

Zárójelentés

OTKA K 60740: K^+ csatornák és a T sejt receptor jelátvitelének kapcsolata

Dr. Panyi György

2005-2009

A limfociták specifikus antigén hatására bekövetkező klonális proliferációja az immunrendszer működésének egyik meghatározó eseménye. A limfocita proliferáció a T sejt receptor/CD3 komplex (TCR/CD3) aktiválását követően indul be számos jelátviteli útvonal aktiválását követően. A jelátvitelben a protein kinázok mellett (pl. Lck és Fyn; ZAP-70; Tec) a citoszol szabad Ca^{2+} koncentrációjának kétfázisú emelkedése vesz részt. A Ca^{2+} jel magába foglalja az IP_3 -függő Ca^{2+} felszabadulást az endoplazmatikus retikulumból, valamint a raktárak kiürülését követő Ca^{2+} beáramlást az extracelluláris térből az úgynevezett “store-operated” vagy kalcium felszabadulás aktiválta Ca^{2+} csatornákon keresztül (angol rövidítés: CRAC). A Ca^{2+} -dependens jelátviteli útvonal meghatározóan függ a plazmamembránban elhelyezkedő K^+ csatornák aktivitásától. A nyitott CRAC csatornákon folyó Ca^{2+} áram elektrokémiai hajtóerejéhez komoly hozzájárulást ad a sejtek membránpotenciálja. A T sejtek membránpotenciálja -50 és -60 mV között van, melyet döntően két különböző K^+ csatorna, a feszültség-függő depolarizáció-aktivált Kv1.3 és a Ca^{2+} -aktivált K^+ csatorna (IKCa1) határoz meg. E két ioncsatorna által létrehozott kation kiáramlás a sejtmembránt hiperpolarizált állapotban tartja még a depolarizáló hatást jelentő Ca^{2+} influx mellett is, biztosítva ezzel a Ca^{2+} beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő Ca^{2+} -mediált jelátvitelt. A T sejtek aktiválásának K^+ csatorna aktivitás-függésére a legmeggyőzőbb bizonyítékot az adja, hogy a csatornák gátlása depolarizálja a T sejtet, ami gátolja a Ca^{2+} jel kialakulását és a sejtek osztódását. A K^+ csatornák aktivitása a gátlószerek mellett szabályozható a csatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek módosításával. Ez utóbbi történhet fehérje-lipid és fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül, ami magába foglalja az ioncsatornák protein kinázok által történő szabályozását is. A kutatási program ezek közül a Kv1.3 csatornák molekuláris farmakológiájával valamint az immunológiai szinapszisban (IS) kialakuló szignalizációs komplex és a Kv1.3 csatornák funkcionális aktivitása közötti kapcsolattal foglalkozik.

A kutatási tervnek megfelelően a project során jelentős eredményeket értünk el, munkánk során 15 referált folyóiratban megjelent közlemény született melyek kumulatív impakt faktora 53,297. A kutatás eredményeit röviden az alábbiak szerint, pontokba szedve foglaljuk össze.

1 Nagy specificitású Kv1.3 csatorna gátlószerek izolálása és tanulmányozása

1.1 Ioncsatorna bank kialakítása

A Kv1.3 specifikus toxinok jellemzéséhez, és különösen a szelektivitási profil meghatározásához egy 9 csatornafajta vizsgálatára rutinszerűen használható panelt állítottunk be, mely tartalmazza a Shaker családból a Kv1.3-al rokon Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, és a Kv1.5 csatornákat, a HERG (Kv11.1), a Kv2.1 csatornákat valamint a T sejtek Ca-aktivált K^+ csatornáját (K(Ca)3.1) és a K(Ca) 1.1 csatornákat. E rendszer beállításával a pályázat tárgyát képező, illetve a jövőben felfedezendő gátlószerek szelektivitása gyorsan és hatékonyan mérhető és értékelhető.

1.2 *A Centruroides. elegans* skorpió méreganyagának vizsgálata

A *Centruroides. elegans* skorpió méreganyagában három, nagy affinitású Kv1.3 gátló peptidet írtunk le. Szekvencia és filogenetilai analízis alapján a molekulák a skorpió toxinok

2-es alcsoportjába tartoznak, egyezményes elnevezésük α -KTx2.8 (Ce1), α -KTx2.9 (Ce2), α -KTx2.11 (Ce4). A toxinok közül a legnagyobb Kv1.3 affinitása a Ce2-nek volt (egyensúlyi disszociációs állandó (K_d)=250 pM), míg a Ce1 és Ce4 toxinoknak is szub-nanomoláris affinitása volt Kv1.3 iránt (rendre $K_d=0.7$ és $K_d=0.98$ nM). A T sejtek másik K^+ csatornáját, az IKCa1-et egyik toxin sem gátolta, valamint hatástalanok voltak a Shaker Kv2.1 feszültség kapuzott K^+ csatornákra is. A toxin farmakológiai profilja alapján (affinitás és szelektivitás) felmerül annak a lehetősége, hogy a Ce2 hatásosan gátolja a T sejtek proliferációját olyan esetekben, amikor a Kv1.3 szelektív gátlása szükséges (pl. egyes autoimmun betegségek kezelésében) (Olamendi-Portugal és mtsai, Toxicon, 2005).

