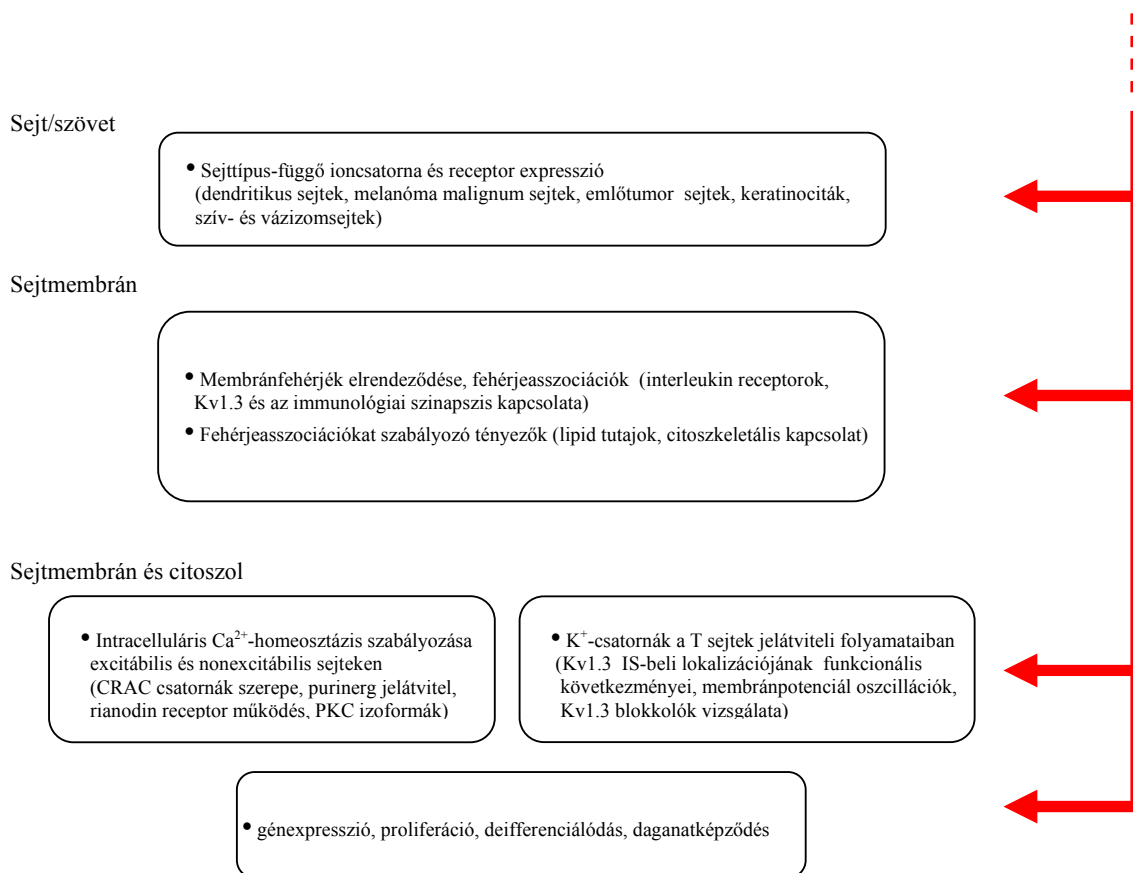


OTKA Nyilvántartási szám: NK 61412

Dr. Damjanovich Sándor

A transzmembrán jelátvitel integrált szabályozása: Ca^{2+} -, K^{+} -csatornák és interleukin-receptorok közötti interakciók

A transzmembrán jelátvitel (TMJ) az élő sejtekre jellemző általános mechanizmus, amellyel a sejt a környezeti behatásokra, ingerekre reagál. Egyes elkülöníthető fázisai különböző időskálán játszódnak le, és a sejtmembrántól a sejtmagig terjedően a sejt különböző részeire koncentrálódhatnak. Kutatómunkánk alapvető célja a transzmembrán jelátvitel molekuláris és sejtlejtani, valamint biofizikai jellegzetességeinek vizsgálata volt fiziológias és kóros körülmények között. Tanulmányoztuk az interleukin-receptorok, a Ca^{2+} - és a K^{+} -csatornák között fennálló kölcsönhatásokat, beleértve azok kapcsolatát az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázissal. A kísérletes munka során vizsgált problémák hierarchikus rendbe szervezett vázlata az alábbi ábrán látható:



Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vizsgálatát célzó kísérleteink között különös hangsúlyt fektettünk a Ca^{2+} -felszabadulás során aktivált Ca^{2+} -csatornák (CRAC-csatornák) működése által előidézett, az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak bevonásával szabályozott Ca^{2+} -belépés (SOCE) vizsgálatára.

Vizsgáltuk továbbá az intracelluláris Ca^{2+} felszabadulást befolyásoló tényezőket, mint pl. purinerg jelátvitellel való kapcsolat, PKC izoformák részvétele stb. Tanulmányoztuk az egyes rosszindulatú daganatok kialakulásában és növekedésében szerepet játszó, az ún. háttér K^+ konduktanciát biztosító TASK-3 K^+ -csatornák expressziós mintázatát melanóma malignum, valamint emlőtumor sejteken. Vizsgáltuk a közös γ_c citokinreceptor-családba tartozó IL-2, IL-15 és IL-9 receptorok jelentőségét a T-sejtek működésében, különös tekintettel sejt felszíni kölcsönhatásaikra és az azokat szabályozó tényezőkre. Külön hangsúlyt fektettünk a T sejtek membránpotenciálját döntő módon meghatározó Kv1.3 K^+ csatorna vizsgálatára, valamint a membránpotenciál változás immunválasz szabályozásában betöltött szerepének felderítésére.

Meggyőződésünk, hogy elért eredményeink hozzásegítenek a celluláris (T-sejt-közvetített) immunválasz mechanizmusának és szerveződésének pontosabb megértéséhez. Értékes információkat kaptunk továbbá az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásaira, valamint az azt előidéző folyamatok jelentőségére és módozataira vonatkozólag fiziologiás (dendritikus sejtek differenciálódása; vázizomrost-, melanocyta-funkció) és egyes pathologiás folyamatokban (pl. melanoma malignum sejtek növekedése, osztódása és nyúlványaik fejlődése) egyaránt.

