

Protein kináz C izoenzimek szerepének vizsgálata keratinocytákon

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a protein kináz C (PKC) izoenzimek (a kalciumfüggő PKC-alfa és delta, valamint a kalcium-független béta és epszilon) eltérő módon befolyásolják sejtenyészetben tartott epidermális keratinocyták proliferációját és differenciálódását. Az enzimtípusok élettani funkcióját az adott fehérjét overexpresszáló sejteken tanulmányoztuk, melyet plazmid alapú transzfekcióval valósítottunk meg. Különböző testfelszíni sérüléseket követően az extracelluláris ATP-nek fontos szerepe lehet a sebgyógyulás folyamatában, mely hatását sejtfelszíni purinoreceptorokon (P2X és P2Y) keresztül fejti ki. Kimutattuk, hogy a csökkent proliferációjú alfa és delta klónok nyugalmi intracelluláris kalcium koncentrációja hasonló értéket mutat, mint a kontroll vagy üres vektorral transzfektált keratinocytáké. Ugyanakkor ezen sejteken az ATP adagolással kiváltott kalciumtranziensek szignifikánsan nagyobb amplitúdóval rendelkeztek, mint a kontroll sejtek esetében. A megnövekedett proliferációval jellemezhető béta és epszilon klónok esetében jelentősen magasabb nyugalmi kalciumkoncentrációt, viszont szignifikánsan kisebb ATP-indukálta kalciumtranzienéseket mértünk. A kalciummérések eredményei bizonyos purinoreceptor altípusok expressziójának jellegzetes változásával voltak összefüggésbe hozhatók, még abban az esetben is, ha azonos csoportba tartozó izoenzimek (α és β) overexpresszióját vizsgáltuk. A PKC béta klónok esetében csökkent P2X1 és megnövekedett P2Y1 immunpozitivitást tapasztaltunk a kontroll és a PKC-alfa sejtekhez viszonyítva. Ugyanakkor az alfa izoenzimet overexpresszáló sejtekben a P2X7 pozitívitas volt szignifikánsan magasabb, mint a többi sejt típus esetében. Ezen eredmények jó egyezést mutatnak azzal a megállapítással, mely szerint az ionotróp P2X receptorokat elsősorban a sejtek differenciálódásával hozhatók összefüggésbe, míg a metabotróp P2Y receptoroknak a sejtproliferáció szabályozásában mutatták ki szerepét. A P2X2 és P2Y2 receptorok expressziójában nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között. Ezen eredményeket bemutató közlemény elfogadásra került az *Experimental Dermatology* folyóiratban (Gönczi M *et al*, *Experimental Dermatology*, 2008).

Munkatervünkben szerepelt, hogy a PKC izoenzimek szerepét nemcsak overexpressziós rendszerekben, hanem az adott fehérje transzlációjának gátlása (RNS interferencia) esetén szintén megvizsgáljuk. Bár a közleményben közvetlenül nem szerepelnek a mérési adatok, de a PKC alfa és béta izoenzimek tranziens siRNS transzfekcióját követően történtek funkcionális kalciummérések a fent említett eredmények megerősítésére. Ezen eredmények az ellentétes hatást mutatták, mint az overexpressziós rendszerek, ám a kontroll sejtekhez viszonyított kalciumkoncentráció változások nem voltak olyan mértékűek, mint azt vártuk. Sajnos az általunk kipróbált siRNS szekvenciákkal stabil transzfekciót nem valósítottunk meg, a tranziens transzfekció esetében pedig nem voltak azonosíthatóak a transzfektált sejtek, így a módszer hatékonyságát sem tudtuk felmérni, amely magyarázatul szolgálhat a kalciummérési eredményekre. Stabil transzfekció létrehozása azért nem történt meg, mert saját tapasztalatok alapján egy olyan általános szabályozó rendszer, mint a PKC esetében egy endogén izoenzim expressziójának megakadályozása olyan kompenzációs mechanizmusokat, így esetleg más izoenzimek kifejeződésének emelkedését hozhatja létre, amely a mi esetünkben jelentősen befolyásolhatta volna az eredményeket.