1.3 *A Centruroides suffusus suffusus skorpió méreganyagának vizsgálata*

A *Centruroides suffusus suffusus* skorpió mérgéből HPLC módszerrel izolált Css20 toxin molekula súlya 4000.3, a molekula háromdimenziós szerkezetét 3 diszulfid híd stabilizálja. A primer aminosav sorrendet több biokémiai eljárás kombinációjával (Edmann degradáció, tömegspektrometria) határoztuk meg, s a következő szekvencia adódott a toxint alkotó 38 aminosavra: IFINVKCSSPQQCLKPCAFAFGISAGGKCKINGKCKCYP. A Css20 szekvenciája több mint 54 % identitást mutatott a K^+ csatornablokkoló peptidek α -KTx2 csoportjának egyéb tagjaival, így a nemzetközileg elfogadott kritériumok alapján a Css20 az α -KTx2.13 nevet kapta. A farmakológiai vizsgálat során kiderült, hogy a Css20 toxin nem csak a Kv1.3, hanem a Kv1.2 csatornákat is nagy affinitással gátolja, a gátlás hatékonyságát jellemező IC50 értékek Kv1.2-re 1.3 nM míg Kv1.3-ra 7.2 nM. A Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon kívül a Css20 más vizsgált csatornákat (Kv1.1, Kv1.4, Kv1.5, Kv11.1, Kv2.1, K(Ca)3.1, K(Ca) 1.1 és NaV1.5) csatornákat nem gátol. A Kv1.2 vs. Kv1.3 szelektivitást meghatározó molekuláris kölcsönhatások megértéséhez összehasonlítottuk a Kv1.3 szelektív, a Kv1.2 szelektív és a Kv1.2-t és Kv1.3-at is gátló toxinok primer szekvenciáját. Megállapítottuk hogy a Kv1.3 vs. Kv1.2 szelektivitásért feltehetően két pozícióban elhelyezkedő aminosav a felelős. Az egyik a pórusba benyúló K oldallánctól C terminális irányban lévő második aminosav (Kv1.3 szelektívben M, míg Kv1.2 szelektívben I), a másik pedig a K-tól 9 pozícióval C terminális irányban lévő aminosav, ami Kv1.2 szelektív csatornában tirozin (Y) míg Kv1.3 szelektívekben F, T vagy N. Következtetéseink helyességét molekuláris modellezéssel is igazoltuk, elkészítettük a Css20 dokkolási modelljét a Kv1.3 és a Kv1.2 csatornákra. A modellezés az általunk jósolt kölcsönhatásokat igazolta. A toxinról szóló tanulmányt rangos nemzetközi folyóiratban közöltük. (Corzo és mtsai, Biochem. Pharmacol., 2008).

1.4 *Tityus stigmurus skorpió méreg anyagának vizsgálata*

A *Tityus stigmurus* skorpió mérgéből egy új, a K^+ csatornákat az eddigiektől eltérő módon gátló peptidet, a Tst26-ot izoláltuk és jellemeztük. A HPLC tisztítást követően Edman-degradáció és tömegspektrometria alkalmazásával meghatároztuk a toxin elsődleges szerkezetét. Kimutattuk, hogy a peptid 37 aminosavból áll, és – más gátló hatású skorpiótoxinokhoz hasonlóan – szerkezetének kialakításában 3 diszulfid híd vesz részt. A toxinban megtalálható a K^+ csatorna felismeréséért felelős „esszenciális diád” is (Lys27, Tyr36). Elektrofiziológiai méréseik alapján a Tst26 mind a hKv1.3, mind pedig a hKv1.2 csatornákat nagy affinitással ($K_d = 1.9$ nM és 10.7 nM) blokkolta, ugyanakkor más csatornákra 10 nM-os koncentrációban nem volt hatással ((Kv1.1, Kv1.4, Kv1.5, Kv11.1, K(Ca)3.1, K(Ca) 1.1 és NaV1.5). A toxint nagy affinitással kötő két csatorna feszültségfüggő (steady-state) kapuzási paramétereit a toxin nem befolyásolta, Az összes többi eddig vizsgált toxinnal ellentétben azonban a Tst26 jelentősen lassította a Kv1.3 inaktivációs kinetikáját. Ennek magyarázata az lehet, hogy toxin-kötött állapotban a csatorna pórusába benyúló Lys oldallánc (vagy a pórusba rekedt K^+) kölcsönhat a K^+ csatorna kapuzási

menchanizmusával, ami a toxin gyors asszociációs és disszociációs kinetikája miatt mérhető makroszkópos kinetikai változást okoz a teljes-sejt áramban (Papp és mtsai, *Toxicon*, 2009)

A project során felhalmozott molekuláris farmakológiai tapasztalatainkat sikeresen használtuk pl. a belső fül külső szőrsejtjeiben expresszáldó K^+ csatornák elkülönítéséhez (Szücs és mtsai, *Eur. J. Physiol.*, 2006).