Főbb eredményeink

A TASK-3-csatornákkal kapcsolatos kísérletek

A TASK-3-csatornát kódoló *kcnk9* gén amplifikációja, valamint a csatornafehérje overexpressziója jelentős szerepet játszhat egyes rosszindulatú daganatok kialakulásában és növekedésében. Tekintettel arra, hogy a melanoma malignum az egyik legagresszívabb rosszindulatú elváltozás, ugyanakkor előkísérletes adataink szerint a melanoma malignum sejtek TASK-3-expressziója számottevő lehet, a jelen kísérletsorozat első lépéseként a melanoma malignum sejtek TASK-3-expressziójának részletes vizsgálatát végeztük el. A kísérletek során mind sejtenyészeti körülmények között fenntartott melanoma malignum sejtek tanulmányozására, mind szöveti preparátumban található melanoma malignumot is tartalmazó metszetek vizsgálatára sor került. A munka során tekintettel voltunk arra is, hogy primer és metasztatikus melanoma malignum sejtek vizsgálatát egyaránt elvégezzük. A munka további, ám igen jelentős eredménnyel kecsegtető része volt, hogy kollaborációs partnerünkkel karöltve (Sigma-Aldrich Izrael) egy olyan humán TASK-3-specifikus monoklonális antitestet állítottunk elő, ami immár hozzáférhető a kereskedelmi forgalomban, és amit igen kiterjedt és alapos tesztelésnek vetettünk alá. A vizsgálatsorozat célja az antitest specificitásának ellenőrzése, valamint az optimális reakciókörülmények kimunkálása volt. Az új fejlesztésű antitest alkalmazása mellett két további (poliklonális) ellenanyag alkalmazására is sor került. Tekintettel arra, hogy a három antitest a csatornafehérje eltérő epitópjait ismertette fel, egymással párhuzamos alkalmazásuk és a jelölődési mintázat azonossága kétségtelenné tette a TASK-3-fehérje jelenlétének és kifejeződési mintázatának immuncitokémiai és immunhisztokémiai módszerekkel történő leírását. A munka során megállapítottuk, hogy mind a primer, mind a metasztatikus melanoma malignum sejtek igen erőteljes TASK-3-specifikus immunjelölődést mutatnak – sejtenyészeten és szöveti preparátumban egyaránt. A jelölődés igen jellegzetes mintázatot mutatott: jelentős intracelluláris jelölődést figyelhettünk meg, ugyanakkor a sejt felszíni membrán TASK-3-expressziója kifejezetten gyengének bizonyult. Intracellulárisan feltűnő volt a TASK-3-specifikus jelölődés sejtmagokhoz, valamint a sejtmagok környezetéhez való kötődése. Igen erőteljesnek bizonyult még a növekvő nyúlványok TASK-3-specifikus immunjelölődése. A vizsgálatok során azt is megállapítottuk, hogy nem pusztán a rosszindulatúan elfajult melanoma malignum sejtek mutattak erős és jellegzetes eloszlású TASK-3-expressziót, hanem a

benignus melanocyták is, így a TASK-3-expresszió vizsgálata nem alkalmazható a malignus transzformáció megerősítésének céljából.

Mivel a leírt TASK-3-specifikus jelölődési mintázat jelentősen eltért attól, amit egy K^+ -permeábilis ioncsatorna esetén vártunk volna (különös tekintettel a sejtfelszíni membránban való szegényes kifejeződésre), nagy figyelmet fordítottunk az immunreakciók specificitásának ellenőrzésére. Ennek részeként Western-blot vizsgálat történt; mind teljes sejtlizátum, mind a döntően sejtmagokat tartalmazó frakció alkalmazásával. Ezen túlmenően a specificitás tényét transzfekciós kísérletekkel is igazoltuk, aminek keretében a tranziens transzfekció mellett előállítottunk egy TASK-3-pEGFP konstruktot, aminek ugyancsak megvizsgáltuk a melanoma malignum sejteken belüli eloszlását. Valamennyi elvégzett vizsgálat eredménye arról tanúskodott, hogy a leírt és megfigyelt eloszlási mintázat valós, és azt jelezte, hogy fontos lenne a TASK-3-expresszió intracelluláris eloszlásának részletesebb és beható tanulmányozása annak kiderítése céljából, hogy mely sejtalkotó(k) tartalmazhatják a TASK-3-fehérjét a legnagyobb mennyiségben.

A TASK-3-csatornák intracelluláris lokalizációját célzó kísérleteket ugyancsak melanoma malignum sejteken végeztük, de azokat kiterjesztettük egy olyan sejtféleségre is, ami malignus transzformációt nem mutat (HaCaT sejtek). A vizsgálatok első lépésében arról győződünk meg, hogy a TASK-3-csatorna mRNS-szinten is jelen van a melanoma malignum sejtekben, továbbá megállapítottuk, hogy az izolált mRNS szekvenciája megegyezik a génbankban leírt szekvenciával, azaz a melanoma malignum sejtek TASK-3-specifikus mRNS-e mutációt nem hordoz. A melanoma malignum, valamint a HaCaT sejtek TASK-3-és mitokondrium-specifikus jelölésének összehasonlítása után megállapítottuk, hogy az a sejtalkotó, amelyik a legnagyobb mennyiségben expresszálja a TASK-3-csatornát a mitokondrium. A TASK-3-csatornák ezen „stratégiai” lokalizációja felveti annak eshetőségét, hogy ezen csatorna jelentős lehet a sejtek (ezek között a malignus sejtek) energiatermelő folyamataiban, és ezért lehet kulcsfontosságú a gyorsan proliferálódó sejtek esetében a TASK-3-expresszió és annak esetleges fokozódása. Emberi bőrből származó szövetminták vizsgálata alapján azt is megállapítottuk, hogy az emberi bőr számos sejtje, közöttük a keratinocyták is, jelentős és jellegzetes TASK-3-expressziót mutatnak. Ezen metszetekben az immunjelölődés kifejezetten granulált megjelenést mutatott, ami arra utalhat, hogy a TASK-3-csatornák mitokondriális lokalizációja *in situ* is megfigyelhető lehet.

A fenti kísérletek egyértelműen rámutattak a TASK-3-csatornák mitokondriális expressziójára, és felvetették annak eshetőségét, hogy a TASK-3-csatornák overexpressziója esetleg az őket kifejező sejtek energiatermelő folyamatainak javulását, és ezáltal azok hypoxia iránti toleranciáját fokozza. Ezekből kiindulva, a munka következő fázisában két kérdésre kerestünk választ. Egyrészt igazolni kívántuk, hogy az immunhisztokémiai módszerrel igazoltan kifejeződő TASK-3-csatornák funkcionálisak, másrészt meg kívántuk vizsgálni, hogy a TASK-3-fehérje szintézisének gátlása hogyan befolyásolja az azt kifejező sejtek túlélését. Az első kérdés megválaszolása céljából mitokondriális membránból készített membránpreparátumot alkalmaztunk, amit mesterséges lipidkettősrétegbe vittünk, és az így beágyazódó csatornák között kerestünk olyat, aminek az aktivitása megfelelhett a TASK-3-csatornákénak. Ezen vizsgálatok során rendszeresen tapasztaltuk egy erősen pH-érzékeny, K^+ -permeábilis csatorna aktivitását. A pH-függésen kívül jelentős volt még a kérdéses csatorna ruténiumvörös (RR) iránti érzékenysége is. Megállapítottuk, hogy az általunk talált ioncsatorna átlagos konduktanciája mintegy 112 pS volt. A fenti adatok, továbbá az a tény, hogy ezen csatorna aktivitása 4-aminopiridin és glibenklamid jelenlétében is megfigyelhető volt, arra utalt, hogy a vizsgált és leírt áram megfelelhett a mitokondriálisan expresszálódó, és funkcionális TASK-3-csatorna aktivitásából fakadó ionáramnak.