Mivel ismert, hogy a PKC rendszer nemcsak a foszfatidil-inozitol szignalizációs útvonalakat, de ioncsatornák működését is képes befolyásolni, indokoltnak tartottuk megvizsgálni egy általunk keratinocytákon megfigyelt és jelentős szereppel bíró fehérje, a mechanoszenzitív, ozmotikus stresszre érzékeny ioncsatorna működésére kifejtett hatását. Megvizsgáltuk HaCaT keratinocytákon a csökkent ozmolaritású oldatok hatását a membránpotenciálra, a sejtfelszíni ionáramokra, az intracelluláris kalcium koncentrációra, illetve a sejtek növekedésére. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy hipoozmotikus oldatok a membránpotenciált negatívabb irányba tolták el és ezzel párhuzamosan fokozták a sejten mérhető teljes ionáramot. A fent említett mindkét változás kifejezettebb volt a PKC rendszer aktiválását követően (forbol-észter előkezelés). Az általunk regisztrált, hipoozmotikus oldatban aktiválódó ionáramot nagyrészt mechanoszenzitív anion csatornákon átáramló Cl⁻ ionok hozták létre, mivel kloridmentes közegben a fent említett változások jelentősen csökkentek vagy teljesen hiányoztak. A csökkent ozmolaritású oldatok spontán kalciumszint emelkedéseket hoztak létre a HaCaT sejteken, amely szintén kifejezettebb volt a forbol-

észterrel előkezelt esetekben. A proliferációs vizsgálatokban tapasztalatunk szerint a hirtelen bekövetkező ozmolaritás változás a keratinocyták osztódásának fokozódását okozta. Ezen eredményekből a közlemény elfogadásra került (Gönczi M *et al*, *Experimental Dermatology*, 2007).

Napjainkban egyre fokozódó probléma a rosszindulatú bőrdaganatok, a melanomák számának nagymértékű emelkedése a lakosság körében. Habár a téma a bőrgyógyászati kutatások előterében van évek óta, kevés adat áll rendelkezésre az UV sugárzás kalciumhomeosztázisra, illetve purinoreceptor expresszióra kifejtett hatását illetően. Kísérleteink ezen részében vizsgáltuk fenntartott HaCaT keratinocyták és primer normál humán epidermális keratinocyták (NHEK) fent említett folyamatait rövid idejű, nagy intenzitású (60 mJ/cm^2) UVB besugárzást követően. HaCaT keratinocytákon 1 perces UVB besugárzás a sejtszám szignifikáns csökkenését okozta a kontroll állapothoz viszonyítva, mely változás erőteljes időfüggéssel volt jellemezhető. A besugárzást követő 8, 12, 24, 36 és 48 órával végeztük kísérleteinket, míg a besugárzás időtartamának növelése a sejtszám olyan mértékű gyors csökkenését eredményezte, hogy az a további vizsgálatokat lehetetlenné tette. Az élő sejtek száma 43, 66 és 75 %-al csökkent a besugárzást követő 24, 36 illetve 48 órával, a kontrollhoz viszonyítva. A purinoreceptorok közül az apoptózis-receptorként számon tartott P2X7 receptor degradálódását tapasztaltuk immuncitokémia, Western blot és PCR technika segítségével egyaránt. A besugárzást követően a P2X1 receptor expressziójának csökkenését detektáltuk, míg a P2X3 receptor kifejeződése ugyancsak módosult, a PCR kísérletek ezen utóbbi receptor RNS-ének részleges degradálódását mutatták. Funkcionális méréseink eredményei szerint kontroll sejtekhez viszonyítva a besugárzás szignifikánsan csökkentette a sejten belüli nyugalmi kalciumkoncentrációt ($109 \pm 9 \text{ nM}$ -ról $84 \pm 10 \text{ nM}$ -ra), valamint a keratinocyták ATP-re adott válaszát is ($261 \pm 35 \text{ nM}$ -ról $120 \pm 31 \text{ nM}$ -ra). Hasonló változásokat detektálhattunk NHEK sejteken is, ám a primer eredet és ezen sejtek fokozott érzékenysége miatt a hatások gyorsabban alakultak ki és kifejezettebbek voltak. Eredményeinkből a közlemény elkészítése folyamatban van, egy részük konferencia absztraktként jelent meg (Gönczi M *et al*, *Journal of Investigative Dermatology*, 2008).

