkeznek jól meghatározott célfehérjékkel, mint például a CaM-kináz II., amely membránfehérjéket (pl: ioncsatornákat), gének átírásáért felelős fehérjéket és a citoszkeleton egyes elemeit foszforilálja és ezeken keresztül igen sok szinten befolyásolja különböző sej-

tek működését, beleértve az idegsejtek közötti kommunikációt, a sejtek ingerlékenységét, a szekréciót, a sejtalakat és gének kifejeződését (Szabó 2009). A CaM-kináz II. egy speciális tulajdonsága teszi alkalmassá az enzimet a Ca^{2+} oszcilláció dekódolására is. A CaM-kináz II. két doménből egy gátló és egy katalitikus doménből áll. Ca^{2+} -kalmodulin hiányában az enzim inaktív állapotban van, majd Ca^{2+} -kalmodulin kötődés következtében az enzim katalitikus doménje foszforilálni képes célfehérjéket is és a gátló domént is. A gátló domén foszforilációja az enzim aktiválását függetleníti a citoszolikus Ca^{2+} - koncentrációtól, vagyis a kináz aktivitás megmarad, akkor is ha a Ca^{2+} -kalmodulin komplex disszociál az enzimről. A CaM-kináz II. ezt követően addig marad aktív, míg foszforilált gátló doménről protein-foszfataz enzimek a foszfát csoportot le nem hasítják (Yang és Schulman 1999). A CaM-kináz II tehát molekuláris memóriaegységként viselkedik, a Ca^{2+} -kalmodulin komplex aktiválja amikor a citoszolikus Ca^{2+} - koncentráció megemelkedik, és az aktív állapot fennmarad a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció visszaállása után is. Ha egy újabb Ca^{2+} szint emelkedés akkor következik be, amikor a CaM-kináz II enzimek még aktívak, akkor az újonnan aktiválódott enzim-molekulák hozzáadódnak a még meglévő aktív enzimekhez. Így, függően a Ca^{2+} oszcilláció frekvenciájától különböző mértékű aktivitás összegezés, azaz az oszcillációk frekvenciájától függő amplitúdójú, de folyamatos CaM-kináz II. aktivitást kapunk. A frekvencia kódolt információt tehát amplitúdó-kódolt információvá alakítja át ez az enzimrendszer. Mivel a CaM-kináz II. aktivitása függ a megelőző Ca^{2+} -impulzusoktól, ugyanakkor az idegsejtekben Ca^{2+} -koncentráció változások követik a sejtek aktivitását, ezért nagy jelentőséget tulajdonítanak ennek az enzimnek a memória kialakításában és egyes tanulási folyamatokban is. (Alkon és mtsai 1986)

Az intracelluláris Ca^{2+} szint vizsgálata

Ca^{2+} -érzékeny festékek: Fluo3-Fluo4

A Fluo származékok nagyon érzékeny festékek a sejtekben levő Ca^{2+} -szint változás mérésére melyet Tsien és munkatársai fejlesztettek ki (Kao és mtsai 1989). A Fluo festékcsaládot nagy fluoreszcens növekedés jellemzi (>100-szoros) a Ca^{2+} kötésekor, ezáltal jól kiemeli a Ca^{2+} koncentráció változásokat,