1.5 A toxinok kötődését meghatározó molekuláris struktúrák vizsgálata

A K^+ csatorna gátló toxinok és a Kv1.3 csatornák kölcsönhatásainak megértése szempontjából nélkülözhetetlen a toxin receptoraként szolgáló, a Kv1.3 extracelluláris pórúsát övező aminosavak funkcióinak megértése. Ezek közül is kiemelkedő a 399-es pozícióban található, reverzibilisen protonálható His vizsgálata, u.i. ez az aminosav kritikus mind a toxin kötés mind pedig a Kv1.3 inaktivációjának szabályozása szempontjából. Kísérleteink során meghatároztuk a H399 protonációjának hatását az inaktivációs kinetikára és az inaktiváció K^+ koncentráció függésére (Somodi és mtsai, *Eur. Biophys. J.* 2008). Az így megismert biofizikai jellemzőket a későbbiekben a toxin-csatorna kölcsönhatás vizsgálatára kívánjuk használni, u.i. a H399 reverzibilis protonációja funkcionális, pH-függő „mutációt” jelent a toxin kötés szempontjából.

1.6 Nem-peptid gátlószerek állapotfüggő kötődésének vizsgálata

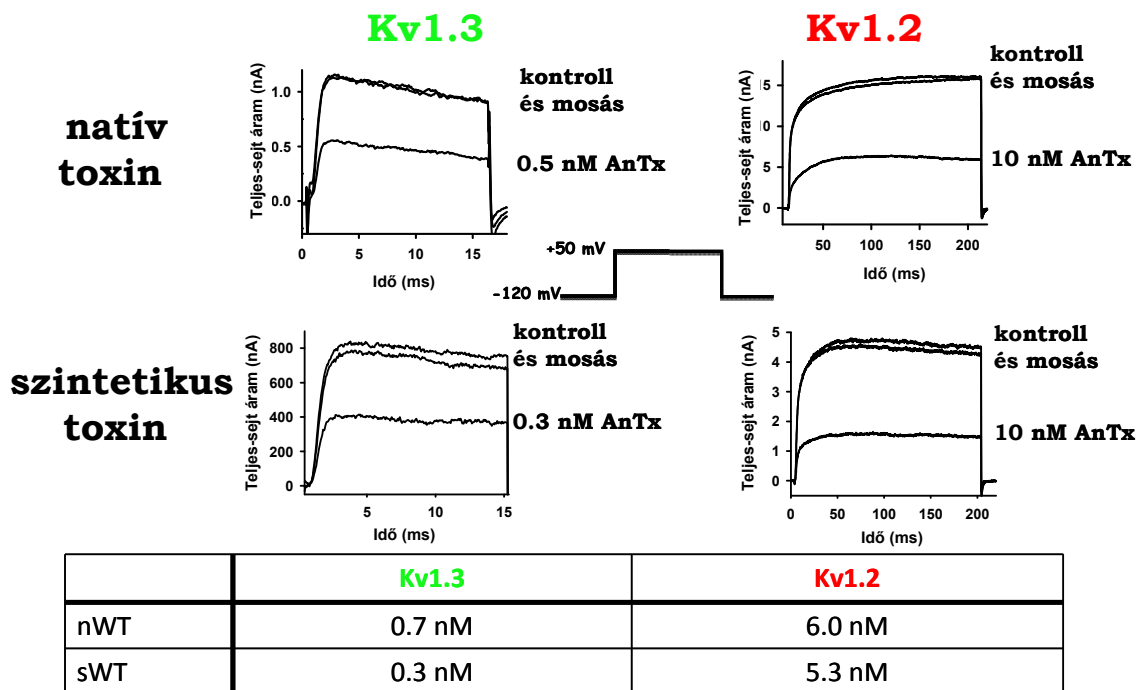
A Kv1.3 csatornák peptid gátlószerei mellett egyre nagyobb jelentőséggel bírnak az ún. kis-molekula gátlószerek, melyek a csatorna inaktivált állapotához kötődnek. A gátlószerek és a csatorna kölcsönhatásának megértése szempontjából elengedhetetlen a csatorna aktivációs kapu állapotának ismerete inaktivált csatorna esetén. Ennek vizsgálatához a pórus citoszolikus oldalán az aktivációs kapu mögötti pozícióba egy ciszteint helyeztünk el, és e cisztein SH reagensekkel (MTSET) történő módosíthatóságán keresztül határoztuk meg az aktivációs kapu állapotát. Kimutattuk, hogy inaktivált csatornákon az aktivációs kapu nyitott, és a membrán hiperpolarizációjakor lassabban zár be mint nyitott csatornák esetén. Ezen eredmények világossá teszik számunkra azt az időintervallumot, amíg a molekulák a csatornával kölcsönhathatnak (Panyi és Deutsch, *J. Gen. Physiol.* 2006), másrészt a kifejlesztett módszer a lehetővé tette a pórus szerkezetének feltérképezését a csatorna inaktivált állapotában. E kísérletek igen jelentős előrehaladást jelentenek a Kv1.3 csatornák molekuláris farmakológiájának megértése terén (Panyi és mtsai, *Current Pharmaceutical Design* 2006). Ezzel összhangban kidolgoztunk egy olyan eljárást, amivel meg lehet határozni egy kis-molekula gátlószere affinitását mind a csatorna nyitott, mind pedig inaktivált állapotához. A módszer alapja az, hogy a gátlószere bekötődése a csatorna vízzel telt üregébe a kötőhely telítettségétől függően gátolja a molekula kötőhelyével átfedő cisztein oldalláncok reagálását MTSET reagenssel. Így nem vezető állapotú csatorna iránti gátlószere affinitás is meghatározható, ami hagyományos, az áram mérésén alapuló elektrofiziológiai technikával elképzelhetetlen. A kísérletek eredménye azt mutatta, hogy a csatorna zárt és inaktivált állapota különböző affinitással köti a tetraetilammónium molekulákat, a nyitott állapot affinitása mintegy 10-szerese az inaktivált állapot affinitásának. Magának a technikának, és a technika alkalmazásával nyert információnak igen komoly jelentősége van a kis-molekula ioncsatorna gátlószere fejlesztésében. (Panyi és Deutsch, *J. Gen. Physiol.* 2007).