A Triadin 95 szerepének vizsgálata harántcsíkt izomtenyészeteken

Sikeresek mondható azonban kísérleteink azon része, ahol a triadin harántcsíkt izmokon leírt, 95 kDa nagyságú fehérjének a kalcium homeosztázisban betöltött szerepét vizsgáltuk. A triadin az izmokban található kalcium felszabadulási komplex első azonosított egysége, amely az excitációs-kontrakciós folyamatok szabályozásán keresztül alapvető szerepet játszik az izomfejlődésben. Első lépésben C2C12 egér eredetű sejtvonalon és egér primer sejt kultúrán vizsgáltuk a triadin overexpresszió hatását. Eredményeink alapján elmondható, hogy a triadint overexpresszáló C2C12 sejtekben az elemi kalciumfelszabadulási események közül az alacsony amplitudójú spark-ok száma megemelkedett, míg a nagyobb amplitudójú ilyen események frekvenciája lecsökkent a kontroll rostokhoz képest. A triadint túlermelő egér primer izomtenyészeteken jelentősen lecsökkent a spontán kialakuló kalcium hullámok frekvenciája.

Kísérleteink következő részében patkány primer izomkultúrán triadin-specifikus shRNS-t (small hairpin RNS) alkalmaztunk a fehérje funkcionális vizsgálatához. A transzfecciót követően immuncitokémiával kimutattuk egyes rostokban a triadin expressziójának csökkenését. Konfokális mikroszkópos felvételeink során azt tapasztaltuk, hogy a triadin-shRNS-sel transzfecciózott rostok esetében a spontán kialakuló kalciumhullámok és kalcium spark-ok szignifikánsan nagyobb amplitúdóval és frekvenciával jellemezhetők, mint a kontroll izomrostokon. Egyedi sejteken történő intracelluláris kalciummérés során kimutattuk, hogy mind a nyugalmi kalciumkoncentráció, mind az excitációs-kontrakciós kapcsolatot szemléltető kálium-indukálta depolarizáció szignifikánsan megváltozott a triadin fehérje expressziójának csökkenése vagy növekedése esetén. Ezen eredményeinkből a közlemény elfogadásra került (Fodor J *et al*, *Journal of Physiology*, 2008).

Elkezdődtek azon vizsgálatok is, ahol a triadin expresszióját az RNS interferencia segítségével *in vivo* változtatjuk meg. Ennek során igen hosszadalmas munkával, de egyelőre eredményesnek tűnő módon sikerült egérben és patkányban elektroporációval megvalósítani a transzfecciót. A transzfecciót követően a vizsgálni kívánt izmok kiperarálása és enzimes emésztése történik, majd az épen maradt rostokon a kísérletnek megfelelően immunfestés, illetve fluoreszcens festékekkel történő

feltöltés következik, mely utóbbi lehetővé teszi az elemi kalciumfelszabadulási események vizsgálatát konfokális mikroszkóppal. A transzfektált rostok azonosítását a specifikus shRNS szekvencia tervezésnél megvalósított fluoreszcens jelölése teszi lehetővé. Ezen kísérleteink kivitelezése még folyamatban van, az eredmények közlésére egyelőre nem került sor.

Terveink között szerepelt simaizomsejtek kalciumhomeosztázisának, konkrétan a kalcium-aktivált káliumcsatornák és a kétpórusú káliumcsatornák (K_{2P}) szerepének vizsgálata. A munkaterv elkészítésekor, kollaboráció keretén belül, rendelkezésünkre álltak operációból származó humán minták, amelyekből elindult a frissen izolált, illetve primer simaizom sejt kultúrák fenntartásának beállítása. Azért szerettük volna ezen lehetőséget kihasználni, mert ugyan rendelkezésre állnak simaizom sejt vonalak, de azokban a sejtek élettani tulajdonsága eltér az *in vivo* állapottól. Néhány esetben történt kísérlet különböző K_{2P} csatornák expressziójának bizonyítására immuncitokémiával, illetve funkcionális elektrofiziológiai mérésre, mely utóbbi esetben sajnos nem sikerült egyértelműen kimutatnunk a csatornán átfolyó áramot. Ennek oka az, hogy az overexpressziós rendszerekkel ellentétben több más káliumcsatorna is expresszálódik a simaizomsejteken, amelyek akár nagyságrendileg is nagyobb áramokat hozhatnak létre, mint az általunk vizsgálni kívánt endogén kétpórusú káliumcsatornák. Sajnos a kollaborációs partnernél megváltoztatott operatív folyamatok miatt ezen lehetőségünk igen hamar megszűnt, humán minták így nem álltak rendelkezésünkre.

TASK-3 receptor kimutatása melanoma sejtekben

Mivel a K_{2P} csatornák élettani szerepe egyre több sejtben és vizsgálati rendszerben bizonyított, igen érdekesnek és fontosnak tűnt olyan kísérletek kivitelezése, amely a rendelkezésünkre álló több melanoma sejt vonalban, illetve humán szöveti preparátumokon térképezi fel ezen csatornatípusok esetleges expresszióját, illetve azok szerepét.