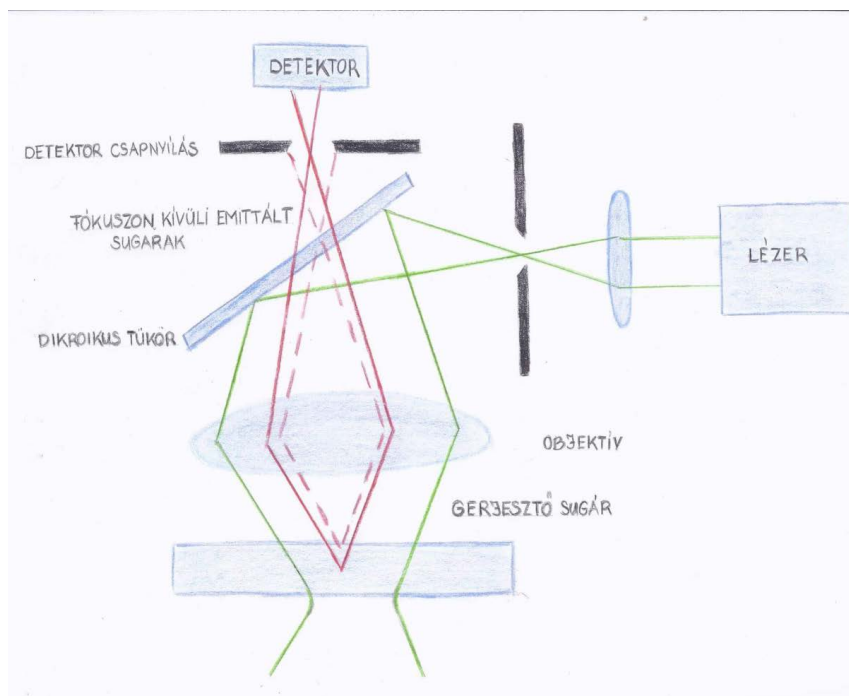
viszont a növekedés mértékének összehasonlítására kevésbé alkalmas, mert a fluoreszcencia növekedése gyorsan telítődik. Látható fény-ingerlékeny festék, 488 nm -es (argon-ion-lézer-források) lézersugárral gerjeszthető. Hatékonyan használható a legtöbb lézer alapú műszernél, azonos fókusztávolságú konfokális mikroszkópnál és áramlás-cytométernél, eredetileg áramláscytometriához és konfokális mikroszkópiához fejlesztették ki, és bizonyították, hogy élő sejtbe bejuttatva jelzi a sejtben bekövetkező Ca^{2+} szint emelkedéseket (Kao és mtsai 1989). A Fluo festékcsaládnál a Ca^{2+} kötésre adott választ nagy fluoreszkálás intenzitás-növekedés jellemzi spektrális eltolódás nélkül (http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Drug-Discovery/Target-and-Lead-Identification-and-Validation/g-protein_coupled_html/cell-based-second-messenger-assays/Fluo-3-calcium-indicator.html). Ebben különböznek az ibolyántúli sugárzással gerjesztett indikátoroktól (például fura-2 és indo-1). A legtöbb kémiai fluoreszcens indikátorral szemben a sejt impermeábilis, csak néhány növényi sejt típus vesz fel közvetlenül Ca^{2+} indikátorokat. Emiatt fejlesztették ki a fluoreszkáló Ca^{2+} indikátorok észter származékeit (AM) amelyek képesek áthatolni a sejtmembránon. Az AM forma mindaddig inaktív, amíg a sejtben az észterázok le nem bontják a fluoreszcenshez kötött észter részt. Ezután válik a próba aktívvá és egyben membrán inpermeábilissá is. A hidrolizált Ca^{2+} indikátor végső intracelluláris koncentrációja számos tényezőtől függ: a Ca^{2+} indikátor jellege, a sejt terhelhetősége, a Ca^{2+} indikátor koncentrációja, a feltöltött sejtek száma, feltöltési idő, hőmérséklet, betöltési feltételek mind befolyásolják ezt. Miután az AM forma oldékonysága alacsony, Pluronic F-127-t vagy az Oremophor E2-t használnak, hogy megkönnyítsék a betöltés folyamatát a sejtbe. A Pluronic F-127 nonionos oldószer mely segíti feloldani a nagy festékmolekulákat az élettani közegben. Ha hosszú a betöltési idő akkor szükséges hozzáadni 1mg/ml BSA-t (Bovum Serum Albumin) az oldathoz, hogy fenntartható legyen a betöltés alatt az ozmolitás. Az AM betöltése még további problémákat okozhat, például egyenetlen eloszlása és hiányos hidrolízise a sejt kompartmentalizációját eredményezheti (Takahashi és mtsai. 1999).