A mitokondriális TASK-3-csatornák funkcionális vizsgálatának igen fontos részét képezték azon kísérletek, amik során gátoltuk a TASK-3-fehérje transzlációját, ezáltal

csökkentettük annak mennyiségét a sejteken belül. Ennek az eljárásnak azért volt különös jelentősége az esetünkben, mert a TASK-3-csatornáknak jelenleg nem ismert szelektív gátlószere. A megfelelő shRNS szekvenciákkal történő tranziens transzfekció egyértelműen megmutatta, hogy a kezelt sejtek (mind a melanoma, mind a HaCaT sejtek) száma csökkent, morfológiájuk jellegzetes változásokat mutatott (nyúlványaikat elveszítették, lekerekedtek, méretük csökkent). Ezen kísérletek eredményei egyértelműen arra utaltak, hogy a TASK-3-csatornák expressziója és funkciója elengedhetetlen a megfelelő sejtproliferáció és növekedés fenntartásához.

A tranziens transzfekcióval végzett kísérletek ugyanakkor arra is rámutattak, hogy azon sejtek, amelyekben a transzfekció sikeres volt lassabban osztódtak és életképességük jelentősen csökkent, így a nem transzfektálódott sejtek hamar túlnőtték őket, így ez a megközelítés alkalmatlan volt arra, hogy funkcionális méréseket végezzünk. A kísérletek jelenlegi fázisában ezért más megközelítést alkalmazunk, és stabil, valamint indukálható transzfekciót kívánunk végezni, a pontos funkcionális jellemzők leírása céljából. A megfelelő sejtvonalak immár rendelkezésre állnak, és a célzott funkcionális kísérletek végzése folyamatban van.

A TASK-3-csatornákkal kapcsolatos további kísérletek keretében létrehoztunk egy olyan szövetbankot, ahol a Tissue MicroArray technikával tanulmányoztunk mintegy 300, különböző típusú, szöveti grádusú és méretű emlőrákból készített metszetsorozatot, annak céljából, hogy összefüggést találjunk a TASK-3-expresszió erőssége és mintázata, valamint a tumor szövettani/biológiai jellegzetességei között. A metszetek elektronikus feldolgozása már megtörtént, jelenleg a kiértékelés fázisában járunk.

A TASK-3-csatornák vizsgálatával kapcsolatos munka az eredetileg tervezettnél nehezebbek és jelentősen volumínózusabb voltak, ezért a projekt másik részével kapcsolatos, azaz a melanoma malignum sejtek Ca^{2+} -homeosztázisát feltérképező, kísérletek némileg háttérbe szorultak, és ezek keretében döntően a melanoma sejtek által expresszált muszkarinos acetilkolinerg receptorok jelenlétét, funkcionális sajátosságait és megoszlását tanulmányoztuk. A kísérletek során megállapítottuk, hogy extracelluláris ATP hatására a melanoma malignum sejtek jelentős részében megnő az $[Ca^{2+}]_{ic}$. A muszkarinos receptorok stimulálása végett alkalmazott karbakol a sejtek lényegesen kisebb hányadában váltott ki hatást (mintegy 30%-ban), ugyanakkor a kialakuló Ca^{2+} -tranziens kinetikája is jelentősen különbözött. Megállapítottuk, hogy extracelluláris Ca^{2+} hiányában a melanoma malignum sejtek által produkált és karbakol hatására kialakuló tranziens nagysága jelentősen csökkent, valamint a lefutása is jelentősen megváltozott, ami arra hívja fel a figyelmet, hogy a sejten belüli Ca^{2+} -raktárak csak korlátozott mennyiségű Ca^{2+} -ot tartalmaznak. A Q-PCR, Western-blot, valamint a megfelelő altípus-specifikus gátlószerek jelenlétében végzett kísérletek alapján elmondható, hogy a melanoma malignum sejtekben a muszkarinos stimuláció hatására kialakuló tranziensek létrehozásában az M1- és az M3-receptoroknak van kiemelkedően fontos szerepe.

A Ca^{2+} -homeosztázis és purinerg szignáltranszdukció szerepe egyes ingerlékeny és nem ingerlékeny sejtek esetén

A vizsgálatokat tenyésztett egér vázizomsejteken, primer kultúrákban végeztük. Az ATP a korai myoblast stádiumban $[Ca^{2+}]_i$ növekedést váltott ki, de a differenciálódás késői stádiumában hatástalan volt. Feszültség-clamp körülmények között az ATP egy nem-inaktiválódó, befelé irányuló áramot hozott létre. A külső térből történő Ca^{2+} elvonás megszüntette az ATP $[Ca^{2+}]_i$ növelő hatását. Kimutattuk, hogy az ATP a P2X és P2Y purinoreceptorokon keresztül növeli a $[Ca^{2+}]_i$ -t. Korábbi modellünket felhasználva rámutattunk, hogy az ATP által kiváltott Ca^{2+} -fluxus korai, gyorsan kialakuló majd megszűnő fázisáért a P2X receptorok aktiválódását kísérő depolarizáció a felelős. A késői komponens

80%-a a P2Y receptorok, és így a foszfatidil-inozitol (PI) útvonal aktiválódásához köthető. A PI útvonal aktiválódása több sejttípus esetén megváltoztatja a proliferációt/differenciálódást, ezért elemeztük az ATP hatását ezen folyamatokra. Megállapítottuk, hogy az ATP jelenléte a tenyésztőoldatban jelentősen csökkenti a proliferációt, a több-magvú myotubulusok kialakulása (differenciálódás) viszont felgyorsul.

A tenyésztőoldat szérumszétételének változtatásával indukált differenciálódás során a C2C12 eger myoblastok fokozott purinerg válaszkészségét találtuk. A Ca^{2+} -felszabadulás korai komponense csak a legfejlettebb sejteken jelent meg. Ha a differenciálódást a PKC α izoenzim overexpressziójával indukáltuk, a korai fázis ezen sejteknél is hiányzott. Elmaradt a P2X7 expresszió máskor tapasztalt fokozódása is, a sejtek válaszkészsége hasonlított az anti-P2X7 siRNS alkalmazásával nyert, a korai komponens csökkenését mutató eredményekhez, aláhúzva a P2X7 fontosságát a gyors fázis kialakításában. Ez utóbbi kialakításáért az aktiválódó metabotrop P2Y receptorok (C2C12 sejteknél a differenciálódást okozó tényezőtől függően P2Y2 vagy P2Y4) által a sarcoplasmaticus reticulumból (SR) fáziskéséssel felszabadított Ca^{2+} felelős.