A K_{2P} csatornák szerepét a membránpotenciál beállításában és annak megváltoztatásában már számos helyen leírták, sőt jelenlétüknek pro- illetve anti-apoptotikus szerepet tulajdonítanak. A beszámolási periódusban kollaborációs partnerünkkel (Sigma-Aldrich Izrael) kifejlesztettünk egy humán TASK-3-specifikus monoklonális antitestet. Az ellenanyag használhatóságát immunhisztó- és immuncitokémiai körülmények között vizsgáltuk, a specificitást tranziens és stabil transzfekciós rendszerek és Western-blot technika alkalmazásával ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy mind a sejttenyészetben fenntartott, mind a szöveti preparátumban található melanoma malignum sejtek erős TASK-3 immunpozitivitást mutatnak. Az immunjelölődés döntően intracelluláris volt, továbbá érintette a melanoma sejtek nucleusát is. A fehérje ezen váratlan megoszlását egy TASK-3-GFP fúziós fehérjét kódoló vektor konstruálásával, és a szintetizálódott termék megoszlásának vizsgálatával erősítettük meg (Pocsai K *et al*, Cell. Mol. Life Sci; 2006).

Mivel ezen fehérjéknek eddig nem ismeretes specifikus gátlószere, a csatorna funkciójára expressziójának gátlásával próbáltunk következtetni a fenti sejteken. Erre a célra igen alkalmasnak tűnt az egyre szélesebb körben alkalmazott RNS-interferencia, így kísérleteinkhez TASK-3 mRNS-re specifikus shRNS szekvenciákat terveztünk. A transzláció gátlását, s ennek eredményeként a fehérje expressziójának csökkenését immuncitokémiával követtük nyomon. Ezzel együtt a melanoma sejtek számának csökkenését tapasztaltuk a sejttenyészetben, míg az shRNS-transzfekciót követő funkcionális változásokat stabil transzfekciós rendszerben (HEK293 sejtek) patch-clamp technika alkalmazásával követtük nyomon (Gönczi M *et al*, Joint Meeting of the Physiological Society, the Brazil Physiological Society and the FEPS, Brazília; 2006).

Kísérleteink következő részében a melanoma sejtek TASK-3 immunpozitivitását részletesebben is megvizsgáltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a csatorna expressziója elsősorban a mitokondriumokra korlátozódik, ezt kettős immunfestéssel, mitokondriális frakció izolálással és ezen frakciókból nyert csatornákon történő single-channel mérésekkel igazoltuk (Rusznák Z *et al*, Virchows Archiv, 2008).

Ugyancsak a K_{2P} csatornák vizsgálatához tartoznak egy másik fehérje, a TREK-1-el végzett kísérletek. Kollaborációs partnerünk (Faculty of Life Sciences, The University of Manchester) felkérést kapott korábban egy potenciális specifikus TREK-1 aktiválószer tesztelésére. A csatorna

mejlétét illetve működőképes kifejeződését TREK-1-et overexpresszáló HEK293 sejtvonalon, molekuláris biológiai és funkcionális mérésekkel bizonyítottuk. Az elektrofiziológiai vizsgálatok során először azon ismert anyagokat (arachidonsav, bikarbonát, fluoxetin) teszteltük, amik korábbi eredmények alapján bizonyítottan befolyásolják a csatorna működését, majd a BL1293 anyag hatásait különböző koncentrációban és eltérő protokollok segítségével vizsgáltuk. Eredményeink szerint az overexpresszált csatornát a BL-anyag koncentrációfüggő módon aktiválja, a félhatásos dózis 700 nM-nak adódott. A szer specifikus hatását más K_{2p} csatornákat overexpresszáló HEK293 sejtvonalakon (TASK-2, TASK-3) teszteltük, ahol a módszerünkkel mért ionáramokra az anyag nem volt hatással. Ezen eredmények poszter formában kerültek bemutatásra (Gönczi M *et al*, EPHAR Meeting, Manchester, 2008). Terveink szerint a későbbiekben megvizsgáljuk az anyag membránpotenciált befolyásoló hatását izolált húgyhólyag simaizom preparátumokon, mivel feltételezhető a TREK-1 fehérje szerepe túlműködéses humán hólyagbetegségekből.