Konfokális mikroszkóp

A fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatát legtöbbször konfokális mikroszkóppal végzik. A kapott digitális kép számítógéppel kezelhető és elemezhető. Több szelet képét összerakva a fluorofór térbeli elhelyezkedése illetve időbeli változása vizsgálható. A konfokális képalkotás lényege, hogy a rendszer csak a fókuszsíkból jövő fényt detektálja. A lézer fényforrás fényét az objektív lencse a minta egy pontjára fókuszálja (ez esetben az objektív játssza a kondenzor szerepét is), majd a mintából eredő fluoreszcens ill. visszavert fényt ugyancsak az objektív gyűjti össze. A minta egy adott síkjából jövő fény az optikai rendszeren való áthaladás után egy adott fókuszpontban összpontosul, majd a detektorba jut. Ha egy kicsiny átmérőjű rést úgy helyezünk el, hogy nyílása éppen erre a fókuszpontra essen, ez nem befolyásolja lényegesen a fókuszsíkból jövő fényt, viszont a fókuszsíkon kívülről jövő fényt szinte teljesen kirekeszti (3. ábra). A képalkotáshoz végig kell pásztázni a vizsgálandó terület minden egyes pontját, amit pásztázó nyaláb alkalmazásával oldanak meg (http://www.muszeroldal.hu/measurenotes/konfok_elm.pdf).

A hagyományos mikroszkópokkal szemben a konfokális mikroszkóp előnyei a következők:

- a) jobb felbontású képek készíthetők, mint hagyományos fénymikroszkóppal;
- b) képes kiszűrni a fókuszsíkon kívülről eredő fényt, így a képek kontrasztosabbak és kevésbé elmosódottak;
- c) az „optikai szeletelés” és a számítógépes adatfeldolgozás segítségével vastag minták 3-dimenziós struktúrái is feltérképezhetők.



2. ábra A konfokális mikroszkóp részei

Elméletileg egy konfokális mikroszkóp felbontása fluoreszcens minták vizsgálata esetén 0,7-szerese egy hagyományos mikroszkóp felbontásának. Ez az optimális érték megközelíthető, de szennyezett, rosszul beállított optikai elemek, vagy rezgések csökkentik az elérhető felbontást. Konfokális mikroszkóppal ún. optikai szeletelés is végezhető, ha a minta szemitranszparens, mert ekkor a fény áthatolhat a felsőbb rétegeken, és megvilágítja az alsóbbakat. A legtöbb biológiai mintára ez a feltétel szerencsére teljesül, így az „optikai szeletelés” révén lehetővé válik vastag preparátumok nagyon vékony (akár 1 μm -nél vékonyabb) szeleteiben zajló folyamatok lokalizálása. Számos optikai szeletet készítve pedig olyan képsorozatot kapunk, amely a minta 3-dimenziós szerkezetét tükrözi. A hagyományos, mechanikai metszési eljárásokkal szemben ez az eljárás gyorsabban kivitelezhető és a kapott képek tökéletesen illeszkednek. Konfokális mikroszkóp alatt élő minták is tanulmányozhatók néhány száz mikrométer vastagságig ([http:// www.mu-szeroldal.hu/measurenotes/konfok_elm.pdf](http://www.mu-szeroldal.hu/measurenotes/konfok_elm.pdf)).