1.7 Toxinok *in vitro* előállítása.

A kutatási program egyik sarkalatos pontja a toxinok *in vitro* előállítása ami lehetőséget ad mutáns toxinok készítésére is. A toxinok *in vitro* előállítása nem triviális, a 35-37 aminosavból 6-8 cisztein, amelyek 3-4 diszulfid hidat hoznak létre, és ezek stabilizálják a molekulák 3 dimenziós szerkezetét. A toxinok előállítására számos kísérleti rendszert próbáltunk ki melyek közül három bakteriális expressziós eljárás eredménytelennek, vagy

nem kellően reprodukálhatónak bizonyult. Végül az SZTE-vel kollaborációban (Prof. Tóth Gábor) sikerült az anuroctoxin előállítása peptid szintézis eljárással. A szintetikus anuroctoxin félhatásos dózisa 1.31 nM-nak adódott, ami jól közelíti a vad típusú toxin 0.73 nM-os egyensúlyi disszociációs állandóját, valamint a gátlás kinetikája is nagyon hasonló a vad típusú toxinéhoz. Ezen eredményünk tükrében tervezzük a toxin specifikus módosítását. A természetes anuroctoxin gátolta mind a Kv1.3 és Kv1.2 csatornákat. A Css20-al végzett kísérleteink alapján olyan mutációkat terveztünk az anuroctoxinban, melyek a Kv1.3 szelektivitás fokozására hivatottak. Három mutáns el is készült, ezek farmakológiai jellemzése most folyik (dózis-hatás görbék felvétele a szintetikus természetes és a három szintetikus mutáns toxinra Kv1.2, Kv1.3 és IKCa1 csatornákon). Előzetes eredményeink igen biztatóak.

A natív és a szintetikus anuroctoxin összehasonlítása



1. ábra. A natív és szintetikus anuroctoxin összehasonlítása. A natív és szintetikus anuroctoxin Kv1. és Kv1.2 csatornákat gátló hatását teljes sejt patch-clamp mérésekkel határoztuk meg. A táblázat az árammérésekből számított disszociációs állandókat mutatja.

1.8 Kv1.3 gátlók biológiai hatékonyságának vizsgálata

Eljárást dolgoztunk ki az immunszuppresszív peptidek biológiai hatékonyságának mérésére, melynek alapja a késői típusú hiperszenzitivitási reakció gátlása az általunk jellemzett toxinokkal. A DTH reakciót patkányok fülében váltjuk ki, és a fül vastagságát hasonlítjuk össze toxin kezelt és kontroll állatsoport között. A biológiai próba elvégzése nagymértékben fogja növelni a későbbiekben a közleményeink értékét. Az általunk fejlesztett molekulák immunológiai reakciók gátlására történő felhasználhatóságáról közleményeket jelentettünk meg (Varga és mtsai, *Current Pharmaceutical Design*, 2007, Varga és mtsai, *Immunol. Lett.* 2010).

2 Kv1.3 csatornák és az immunológiai szinapszis

2.1 Membrán lipidek és Kv1.3 funkció vizsgálata

Az immunológiai szinapszisba átrendeződő molekulák nagy része lipid raftokban helyezkedik el, ill. a raft és non-raft kompartmentek közötti dinamikus átrendeződés figyelhető meg. Ez a az ioncsatornák funkciójának jelentős megváltozásával járhat együtt, ill. a csatornák lipid raftokba történő rendeződése az immunológia szinapszisban történő felhalmozódás kulcsa lehet. Ennek tükrében vizsgáltuk a plazma membrán ceramid tartalma és a Kv1.3 csatornák aktivitása közötti kapcsolatot. Az IP12-7 T sejtek elektrofiziológiai vizsgálata során bebizonyítottuk, hogy ezen sejtek domináns feszültség kapuzott K^+ csatornája a Kv1.3. A teljes sejt áram amplitúdóját 37 °C-on mérve megállapítottuk, hogy a C2 ceramid időfüggően csökkenti a Kv1.3 áram amplitúdót, 10 perc elteltével az amplitúdó a kiindulási érték felére csökken. A Kv1.3 csatornák gátlásával egyező időskálán a sejtek depolarizációja mérhető. Eredményeink arra utalnak, hogy a plazmamembrán ceramid tartalmának fokozása, pl. a Fas receptor/Fas ligand mechanizmus aktiválásán keresztül, negatívan befolyásolja a T sejtek aktiválhatóságát, melyben kulcsszerepet játszhat a Kv1.3 csatornák ceramid-indukálta membrán doménekbe történő átrendeződése és foszforilációs szabályozása (Detre és mtsai, Cell. Signal. 2006). Ezen mérések alapján további kísérleteket terveztünk a lipid összetétel és a csatorna kapuzása közötti kapcsolat szélesebb körű, modell szintű vizsgálatára. Kísérleteinkben különböző zsírsavak membránba történő beépülésének hatását vizsgáltuk a Kv1.3 csatornák kapuzási kinetikájára PHA és IL-2 stimulált humán T sejteken. A zsírsavak limfocita membránba történő beépülését gázkromatográfiásan igazoltuk. Eredményeink szerint a kifejtett hatás összefüggésben van az adott zsírsav telítettségének mértékével és/vagy lánchosszával. Minden vizsgált többszörösen telítetlen zsírsav (PUFA) gyorsította a Kv1.3 csatornáinak aktivációs és inaktivációs kinetikáját, ugyanakkor az egyszeresen telítetlen (MUFA), vagy telített (SFA) zsírsavak membránba épülése nem befolyásolta azt. Eredményeink tehát azt igazolják, hogy a lipid környezet megváltozása a Kv1.3 kapuzását jelentősen befolyásolja (Székely és mtsai, Immunobiology, 2007).