A jelen kísérletsorozatban komoly erőfeszítéseket tettünk a Trisk 95 lehetséges funkciójának leírására is. A 95 kDa molekulatömegű triadin (Trisk 95) egy olyan, a harántcsíkolt izom SR membránjában található integráns fehérje, ami mind a rianodinreceptorral (RyR), mind a kalszekvesztrinnel kölcsönhatásban áll. Bár a Trisk 95 Ca^{2+} -homeosztázisban betöltött szerepét kiterjedten tanulmányozták, nem volt arra vonatkozó adat, hogy vajon a fehérje overexpressziója, vagy expressziójának csökkentése módosítja-e az elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket (Ca^{2+} -sparkok). Az általunk végzett munka keretében C2C12-sejteken, valamint primer, harántcsíkolt izomból nyert sejttenyészetben, konfokális mikroszkópia alkalmazásával vizsgáltuk ezen elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket. A Trisk 95 fehérje kifejeződését liposzóma vagy adenovírus által közvetített overexpresszió, valamint shRNS interferencia alkalmazásával módosítottuk. A C2C12-sejtek Trisk 95 fehérjével történő stabil overexpressziója szignifikánsan csökkentette a Ca^{2+} -„sparkok” amplitúdóját és frekvenciáját, valamint az ún. „ember”-ek frekvenciáját. Ezen megfigyelésekkel összhangban a depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek ugyancsak csökkenést mutattak. A fentiekhez hasonlóan a Trisk 95 fehérje eger harántcsíkolt izmokba, adenovírussal történő transzfekciója ugyancsak csökkentette a spontán Ca^{2+} -felszabadulási események frekvenciáját és amplitúdóját. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az endogén triadinexpresszió RNS-interferenciával történő gátlása ellentétes hatásokat eredményezett. Patkányból izolált harántcsíkolt izom eredetű, primer sejt kultúrákban az endogén módon expresszálódó Trisk 95 jelenlétében rendre megfigyelhetők voltak spontán Ca^{2+} -tranziensek, ám Ca^{2+} -sparkok csak ritkán voltak detektálhatóak. A vizsgálatok rámutattak, hogy a megfelelő szekvenciájú shRNS-sel transzfektálva jelentősen csökkent ezen sejtek triadin-specifikus immunjelölődése, ami azt jelezte, hogy az shRNS-sel történő transzfekció hatékony volt, és az valóban csökkentette a Trisk 95 fehérje szintézisét. A funkcionális vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a triadin expresszió csökkenése után csökkent a koffeinnel kiváltott Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója, ugyanakkor az elemi Ca^{2+} -események kialakulási frekvenciája fokozódott. Eredményeink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a Trisk 95 fehérje negatívan szabályozza a RyR funkcióját; ezáltal gátolja mind a lokális Ca^{2+} -felszabadulási események, mind a globális Ca^{2+} -jelek kialakulását.

A harántcsíkolt izom Ca^{2+} -homeosztázisának megértését célzó vizsgálatok értékes részét képezték a K-201 jelű molekula alkalmazásával kapott eredmények. A K-201 nevű benzodiazepinszármazékot, antiarrhythmias hatásánál fogva, lehetséges terápiás szerként tartják számon. Annak érdekében, hogy megérthessük, hogy a K-201 hogyan befolyásolja az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulást, számos különböző technika alkalmazásával vizsgáltuk a molekulának az SR Ca^{2+} -csatornára és Ca^{2+} -pumpára kifejtett hatását. Az alkalmazott

technikák között szerepet kapott az egyedi csatornák elektrofiziológiai vizsgálata, teljes-sejtes konfokális mikroszkópia, valamint az ATP-áz aktivitás mérése. Utóbbi vizsgálatra kontroll, valamint myocardialis infarctuson átesett (PMI) patkányok harántcsíkolat izmain egyaránt sor került, az esetleges különbségek feltérképezése és leírása végett. A mesterséges lipid-kettősrétegbe ágyazott egyedi csatornák elektrofiziológiai vizsgálata rámutatott, hogy az SR Ca^{2+} -csatornának a nyitott állapot mellett két szubkonduktanciájú állapota is van, amik a teljesen nyitott állapot 24%- (S1) és 13%-ának (S2) felelnek meg. Az egyes szubkonduktanciák megjelenési gyakorisága, valamint az azokban eltöltött átlagos idő bifázisosan függött a szer alkalmazási koncentrációjától; a maximális hatást 50 $\mu\text{mol/l}$ K-201 jelenlétében lehetett megfigyelni. Ezen koncentráció esetén az SR Ca^{2+} -csatorna a teljes nyitvatartási idő 26 \pm 4 és 24 \pm 4%-át töltötte az S1 és S2 szubkonduktancia állapotában; feltéve, hogy pozitív potenciálok alkalmazására került sor. Ellentétes polaritás, azaz negatív potenciálok esetén nem lehetett a szubkonduktanciáknak megfelelő állapotokat megfigyelni. A K-201 jelenlétében az elemi Ca^{2+} -események frekvenciája is megváltozott: a kialakuló "spark"-ok frekvenciája csökkent, míg az "ember"-frekvencia növekedett. Ezen túlmenően a szer jelenlétében a kialakuló "ember"-ek amplitúdója szembeötlő változatosságot mutatott. K-201 jelenlétében csökkent az SR Ca^{2+} -pumpa aktivitása is. Eredményeink rámutattak arra, hogy bár a K-201 önmagában növeli az SR Ca^{2+} -csatorna szubkonduktív állapotainak megjelenését, összességében csökkenti a Ca^{2+} -felszabadulást. Azt is megállapíthattuk, hogy nincs különbség a K-201 harántcsíkolat izmokra és azok Ca^{2+} -homeosztázisára kifejtett hatásában kontroll és myocardialis infarctuson átesett patkányok esetén.