GABA hatására kialakuló Ca^{2+} válaszok túlélő agyszeletekben és sejtenyészetekben

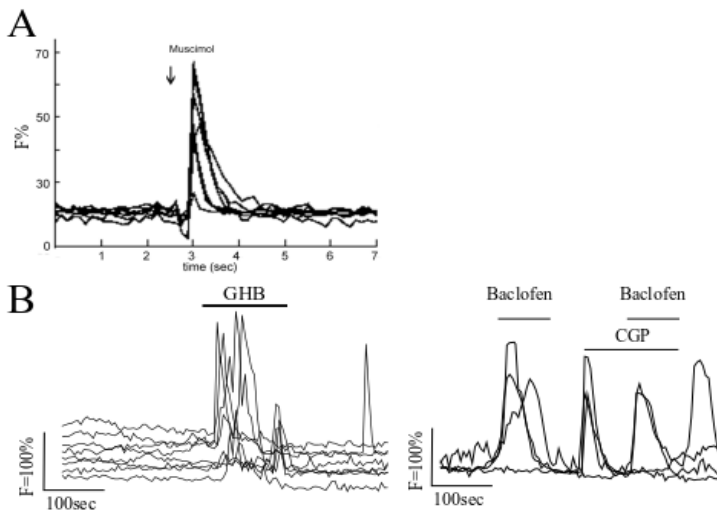
Vizsgálatokhoz többféle preparátum is megfelelő. Hasonló GABA válaszokat lehet kimutatni embrionális őssejtekből (Schwirtlich és mtsai 2010) primer szemlencse tenyészet lencseseljtjeiből (Kwakowsky 2009) és akutt nucleus accumbens szeletekből (Molnár és mtsai 2009). A sejtenyészeteiket a matrigél-fedett fedőlemezekeken készült tenyészetek formájában az akut agyszeleteket vibrotome-mal készített 300 mm vastag, a vizsgálandó területet tartalmazó metszetek formájában készítjük elő (Molnár és mtsai 2009, Schwirtlich és mtsai 2010, 2011). A preparátumokat Fluo-4AM és 1% pluronic savat tartalmazó minden esetben szérum mentes mesterséges extracelluláris oldatban 35°C-on 40 percig inkubáljuk, majd eltávolítjuk a festék tartalmú oldatot és további 20 percet vártunk a deészterifikációra (Molnár és mtsai 2009, Schwirtlich és mtsai 2010, 2011). A festési eljárás paramétereit úgy kell megválasztani, hogy elegendő sejt festődjön meg ahhoz, hogy a mikroszkóp látóterében 15-20 festett sejtet lássunk, de ne tartsuk a tenyészteket vagy szeleteket túl hosszán a fluorescens festéket tartalmazó oldatban, mert az a sejtek károsodásához vezethet. A sejtek válaszadási képességét a kísérletek végeztével a sejtek közelébe juttatott 100 ml 1 M-os KCl oldattal történő aktiválással tudjuk ellenőrizni. A vizsgálati kamrában kialakuló 40 mM-os K^+ koncentráció elegendő a sejtek olyan nagyfokú depolarizálásához, hogy a sejtekbe Ca^{2+} beáramlás történjen a feszültség függő Ca^{2+} csatornákon keresztül, illetve hogy a Ca^{2+} raktárak is aktiválódjanak, és így minden fluorescensen jelölt élő sejt Ca^{2+} választ mutasson, megadva a mikroszkóp látóterében található jelölt és aktiválható sejtek számát. A GABA receptorokat agonistáik segítségével aktiválhatjuk, az agonistákat legtöbb esetben rövid ideig adjuk csak az inkubáló oldathoz, hogy elkerüljük a receptorok deszenzitizálódását. GABA-t, GABA-A receptor agonista a muscimol (10-50 μ M), GABA-B receptor agonista pedig a baclofen (1-30 μ M) és a GHB (1-10 mM). A receptorok blokkolása specifikus antagonistáikkal történhet, ezeket az anyagokat az inkubáló oldathoz adjuk. A GABA-A receptor blokkolásához használhatunk bicucullint (10-30 μ M) a GABA-B receptorok blokkolásához pedig CGP-35348-at (300-500 μ M) vagy CGP-55845-öt (3-10 μ M). A kialakult Ca^{2+} válaszok függését az intracelluláris Ca^{2+} raktároktól hozzá-