2.2 A Kv1.3 csatornák immunológiai szinapszis (IS)-beli lokalizációjának következménye a csatorna kapuzására.

A kísérletek elvégzéséhez egér sejt vonalakon alapuló modellrendszert állítottuk be, ahol a CH-12.LX B sejtek antigén prezentáló (Conalbumin) míg a GFP konjugált protein kináz C θ -t expresszáló D10 sejtek a Conalbumin antigént specifikusan felismerő T sejteket jelentik. E modellrendszerben a sejt kapcsolatok jelentős részében kialakul az immunológiai szinapszisa jellemző sejt-morfológiai változás, ezen felül a GFP-konjugált PKC- θ sejtbeli eloszlásának fluoreszcenciás mikroszkóppal történő követése biztosítja azt, hogy elektrofiziológiával (patch-clamp) valóban csak az eredményes szinapszist mutató sejteket vizsgáljuk. E kísérletekhez a patch-clamp berendezést fluoreszcenciás mikroszkópra kellett építeni.

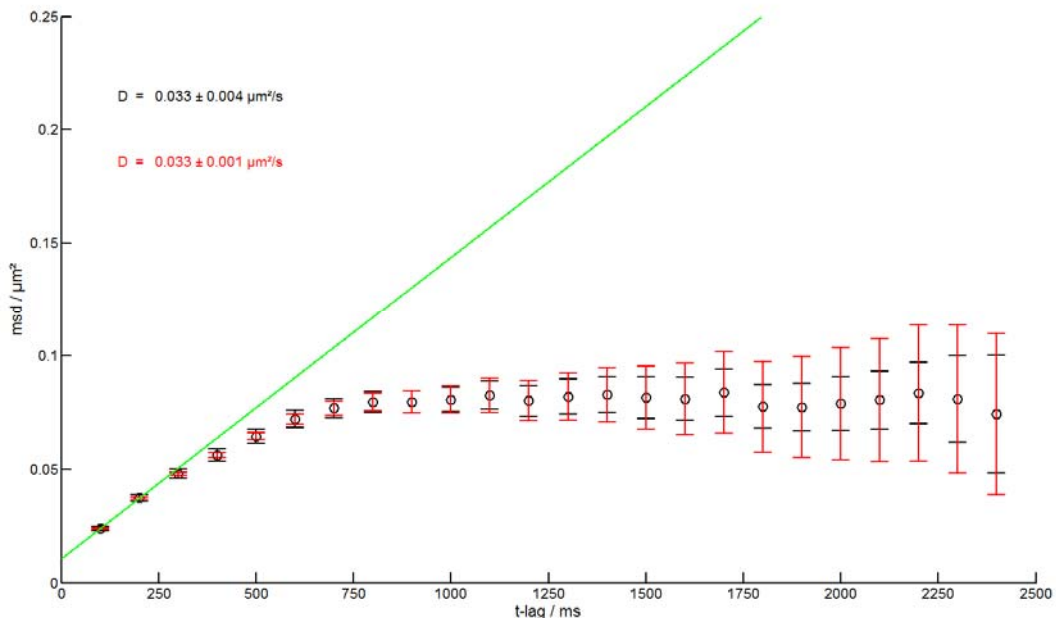
Az elektrofiziológiai kísérletek során kimutattuk, hogy a D10 PKC- θ sejtek a humán T sejtekhez hasonlóan Kv1.3 csatornákat fejeznek ki. Ezt követően összehasonlítottuk a Kv1.3 csatornák kapuzását jellemező, fentebb felsorolt paramétereket immunológiai szinapszist kialakító vs. egyedül álló, szinapszist nem képző sejteken rögzített K^+ áramok jellemző paramétereivel.