Ugyancsak segítettek a RyR funkciójának pontosabb leírásában a maurokalcinnal végzett vizsgálatok. A 33 aminosavat tartalmazó, maurokalcin (MCA) nevű skorpiótoxinról már bizonyítást nyert, hogy módosítani képes a harántcsíkolat izomra jellemző rianodinreceptor altípus (RyR1) kapuzási tulajdonságait. Az általunk végzett kísérletsorozat keretében a MCA és mutánsai ($[\text{Ala}^8]\text{MCA}$, $[\text{Ala}^{19}]\text{MCA}$, $[\text{Ala}^{20}]\text{MCA}$, $[\text{Ala}^{22}]\text{MCA}$, $[\text{Ala}^{23}]\text{MCA}$, and $[\text{Ala}^{24}]\text{MCA}$) mesterséges lipid-kettősrétegbe ágyazott RyR1-re, valamint patkányból és békából izolált harántcsíkolat izmon kialakuló elemi Ca^{2+} -eseményekre kifejtett hatásait vizsgáltuk. Eredményeink szerint a vizsgált peptidek hosszú szubkonduktancia állapotok kialakulását indukálták a RyR1 csatornán. Ezen állapotok több másodpercen keresztül megfigyelhetők voltak. Mindazonáltal ezen szubkonduktív állapotok átlagos hossza és frekvenciája csökkent, ha a mutáció a toxin térbeli szerkezetét tekintve távolabb került a ^{24}Arg aminosavtól. A kialakult hatás erősen függött a csatornán folyó áram irányától. Ha az áramirány megfelelt annak, amit a Ca^{2+} -felszabadulás során a Ca-ionok hoztak létre, akkor az alkalmazott toxinvariánsok 8-10-szer kevésbé voltak hatásosak. Izomból preparált rostok esetében a toxinok alkalmazását követően hosszú időn át fennálló Ca^{2+} -események voltak megfigyelhetők, melyek átlagos tartama összefüggést mutatott a szubkonduktanciaállapotokban töltött idő hosszával. Vizsgálataink eredményei azt sugallják, hogy a toxin hatása a csatorna felszínén található, nagy, töltéssel bíró résszel (felszínnel) való kölcsönhatásból fakad, amit a Lys^{20} , Lys^{22} , Arg^{23} , Arg^{24} és Lys^8 aminosavak alkotnak. Azt is megállapíthattuk, hogy a mesterséges lipid-kettősrétegben és *in situ* körülmények között a maurokalcin RyR1-csatornára kifejtett hatásaira vonatkozó adatok egymásnak megfelelnek.

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció és annak változásai jelentőségét nem-ingerlékeny sejtekben is módunk volt vizsgálni. Ismeretes volt, hogy mind az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásai, mind bizonyos protein kináz C (PKC) izoformák aktiválódása meghatározó jelentőségűek a keratinocyták funkciójának szabályozásában. Annak érdekében, hogy ezen két szignalizációs útvonal közötti kölcsönhatást pontosabban megismerhessük, HaCaT-sejtek alkalmazásával végeztünk kísérleteket, amik keretében a nyugalmi, valamint az extracelluláris ATP alkalmazásával kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásait követtük nyomon olyan sejteken, amik overexpresszálták a PKC klasszikus α - vagy a β -

izoformáját. A két izoforma alkalmazását és vizsgálatát az tette különösen izgalmassá, hogy korábban már rámutattunk arra, hogy a PKC α gátolja, míg a PKC β serkenti a sejtproliferációt, ugyanakkor előbbi fokozza, utóbbi pedig csökkenti a differenciációt. Csökkent proliferációs rátát mutató keratinocita klónokban nem tapasztaltunk változást a nyugalmi Ca²⁺-koncentráció nagyságában, de nagyobb Ca²⁺-tranzienseket produkáltak 180 μ mol/l ATP hatására. Ezzel ellentétben a fokozott proliferációs rátával jellemezhető klónok emelkedett nyugalmi Ca²⁺-koncentrációval voltak jellemezhetőek, de kisebb Ca²⁺-tranzienssel reagáltak az ATP alkalmazására. A fentiekben túlmenően azt is megállapítottuk, hogy a PKC β -át expresszáló HaCaT klónok által produkált Ca²⁺-tranziensek leszálló szára felgyorsult. Minden vizsgált klónt egy jellegzetes purinoreceptor expressziós mintázat jellemzett, melyek közül néhány összhangban állt a proliferációs ráta és a Ca²⁺-homeosztázis változásaival. A PKC β -át overexpresszáló keratinocita klónok csökkent P2X1-, ugyanakkor fokozott P2Y1-expressziót mutattak, mind a kontroll, mind a PKC α klónhoz képest. A PKC α klónban a P2X7-receptorok expressziója bizonyult szignifikánsan nagyobbak; ugyanakkor a P2X2- és a P2Y2-receptorok expressziója nem mutatott érdemi változást egyik vizsgált sejtvonalon sem. Az általunk végzett kísérletek eredményei egyértelműen rámutattak, hogy a keratinocyták módosult proliferációs és differenciációs mintázata összefüggést mutat azok megváltozott Ca²⁺-homeosztázisával. Vizsgálataink alapján az is megfogalmazható, hogy a különböző PKC izoenzimek eltérő hatást gyakorolnak a foszfatidil-inozitol jelátviteli útvonalra.

Tekintettel a purinoreceptorokkal kapcsolatos eredményeinkre, felkérést kaptunk egy olyan összefoglaló dolgozat megírására, amiben a purinoreceptorok és a malignus transzformáció közötti (lehetséges) összefüggéseket taglaljuk. Ismert, hogy a purinerg jelátviteli útvonalak igen komplex szabályozási rendszert alkotnak, amik gyakorlatilag minden sejtben alapvető jelentőségűek, függetlenül attól, hogy rövid vagy hosszú távú szabályozási mechanizmusokról van szó. A purinerg szignáltranszdukcióval kapcsolatos legújabb eredmények között az egyik legfigyelemreméltóbb felismerés, miszerint az ATP és más purinnukleotidok jelentős szerepet töltenek be egyes alapvető sejfolyamatok szabályozásában; egyebek között serkentik a sejtek proliferáció, differenciáció vagy apoptózis irányú elköteleződését. A fentiek alapján nyilvánvalónak tűnik, hogy a fenti nukleotidok jelentősek lehetnek a malignus transzformáció kialakulásában vagy annak megelőzésében. Az általunk írt összefoglaló cikkben először a purinerg szignalizációs mechanizmusokkal kapcsolatos legfontosabb történeti aspektusokat vettük számba, majd a P2-receptorok struktúráját és a hozzájuk kapcsolt jelátviteli útvonalakat tekintettük át. Figyelmet fordítottunk annak részletezésére, hogy hogyan befolyásolhatja a tumorsejtek funkcióját az extracelluláris ATP, és ennek kapcsán szót ejtettünk egyes rákellenes terápiák hatékonyságáról. Az utóbbi téma kapcsán kitértünk az extracelluláris nukleotidok farmakológiai, nutritív, vasoactív és "antioxidáns" hatásaira. A dolgozatban elemeztük az ATP hatásait olyan állapotokban, amiket humán eredetű tumorsejtekkel inokuláltak, majd sorba vettük a P2-purinoreceptorok tumorsejtekben tapasztalt expresszióját és lehetséges funkcióját taglaló dolgozatokat. A munka végén a P2-receptoroknak mint diagnosztikus eszközöknek a jelentőségét taglaltuk (tumormarkerek), továbbá kitértünk az ATP-analógok terápiás alkalmazásával kapcsolatos nehézségekre.