adott Ca^{2+} -t nem tartalmazó (0 Ca^{2+}) inkubáló oldatban illetve a belső raktárakat kiürítő anyag (CPA $10 \mu\text{M}$) jelenlétében vizsgálhatjuk. A kísérletek folyamán a fluoreszcencia változását követjük, a lézernyaláb minden másodpercben végigpásztazza a szeletet és a fluoreszcencia értékét a detektor rögzíti. A kísérletek végén meghatározzuk a KCl érzékeny sejtek számát és a különböző kezelésekre választ adó sejtek mennyiségét ennek százalékában fejezzük ki (Molnár és mtsai 2008, Schwirtlich és mtsai 2011). A preparátumokban extracelluláris Ca^{2+} beáramlásából eredő, és belső Ca^{2+} raktárártól függő válaszokat is kaphatunk. A GABA-A receptor függő válaszok kisebb és változékonyabb amplitúdójúak. Muscimol hatására ismételt Ca^{2+} szint emelkedések Ca^{2+} oszcilláció nem alakul ki (3. ábra). Ezek a válaszok nagymértékben csökkennek, ha az extracelluláris oldat nem tartalmaz Ca^{2+} -ot, de érzéketlenek a Ca^{2+} raktárakat kiürítő CPA-ra, vagyis nagyobbreszt extracelluláris Ca^{2+} beáramlása váltja ki őket (Schwirtlich 2010, 2011). GABA-A receptorhoz kapcsolt intracelluláris Ca^{2+} növekedés csak azokban a sejtekben alakul ki, ahol a GABA-A receptor aktiválásakor kialakuló Cl^- áram depolarizáló. Depolarizáló Cl^- áram magas intracelluláris Cl^- koncentrációval rendelkező sejtekre jellemző, ilyenek a embrionális őssejtek és a primer szemlencses sejtek, de a legtöbb neuron illetve glia sejt nem (Ben-Ari 2002).

Összegzés

A GABA rendszer a szervezet sok sejt típusában jelen van és sokrétű funkciót lát el (Ong és Kerr 1990, Varju 2002, Magnaghi és mtsai 2006, Deidda és mtsai 2014). Sokrétű funkcióihoz szükséges, hogy receptorain keresztül különféle sejten belüli jelátviteli utakat aktiválhasson, amelyekhez másodlagos hírvivő molekulák felszabadulása kell. Az egyik központi jelentőségű hírvivő molekula a Ca^{2+} , amely számos útvonal aktiválásában szerepet játszik. A citoszolban a Ca^{2+} 80-90%-a intracelluláris proteinekhez és membránfelszínekhez kötött állapotban található, a maradék képezi a szabad kalciumot. A szabad Ca^{2+} mennyiségét illetve mennyiségének megváltozását fluorescens festékek segítségével mérhetjük, amelyek a citoplazmában található Ca^{2+} kötő fehérjékhez hasonlóan kötik a Ca^{2+} -ot és Ca^{2+} kötésekor fluoreszcenciájuk növekszik ().

Ez a növekedés detektálható, és segítségével a sejten belüli Ca^{2+} dinamika követhető. Direkt vagy indirekt módon a legtöbb ingerületátvivő anyag hat az intracelluláris Ca^{2+} szintre emiatt a rendszer alkalmas a legkülönbözőbb receptorok aktiválódásának kimutatására. A citoszól Ca^{2+} koncentrációja növekedhet ligand-aktivált, Ca^{2+} -ot áteresztő csatornák nyitásakor, akkor, ha depolarizáció hatására a feszültség-függő Ca^{2+} csatornák kinyílnak, illetve ha az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés további Ca^{2+} felszabadulást (CICR) vált ki a Ca^{2+} raktárakból leggyakrabban az ER-ből. Az ER-ből ryanodin vagy IP_3 receptorokon keresztül következik be Ca^{2+} kiáramlás (Szabó, 2009). Sejttenyészetekben és akut szövetekben is vizsgálható a különböző transzmitterek Ca^{2+} dinamikára gyakorolt hatása és a megfelelő antagonisták agonisták alkalmazásával az inkább extracelluláris Ca^{2+} -ot és az extra- és intracelluláris Ca^{2+} -ot is mozgósító receptor altípusok elkülöníthetők. Mivel a mikroszkóp látóterében egyszerre több sejt válasza detektálható, az egyes válaszok kialakulásának időbeli és térbeli dinamikájára is következtethetünk. Ez a módszer előnyös fejlődési stádiumoktól függő, vagy betegségekkel, kezelésekkel kapcsolatos funkciók megjelenésének/elvesztésének vizsgálatára a vizsgált jelenség időbeli alakulása könnyebben követhető így, mint a csak az egyes sejtek viselkedését detektáló technikákkal.