Megállapítottuk, hogy az IS-t képző és az egyedülálló sejtekben rögzített K^+ áramok egyensúlyi aktivációjának feszültség-függése azonos ($V_{1/2} = -25.1 \pm 2.8$ mV (n=5) egyedülálló T sejten, míg $V_{1/2} = -22.3 \pm 3.0$ mV (n=5) IS-ben lévő T sejten), ugyanakkor jelentős különbséget mutattunk az áramot jellemező kinetikai paraméterekben. IS-ben lévő T sejteken a Kv1.3 aktivációs kinetikája szignifikánsan lassabb (2.3 ± 0.2 ms vs. 1.4 ± 0.1 ms (p=0.05))

míg az inaktivációs kinetika szignifikánsan gyorsabb volt (262 ± 28 ms vs. 350 ± 32 ms ($p=0.05$)) mint egyedülálló T sejtek esetén. Az egyedülálló és IS-ben lévő T sejtek sejtmembránjának kapacitása statisztikailag azonos volt, ami azt mutatja, hogy az időállandók különbözőségéért nem lehet az felelős, hogy a szinapszisban lévő T sejt az antigén prezentáló sejt membránjai fúzionálnának a szoros fizikai közelségben lévő sejteken. Munkahipotézisünk szerint a Kv1.3 áram aktivációs és inaktivációs kinetikájának módosításáért az lehet felelős, hogy a Kv1.3 csatornák az IS-be rendeződnek át, ahol a hozzájuk fizikai közelségbe került poritein kinázok és foszfatázok a csatorna működését foszforilációs úton szabályozzák. E hipotézis helyességét megvizsgáltuk protein kináz inhibitorok alkalmazásával (Toth és mtsai, Immunology Letters, 2009, Hajdu és mtsai, Immunology letters, 2010).

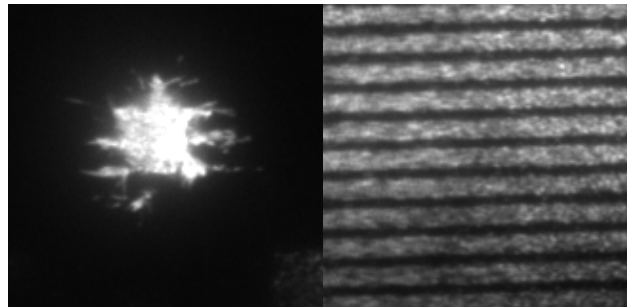
2.3 Kv1.3 csatornák mozgásának vizsgálata a sejtmembránban egy-molekula fluoreszcencia vizsgálatokkal

A pályázat munkatervének megfelelően megvizsgáltuk a Kv1.3 csatornák diffúzióját Jurkat E6-1 T sejtek felszínén egy-molekula fluoreszcencia technikával, ill. a T sejt receptor és a Kv1.3 csatornák ko-lokalizációját egy új, ún. micropatterning technikával is jellemeztük Prof. Gerhard Schütz laboratóriumában. A kísérletek elvégzéséhez zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) konjugált Kv1.3 csatornákat tranziensen kifejező Jurkat T sejteket használtunk. A GFP-konjugált csatorna tulajdonságai jelenlegi vizsgálataink szerint nem térnek el a jelöletlen vad típusú csatornától, azaz a csatorna funkcionálisan intakt. A Kv1.3 csatornát egy-molekula szinten, „total internal reflection” (TIR) konfigurációban vizsgáltuk, és meghatároztuk a diffúziós állandóját. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az ioncsatornák nem mozogtak szabadon, mozgásuk bizonyos területekre korlátozódott. A diffúziós állandót az $MSD = \sigma^2 + 4Dt_{lag}$ képlet alapján becsültük meg, ahol az MSD az átlagos négyzetes elmozdulást, σ^2 az egy-molekula helyzetének szórását, D a diffúziós állandót jelenti, melyet $0.033 \pm 0.004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -nak találtuk. A molekula mozgása egy kb. 500 nm átmérőjű területre határolódott be.



2. ábra. Jurkat E6-1 T sejtek felületén expresszált GFP-vel konjugált Kv1.3 csatornák átlagos négyzetes elmozdulása az idő függvényében. A Kv1.3 csatornák korlátozott diffúziót mutatnak egy kb. 500 nm átmérőjű területen $D = 0.033 \pm 0.004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ diffúziós állandóval ($t_{lag}=100$ ms).

A Jurkat E6-1 sejtek felszínén expresszáldó fehérjék közötti kölcsönhatásokat az ún. „micropatterning” technikával vizsgáltuk, amelyet Prof. Gerhard Schütz laboratóriumában fejlesztettek ki. A módszer lényege a következő. Egy adott sejtfelszíni fehérjére („A” fehérje) specifikus antitestből egy fedőlemezre nyomtatott μm -es skálájú kétdimenziós hálót alakítunk ki, majd a sejteket ezzel a mátrixal hozzuk kölcsönhatásba. A kihorgonyozott antitest az „A” fehérje eloszlását a kétdimenziós hálónak megfelelően alakítja ki. Amennyiben az „A” fehérje szoros fizikai csatolásban van egy másik („B”) membrán fehérjével, melynek GFP konjugált változatával transzfektáltuk a sejtet, akkor a „B” fehérje eloszlása, amit a fluoreszcencia alapján határozunk meg, meg fog egyezni az „A” fehérje eloszlásával, amit pedig a kétdimenziós háló határoz meg. A módszerrel két fehérje fizikai interakciójának kvantitatív leírása adható meg. Kísérleteinkben a mintázat képződését Kv1.3 csatornához konjugált GFP által adott fluoreszcenciás jel alapján vizsgáltuk. A Kv1.3 és CD3 ko-lokalizációjának vizsgálatára anti-CD3 ellenanyaggal kezelt felületet alakítottunk ki, és kimutattuk, hogy a Kv1.3 és CD3 molekula szoros fizikai csatolásban található a T sejtek membránjában, ami a Kv1.3 csatornák immunológiai szinapszisba történő átrendeződésének egyik hajtóereje lehet.