Ioncsatornák szerepe dendritikus sejtek differenciációjában

A kutatómunka során jelentős előrehaladást értünk el a dendritikus sejtek érése és ioncsatorna expressziója közötti kapcsolat jellemzésében. A kutatási programban vázoltaknak megfelelően a dendritikus sejtek *in vitro* differenciálódása és érése szempontjából két jól elkülöníthető állapotú sejtípus, az éretlen és érett dendritikus sejtek elektrofiziológiai jellemzését végeztük el a patch-clamp technika teljes-sejt konfigurációjának felhasználásával.

A -120 mV és $+50$ mV között húzott feszültség lejtők hatására egy gyorsan aktiválódó és inaktiválódó, a sejtekbe befolyó áramot regisztráltunk. A töltéshordozó azonosítása céljából ionhelyettesítéssel végeztünk kísérleteket, melyek egyértelműen igazolták azt, hogy Na^+ -számára átjárható feszültség-kapuzott csatornák aktiválódnak az éretlen dendritikus sejtekben. A feszültség kapuzott Na^+ csatornák további vizsgálatához, és a teljes-sejt áramért felelős csatorna molekuláris szintű azonosításához jellemeztük az áram biofizikai és farmakológiai tulajdonságait. A biofizikai tulajdonságok jellemzésén belül meghatároztuk a teljes-sejt áram egyensúlyi aktivációjának és egyensúlyi inaktivációjának feszültségfüggését. Az áram kinetikai paraméterei közül az inaktivációs kinetikát, az inaktivációs kinetika membránpotenciál függését és az inaktivációból történő visszatérést jellemző időállandót határoztuk meg. A farmakológiai jellemzők közül Na^+ csatornák esetén a legfontosabb az áram tetrodotoxin (TTX) érzékenysége. Megállapítottuk, hogy a TTX reverzibilisen gátolta az áramot, a dózis-hatás görbe alapján az egyensúlyi disszociációs állandóra 55 nM érték adódott. A biofizikai és farmakológiai adatok alapján a csatorna pontos karakterizálása nem volt egyértelmű, ezért a csatorna molekuláris biológia módszerekkel (RT-PCR) történő azonosítását is elvégeztük. A mintákból a NaV1.7 csatornára specifikus primerekkel tudtunk kideríteni mRNS-t. Az NaV1.7 irodalomból ismert tulajdonságai megfelelnek az éretlen dendritikus sejteken meghatározott áram elektrofiziológiai jellemzőinek, így nagy biztonsággal állíthatjuk, hogy NaV1.7 csatornák fejeződnek ki e sejteken. További kvantitatív PCR vizsgálatokkal azt mutattuk ki, hogy az NaV1.7 csatornák expressziója a sejtek izolálását követő $3.$ órában kezd növekedni, a $96.$ órában éri el a maximumát, majd a $120.$ órára az mRNS expresszó jelentősen csökken. A dendritikus sejtek érésének indukcióját követő $24.$ órára az NaV1.7 expresszió kimutathatatlaná válik molekuláris biológiai módszerrel. Ezzel a megfigyeléssel jó összhangban vannak az elektrofiziológiai kísérletek is, az érett dendritikus sejtek membránjában a Na^+ csatornák sejt felszíni expressziója sem mutatható ki ionáramok mérésével. A Na^+ csatornák down-regulációjával párhuzamosan egy feszültség-kapuzott K^+ áram jelenik meg az érett sejteken. A K^+ áram kialakításáért felelős csatornák biofizikai, farmakológia és molekuláris biológia azonosítása megtörtént. A félaktivációs feszültség, inaktivációs időállandó, valamint a margatoxin, charybdotoxin és tetraetilammónium által kifejtett koncentráció-függő gátlás alapján egyértelműen Kv1.3 csatornákat azonosítottunk, amit az RT PCR technika is megerősített. Az RT PCR kísérletek az elektrofiziológiával párhuzamosan azt mutatták, hogy a Kv1.3 expresszió a dendritikus sejtek érésével párhuzamosan indul be, és az érett sejteken folyamatosan jelen van. A Kv1.3 csatornák mRNS-én kívül Kv1.5 mRNS található még érett DS-ekben, azonban elektrofiziológiai technikákkal nem mutatható ki Kv1.3/Kv1.5 heterotetramer csatorna. Speciális pipetta oldat használatkor az is kiderült, hogy IKCa1 típusú Ca^{2+} -aktivált K^+ csatorna is megtalálható a dendritikus sejtek membránjában, a csatorna biofizikai és farmakológiai azonosítása megtörtént.

A fentebb említett csatornák élettani szerepével kapcsolatosan megállapítottuk, hogy az NaV1.7 csatornák expressziója nem azonos a különböző DS alcsoportok között: a CD1a^+ éretlen dendritikus sejtek jelentős Nav1.7 expressziót mutatnak a CD1a^- éretlen DS-ekhez képest. Ennek funkcionális jelentősége az, hogy az NaV1.7 -et jelentősen expresszáló CD1a^+ sejtek nyugalmi membránpotenciálja jelentősen (~ 50 mV-al) pozitívabb mint a CD1a^- sejteké. A CD1a^- sejtekhez hasonló negatív (~ -60 mV) membránpotenciál Na^+ -mentes oldattal történő perfúzió mérhető, ami egyértelműen azt mutatja, hogy a Na^+ csatornák funkcionális aktivitása hozzájárul a membránpotenciál kialakításához. Az NaV1.7 csatornák TTX-általi gátlása a CD1a^+ éretlen DS-ek migrációs képességének gátlását okozta, míg az NaV1.7 -et jelentéktelen mértékben kifejező CD1a^- éretlen DS-ek migrációjára a TTX hatástalan volt (Zsiros és mtsai, 2009, Kis-Tóth és mtsai, 2009, közlésre benyújtva).