3. ábra GABA agonisták hatására kialakuló Ca^{2+} válaszok

A) GABA-A agonista muscimol hatására kialakuló fluoreszcencia változás primer lencsesajt tenésztben.

B) GABA-B agonisták hatására kialakuló fluoreszcencia változások nucleus accumbens asztrocita sejtekben (balra) és egér embrionális őssejtekben (jobbra). Baclofen hatására még a GABA-B receptor blokkoló jelenlétében is mérünk ismétlődő fluoreszcencia változásokat.

A diagrammok a fluoreszcencia értékeket az alap fluoreszcencia %-ban, az időt másodpercben mutatják. Egy-egy görbe egy feltöltött sejtben történő fluoreszcencia változást mutatja.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- ALKON DL, SAKAKIBARA M, NAITO S, HELDMAN E, LEDERHENDLER I (1986): The role of neurochemical modulation in learning. *Neurosci Res.* 3:487-97
- BEN ARI Y (2002): Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3:728-39.
- BONTING SL, DE PONT JJ, VAN AMELSVOORT JM, SCHRIJEN JJ (1980): Transport ATPases in anion and proton transport. *Ann NY Acad Sci.* 341:335-56.
- BOWERY NG, PRICE GW, HUDSON AL, HILL DR, WILKIN GP, TURNBULL MJ (1984): GABA receptor multiplicity. Visualization of different receptor types in the mammalian CNS. *Neuropharmacology.* 23:219-31.
- BU DF, ERLANDER MG, HITZ BC, TILLAKARATNE NJ, KAUFMAN DL, WAGNER-McPHERSON CB, EVANS GA, TOBIN AJ (1992): Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:2115-9.
- BUDDHALA C, HSU CC, WU JY (2009): A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochem Int.* 55:9-12.
- CHALIFOUX JR és CARTER AG (2011): GABAB receptor modulation of synaptic function. *Curr Opin Neurobiol* 21:339-344.
- DARVAS, Zs. és LÁSZLÓ, V (2005): *Sejtbológia.* Semmelweis Kiadó, Budapest.
- DEIDDA G, BOZARTH IF, CANCEDDA L. (2014): Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci.* 8:119. doi: 10.3389/fn-cel.2014.00119.
- EMRI Zs, ANTAL K, CRUNELLI C (1996): Gamma-hydroxybutyric acid decreases thalamic sensory excitatory postsynaptic potentials by an action on presynaptic GABAB receptors. *Neurosci Lett.* 216:121-4.