3A ábra

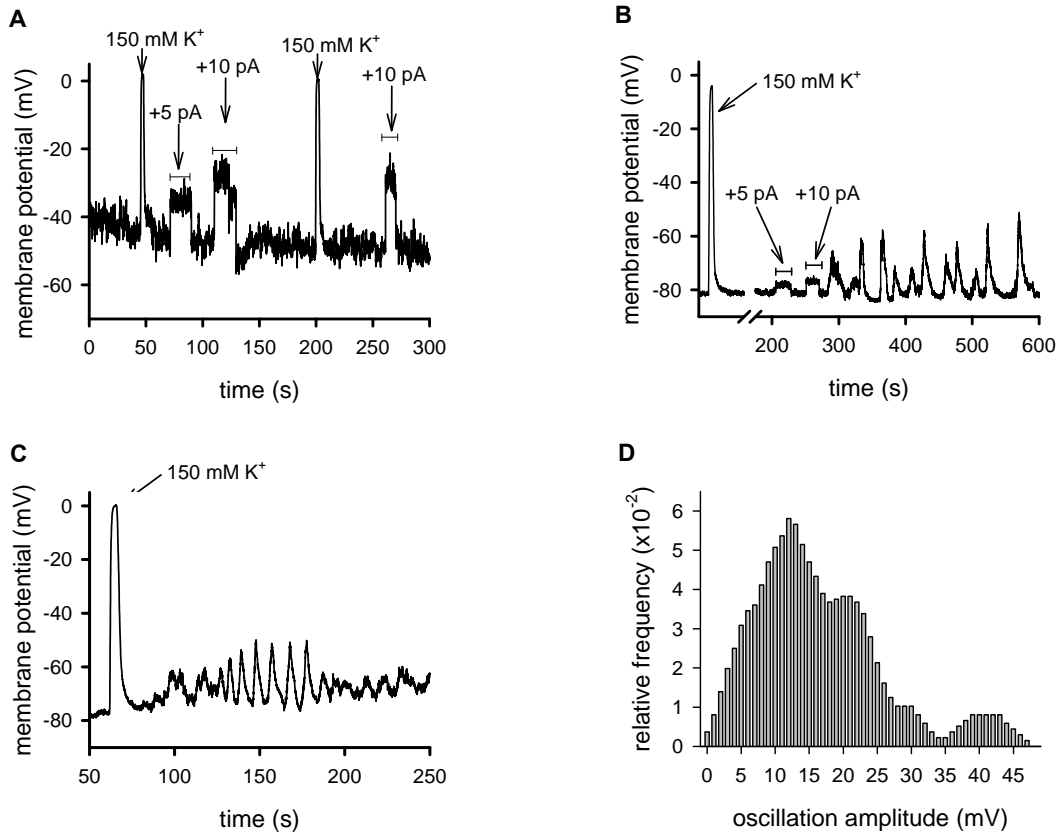
3B ábra

3. ábra Kv1.3-GFP-transzfektált Jurkat E6-1 sejt CD3 ellenes antitesttel kezelt felületen. **(A)** A mintázat kialakulása a Kv1.3 és CD3 közötti specifikus kölcsönhatást valószínűsíti. **(B)** A mikrostruktúrák 1 μm széles antitesttel kezelt sávjait 2 μm -es BSA sávok választják el.

2.4 *A Kv1.3 csatornák immunológiai szinapszis (IS)-beli lokalizációjának következménye a sejtek membránpotenciáljának szabályzására.*

Kísérleteink során felfedeztük, hogy a Kv1.3 csatornák immunszinapszis-beli lokalizációja egy minőségileg új membránpotenciál szabályozást tesz lehetővé az antigén prezentáló sejtekkel konjugált T sejtekben, az egyedülálló T sejtekhez képest. A feltételezés bizonyításához elektrofiziológiai úton, a sejtek belső környezetének állóságát fenntartó ún. perforált patch technikával mértük a membránpotenciált áram zár üzemmódban. Megállapítottuk, egyedülálló és immunszinapszisban konjugált T sejtek nyugalmi membránpotenciálja nem különbözik statisztikailag (~ -50 mV mindkét esetben). Ezzel szemben depolarizáló áram injektálását követően az egyedülálló T sejtekben egyszerű depolarizáció következik be, míg immunszinapszisban konjugált T sejtek esetén a membránpotenciál ritmikus oszcillációja figyelhető meg. Az oszcilláció frekvenciáját és amplitúdó eloszlását matematikai eszközökkel leírtuk, valamint jellemeztük az oszcillációk ionsatorna gátlószér érzékenységét. Megállapítottuk, hogy a Kv1.3 és IKCa1 csatornákat is gátló charybdotoxin depolarizálja a membránt és csökkenti az oszcilláció frekvenciáját és amplitúdóját, míg a csak IKCa1 csatornákat gátló a TRAM-34 az oszcillációk amplitúdóját csökkenti. A membránpotenciál oszcillációk tehát igen érzékenyen és különböző módon

befolyásolhatók az ioncsatorna gátlószerekkel, aminek komoly terápiás következményei is lehetnek az autoimmun betegségek kezelésében. Az eredményeinket összefoglaló kéziratot a a PNAS folyóirathoz nyújtottuk be közlésre (Panyi és mtsai, kézirat regisztrációs szám: MS# 2009-04943R, PNAS Track Two, under revision).