A DS-ek két morfológiailag és funkcionálisan is különböző differenciálódási alakjai közt további, a Ca^{2+} jelátvitelt közvetlenül befolyásoló csatornák vizsgálatát végeztük el. A citoszolikus szabad Ca^{2+} koncentrációt FURA-2 festék segítségével mértük. A különböző gerjesztési hullámhosszakon mért fluoreszcencia hányadosból az abszolút Ca^{2+} koncentrációt határoztuk meg PTI Delta Scan mikroszkópos fluoriméter alkalmazásával. A sejtek FURA-2 töltésének optimalizálását követően meghatároztuk a citoszol nyugalmi Ca^{2+} koncentrációját, ami a sejtek differenciálódási fokától függetlenül 100-120 nM-nak adódott. Annak eldöntése, hogy a DS-ekben található-e (az immunrendszer sejtjeiben egyébként szinte mindenhol előforduló) Ca^{2+} -release aktivált Ca^{2+} csatorna (CRAC), a sejtek citoszolikus Ca^{2+} raktárainak kiürítését követő Ca^{2+} tranziensek vizsgálatával történt. A SERCA ATPáz inhibitor thapsigargin (1 μM) hatására Ca^{2+} -mentes extracelluláris oldatban egy Ca^{2+} tranziens alakul ki, mely a raktárak kiürítésének felel meg és független az extracelluláris Ca^{2+} koncentrációtól. Ezt követően az extracelluláris oldat Ca^{2+} koncentrációját növelve (2 mM, mikroperfúzióval) mind az éretlen, mind pedig az érett DS-eken robosztus Ca^{2+} jel keletkezett, ami a CRAC csatornák jelenlétére utalt. Ezt erősítették meg farmakológiai kísérleteink is, a CRAC gátló SKF-96365 (50 μM) és 2-APB (40 μM) egyaránt gátolta a thapsigargin által kiváltott extracelluláris Ca^{2+} -függő Ca^{2+} jelet. A Ca^{2+} indikátor festékekkel kapott eredményeket elektrofiziológiai kísérletekkel erősítettük meg. Teljes sejt konfigurációban mérve néhányszor 10 pA nagyságú CRAC áramokat mértünk mindkét sejtcsoportban a DS differenciálódástól függetlenül. Egyéb, feszültség kapuzott Ca^{2+} csatornákat sem fluoreszcenciával, sem pedig elektrofiziológiai módszerekkel nem tudtunk kimutatni. Megállapítható tehát, hogy dendritikus sejtekben az elsődleges Ca^{2+} jelátviteli utat a CRAC csatornák biztosítják függetlenül a sejtek differenciáltsági fokától.

Interleukin receptorok sejt felszíni kölcsönhatásainak vizsgálata

Az IL-2 és IL-15 citokinek fontos szerepet játszanak a T limfociták funkciójának és homeosztázisának szabályozásában. Receptoraik felépítésében három alegység vehet részt: a jelátvitelért felelős, mindkét receptor által használt β és γ lánc, valamint az adott citokinre specifikus α alegység. Korábbi FRET és konfokális mikroszkópiás vizsgálataink alapján az IL-2/15R rendszer elemei az MHC glikoproteinekkal közös „szuperklaszterekben” fejeződnek ki humán T limfóma sejtek lipid tutajában (koleszterinben és szfingolipidekben gazdag membrán mikrodomének).

Az IL-2/15 receptor foszforilációjakor nettó töltést és permanens dipólmomentumot nyer, így konformációját a környező elektromos tér befolyásolhatja. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a membránpotenciál (amit specifikus csatornablokkolókkal, illetve az ionmilió változtatásával befolyásolhatunk) hatással van-e a receptor kölcsönhatásaira és/vagy konformációjára, valamint működésére. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával megmértük az IL-2/15R és a vele közös szuperklaszterben elhelyezkedő MHC I, MHC II mobilitását. A membrán depolarizációját magas külső K^+ -tartalmú oldattal vagy a Kv1.3 csatornák margatoxinnal történő specifikus blokkolásával váltottuk ki. Mindkét esetben a vizsgált fehérjék mobilitásának szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. Felvetődik a kérdés, hogy mennyiben specifikus a jelenség az általunk vizsgált fehérjékre, illetve hogy azt nem egyszerűen a membránfluiditás megváltozása okozza-e. A DPH és TMA-DPH membránpróbák fluoreszcencia anizotrópiájának mérésével igazoltuk, hogy a membránfluiditás nem változik szignifikáns mértékben sem depolarizáció, sem a K^+ -ionofor valinomicinnel kiváltott hiperpolarizáció esetén. Kontrollként megmértük két lipid tutajokban feldúsuló molekula, a DiI-C18 lipid-analóg és egy transzmembrán régióval nem rendelkező GPI-kapcsolt fehérje, a CD48 mobilitását is. Ezen molekulák mobilitása nem függött a membránpotenciáltól. Tehát a tapasztalt változások legalábbis transzmembrán fehérjékre specifikusnak látszanak. Méréseinknek az ad immunológiai jelentőséget, hogy lokális

gyulladás esetén a $[K^+]$ növekedése figyelhető meg, ami a membránpotenciál megváltoztatásán keresztül befolyásolhatja a receptorok működését. Jelenleg folyó vizsgálatainkban a receptorműködést STAT5 foszforiláció-méréssel, a receptorok összeszerelődését, kölcsönhatásait FRET mérésekkel követjük nyomon depolarizáció, illetve hiperpolarizáció mellett.

Amerikai kollaborációs partnerünk laboratóriumában felfedeztek egy eddig nem ismert, Kit225 K6 humán T sejteken az IL-2R α alegységével asszociálódó fehérjét (ILRAP: interleukin receptorral asszociált protein), amely feltételezéseink szerint szerepet játszhat az IL-2R jelátvitel szabályozásában. FRET és konfokális mikroszkópiás mérésekkel kimutattuk az ILRAP és az IL-2R α együttállását, valamint az MHC glikoproteinekkel való kolokalizációját több más humán T limfóma eredetű sejtben is. Ugyanakkor az ILRAP nincs molekuláris közelségben a β és γ_c alegységekkel. Kimutattuk, hogy az IL-2/IL-15R rendszer elemeihez hasonlóan az ILRAP legnagyobb részben lipid tutajokban helyezkedik el. Mindezek alapján feltehető, hogy az ILRAP az IL-15/IL-2R rendszer és az MHC glikoproteinek által kialakított receptor "szuperklaszterek" egyik komponense. Az ILRAP-pel való kölcsönhatás további vizsgálata olyan jelátviteli útvonalak felfedezéséhez vezethet, melyek függetlenek a közös β/γ_c alegységektől és/vagy az ILRAP-pel való különböző kölcsönhatás révén megmagyarázhatják a két citokin által kiváltott sejtválaszok különbözőségét.

A rendelkezésünkre álló, ILRAP-specifikus antitest izotípusa (IgM) korlátozta annak felhasználhatóságát a további tervezett vizsgálatokban (pl. FCS), így ezek a vizsgálatok háttérbe szorultak. Ugyanakkor lehetőségünk adódott az IL-2/IL-15 receptorok sejt felszíni elrendeződését más módszerekkel (NSOM – közeli mező optikai mikroszkópia) is tanulmányozni, valamint a méréseinket klinikai mintákból származó primér sejtekre kiterjeszteni. Ugyancsak lehetőségünk adódott az IL-2/15 receptorokkal egy receptorcsaládba tartozó IL-9R vizsgálatára is.