- JENSTAD M, CHAUDHRY FH (2013): The Amino Acid Transporters of the Glutamate/GABA-Glutamine Cycle and Their Impact on Insulin and Glucagon Secretion. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4:199.
- JOHNSTON GA (1996): GABA_A receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci*. 1996 17:319-23.
- KAO JP, HAROOTUNIAN AT, TSIEN RY (1989): Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem*. 264:8179-84.
- KWAKOWSKY A (2009): GABA signaling in developing mouse lens PhD disszertáció ELTE. http://teo.elte.hu/minosites/ertekezes2009/kwakowsky_a.pdf
- LEINEKUGEL X, KHALILOV I, MCLEAN H, CAILLARD O, GAIARSA JL, BEN-ARI Y, KHAZIPOV R. (1999): GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol*. 79:189-201.
- MAGNAGHI V, BALLABIO M, CONSOLI A, LAMBERT JJ, ROGLIO I, MELCANGI RC (2006) GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: A cross-interaction with neuroactive steroids. *J Mol Neurosci*. 28:89-102.
- MIKOSHIBA K (2007): IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* 102:1426-46.
- MÖHLER H (2006): GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res*. 326:505-16.
- MOLNÁR T, ANTAL K, NYITRAI G, EMRI Z (2009): gamma-Hydroxybutyrate (GHB) induces GABA(B) receptor independent intracellular Ca²⁺ transients in astrocytes, but has no effect on GHB or GABA(B) receptors of medium spiny neurons in the nucleus accumbens. *Neuroscience*. 2009 162:268-81.
- OLSEN RW és DELOREY TM (1999): GABA receptor physiology and pharmacology. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Eds: George J. Siegel GJ, Agranoff BW Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia
- ONG J. és KERR DI (1990): GABA-receptors in peripheral tissues. *Life Sci* 46:1489-1501.
- ONG J. és KERR DI (2000): Recent advances in GABA(B) receptors: from pharmacology to molecular biology. *Acta Pharmacol Sin*. 2000 21:111-23.
- REIS EM, SLAYMAN CW, VERJOVSKI-ALMEIDA S. (1996): Heterologous expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Biosci Rep*. 16:107-13.
- TAKAHASHI, A., CAMACHO, P., LECHLEITER, J.D. és HERMAN, B. (1999): Measurement of Intracellular Calcium. *Physiol Rev*. 79:1089–1112.
- TÓTH L (2001): A Homológ és heterológ sejt-sejt kommunikáció és következményeinek vizsgálata tumoros mikrokörnyezetet modellező mono- és kokultúrákban. PhD disszertáció Debreceni Egyetem. 2001. http://ganymedes.lib.unideb.hu:8080/dea/bitstream/2437/2456/1/Toth_Laszlo_ertekezes.pdf
- SCHWIRTLICH M (2008): GABA jelátvitel molekuláris alkotóelemei és működése az egyedfejlődés során: két különböző rendszer vizsgálata. PhD dolgozat 2008. (http://phd.sote.hu/mwp/phd_live/vedes/export/marijaschwirtlich.m.pdf)

- SCHWIRTLICH, M., EMRI, Z., ANTAL, K., MÁTÉ, Z., KATAROVA, Z., SZABÓ, G (2010): GABA and GABAB receptors of distinct properties affect oppositely the proliferation of mouse embryonic stem cells through synergistic elevation of intracellular Ca²⁺. *FASEB J* 24:1218-1228
- SCHWIRTLICH M, KWAKOWSKY A, EMRI Z, ANTAL K, LACZA Z, CSELENYÁK A, KATAROVA Z, SZABÓ G (2011): GABAergic signaling in primary lens epithelial and lentoid cells and its involvement in intracellular Ca²⁺ modulation. *Cell Calcium*. 50:381-92.
- SCHOUSBOE I., BRO B., és SCHOUSBOE A. (1977): Intramitochondrial localization of the 4 aminobutyrate 2 oxoglutarate transaminase from ox brain. *Biochemical Journal*, 162:303–307.
- SZABÓ, G (2009): *Sejtbológia Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest.*
- VARJU P (2002): Kismolekulájú „klasszikus” neurotranszmitterek a korai idegi elköteleződés során: a glutaminsav és GABA rendszer vizsgálatai a neuronképzés folyamataiban, in vitro. PHD disszertáció. Semmelweis Egyetem. http://phd.sote.hu/mwp/phd_live/vedes/export/varju.d.pdf
- WALSH MP (1991): The Ayerst Award Lecture 1990. Calcium-dependent mechanisms of regulation of smooth muscle contraction. *Biochem Cell Biol*. 69:771-800.
- YANG, E; SCHULMAN, H (1999): Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 274:26199–208.