4. ábra A membránpotenciál válaszok egyedülálló és IS-t képző T sejtekben. (A) egyedülálló sejtben sem áraminjektálás, sem pedig K^+ depolarizáció nem hoz létre membránpotenciál oszcillációt. (B és C): IS-ben konjugált sejt esetén áraminjekció (B) ill. K^+ depolarizáció membránpotenciál oszcillációt vált ki. (D): a membránpotenciál oszcilláció amplitúdó eloszlása

2.5 Ioncsatorna expresszió összehasonlítása egészséges és szeklerózis multiplexben (SM) szenvedő betegek normál és regulátorikus T sejtjeiben.

Ismert az irodalomból, hogy az autoimmun betegségekben a szöveti károsodást okozó effektor memória T sejtek a naiv T sejtektől eltérő mértékben fejezik ki a Kv1.3 és IKCa1 csatornákat, melynek komoly terápiás következményei lehetnek. Az autoimmun betegségek kialakulásának egy másik fontos tényezője a regulátoros T sejtek (T_{reg} -ek) csökkent működése. Ezen felül kiderült, hogy SM-es betegek T sejtjeiben a Kv1.3 csatornák immunológiai szinapszisban történő felhalmozódása az egészséges T sejtekre jellemzőtől eltérő kinetikával megy végbe. Ezek alapján összehasonlítottuk egészséges valamint SM-ben szenvedő donorok perifériás véréből szeparált $CD4^+CD25^{(hi)}CD127^{(lo)}$ T_{reg} és $CD4^+CD25^{(lo)}CD127^{(hi)}$ naiv T sejtek ioncsatorna expresszióját. Kimutattuk, hogy egészséges donorok esetén a T_{reg} és a naiv T sejteken azonos számú Kv1.3 expresszálódik, ugyanakkor T_{reg} sejtek kapacitásmérések alapján talált nagyobb membránfelszínük miatt ezeken a sejteken a csatornák sűrűsége alacsonyabb, ami részleges aktivációs állapotukat jelezheti. SM betegekénél T_{reg} sejteken a csatorna alacsonyabb számban fejeződött ki, mint a naiv T sejteken. Ezzel szemben a sejtmembrán kapacitásában és a Kv1.3 csatornák sűrűségben nem találtunk

jelentős eltérést. A KCa3.1 csatornák expressziója hasonlóan adódott a vizsgált sejtípusokon. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a Kv1.3 expressziójában és sűrűségében feltárt különbségek hozzájárulhatnak a fenti sejtípusok antigén stimulációra adott eltérő válaszához egészséges, ill. beteg esetben (Varga és mtsai, Immunol. Lett., 2009.)

2.6 Dendritikus sejtek ioncsatornáinak vizsgálata

Annak ellenére, hogy a T sejtek ioncsatornáiról részletes ismeretekkel rendelkezünk, viszonylag keveset tudunk az immunológiai szinapszis másik oldalán elhelyezkedő sejtek, a dendritikus sejtek ioncsatornáiról és azon élettani szerepéről. Ennek megfelelően megvizsgáltuk, hogy az ioncsatornák expressziója hogyan változik a dendritikus sejtek érésével párhuzamosan. Elektrofiziológiai, farmakológiai és molekuláris biológiai vizsgálatkora alapozva megállapítottuk, hogy a dendritikus sejtek érése az ioncsatornák kifejeződésének jelentős változásával jár együtt. Az éretlen dendritikus sejtek membránjában dominánsan az idegsejtekre jellemző feszültség kapuzott Nav1.7 típusú Na⁺ csatorna található, míg az érett dendritikus sejtek feszültség kapuzott Kv1.3 típusú K⁺ csatornákat fejeznek ki. Az ioncsatornák kifejeződésének változása a dendritikus sejtek differenciálódásának és funkcióinak ioncsatorna gátlószerekkel történő szelektív befolyásolhatóságát jelentheti. (Zsiros és mtsai, J. Immunol, 2009.)

Összefoglalásként úgy ítéljük meg, hogy a kutatási programban vállalt feladatok teljesítése során jelentős felfedezéseket tettünk, melyekkel hozzájárultunk a Kv1.3 csatornák szerepének tisztázásához a T sejtek fiziológiai és patofiziológiai folyamataiban. A Kv1.3 csatornák nagy affinitású gátlószereinek izolálásával ill. rekombináns előállításával hozzájárulhatunk ahhoz, hogy az autimmun betegségek kezeléséhez megfelelő eszközök álljanak rendelkezésre, ami hosszú távon a kutatómunka társadalmi és gazdasági hasznosítását jelentheti.

Debrecen, 2010. március 23.

Dr. Panyi György
kutatásvezető