Míg konfokális mikroszkópiával a fehérjék laterális elrendeződése és kolokalizációja a néhány 100 nm-es mérettartományban tanulmányozható, a holland kollaborációs partnereinknél rendelkezésre álló egyedi molekula érzékenységgű NSOM (közeli mező optikai mikroszkópia) módszer betekintést enged a domének belső szerkezetébe. NSOM méréseink feltárták, hogy az IL-2R α és az IL-15R α a nagyméretű (pl. CLSM-mel feltárható, néhány 100 nm-es) domének mellett kisméretű, csak néhány molekulából álló klaszterekben (vagy akár egyedi molekulaként) is megtalálható a Kit225 FT7.10 T limfóma sejteken. Az IL-2R α -nak csak kis hányada található a nagyméretű doméneken kívül, az IL-15R α esetén ez a hányad ~30%. Az IL-2R α és IL-15R α domének mérete nagyon hasonlóknak (átlagos átmérő: ~450 ill. ~360 nm) adódott. Az NSOM mérések megerősítették a két α -lánc kolokalizációjára vonatkozó eredményeket. A domének denzitását (fehérje/területegység) a domének mérete nem befolyásolta számottevően, ami arra utalhat, hogy az egyes domének hasonló összetételű építőelemekből épülnek fel, amelyek lehetnek pl. a korábbi FRET és CLSM adataink alapján valószínűsített, az IL-2/IL-15R rendszer és az MHC glikoproteinek által kialakított „szuperklaszterek”.

RNS interferenciával tanulmányoztuk az MHC I szerepét az IL-2/15R és az MHC glikoproteinek által kialakított szuperklaszterekben. Az MHC I expresszió leszabályozása nem befolyásolta az α -láncok expresszióját, ugyanakkor gyengült a kétféle α alegység kölcsönhatása. Az α -láncok és az MHC I kölcsönhatása szintén gyengült. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiás vizsgálataink alapján a csökkentett (leszabályozott) MHC I expressziójú sejteken mind az MHC I, mind pedig az α alegységek mobilitása megnövekedett, ami a klaszterek méretének csökkenésére és/vagy a komponensek közötti kölcsönhatások gyengülésére utal. Eredményeink az MHC I központi, organizáló szerepére utalnak az IL-15/IL-2 receptorok klasztereinek kialakításában.

A citoskeleton fehérjeklaszterek kialakításában betöltött szerepét membránblebeken

tanulmányoztuk. A blebek kialakulása során a plazmamembrán és a citoskeleton közötti kapcsolat gyengül, nagyméretű blebek esetén gyakorlatilag megszűnik. FRET módszerrel vizsgáltuk az IL-15R α , az IL-2R α és az MHC glikoproteinek közötti asszociációkat FT7.10 sejtek membránblebjein. Eredményeink szerint a blebeken a FRET hatásfok nem változik jelentősen az ép membránban mért értékekhez képest, ami arra utal, hogy a fenti fehérjék kisméretű klaszterei nem függenek kritikus módon a citoskeletontól, azaz kialakításukban elsősorban a komponensek közötti fehérje-fehérje kölcsönhatások vesznek részt. A blebeken a vizsgált molekulák mobilitása magasabb volt, ami feltehetően a citoskeletonális kapcsolatok megszűnésével magyarázható. Emellett membránblebeken megszűnik az ép membránokban megfigyelhető, a mikrodoménes szerkezetre jellemző foltszerű lipid- és fehérjeeloszlás (200 nm-es feloldáson homogénnek tekinthető). Ez arra utal, hogy magasabb hierarchikus szinten csökken a fehérjék kolokalizációja, csökken ezen klaszterek mérete, ami szintén okozhatja a nagyobb mobilitást.

Az egek mellett a T sejtek működésében is szerepet játszó IL-9 citokin biológiai hatását a specifikus IL-9R α láncból és a más citokinek, így az IL-15 és IL-2 által is használt közös γ_c alegységből felépülő heterodimer IL-9R komplexhez kötődve fejti ki. IL-9R α -val transzfektált Kit225 sejteken kimutattuk, hogy az IL-9R α –legalábbis részben– az MHC glikoproteinekkel és az IL-2R-ral közös membrándoménekből, azok közvetlen molekuláris közelségében helyezkedik el, azaz a vizsgált T sejteken az IL-9R szintén az IL-2R és az MHC glikoproteinek által kialakított szuperklaszterek egyik komponense. Bár az eredeti munkatervben nem szerepelt az IL-9R vizsgálata, ezen vizsgálatok hozzájárulnak a γ_c citokin receptorok működésének megértéséhez. Rámutatnak arra, hogy a T sejtek életében szerepet játszó, a közös γ_c alegységet alkalmazó citokinek receptorainak eloszlását feltételezhetően valamilyen általános "rendező elv" alakítja ki.

A korábban - főként tumor eredetű vagy egyéb immortalizált limfocita sejtvonalakon - talált sejtfelszíni receptor mintázatok számos esetben konzervatív motívumokat tartalmaznak. Ezekben az asszociációs motívumokban meglévő hasonlóságok vagy eltérések a sejtek közvetlen múltjáról tartalmazhatnak információkat, így diagnosztikai jelentőséggel bírhatnak, illetve mivel gyakran a jelátvitelben fontos szerepet betöltő receptorokról van szó, befolyásolhatják a sejtek közvetlen jövőjét, válasz-készségét, s ezáltal a betegség prognózisát is érinthetik. Az MHC I glikoproteinek és az IL-2/15R rendszer kolokalizációját korábban több T limfóma sejtvonalon kimutattuk (ld. fent). Jelen vizsgálatainkban kolorektális karcinómában szenvedő betegek tumor környéki nyirokcsomóiból származó CD4⁺ T sejtek felszínén található receptor mintázatokot hasonlítottuk össze a betegek perifériás véréből izolált sejtek mintázataival. Kontrollként egészséges donorok perifériás sejtjeit használtuk. Mindegyik esetben azonosítottuk az MHC I és II molekulákat és az IL-2/15R-t tartalmazó klasztereket konfokális mikroszkópiával. FRET méréseink alapján az előbb felsorolt fehérjék és az ICAM-1 egymás molekuláris közelségében helyezkedik el. A tumor környéki nyirokcsomókból származó sejteken a fehérjék expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt és a molekuláris kölcsönhatások – különösen az IL-2/15R és az MHC viszonylatában – gyengültek a kontrollhoz képest. Eredményeink alapján a sejtet érő külső stimulusok és a szöveti környezet átrendezheti a fehérjemintázatokot akár egyazon donor különböző helyről származó, azonos típusú sejtjein, ami befolyásolhatja a sejt működést és a sejt sorsot.

Kidolgoztunk egy megbízható FRET hatásfok meghatározási módszert fluoreszcens fehérjékkel (pl. GFP-mRFP, CFP-YFP) történő mérésekhez. A módszerrel meghatározható a donorral és akceptorral jelölt molekulák aránya, ami a kölcsönhatások sztöchiometriájának értékelésekor (pl. aggregátumok összetételének vizsgálata) alapvető fontosságú. A módszer segítségével megvizsgáltuk az IL-2/15R jelátviteli kaszkád egyik végpontján szereplő Jun és Fos transzkripciós faktorok alkotta heterodimer C terminális régiójának konformációját.

K⁺ csatornák szerepe a T sejtek jelátviteli folyamataiban

A programban a Kv1.3 csatornák immunológiai szinapszis (IS)-beli lokalizációjának következményét kívánjuk megvizsgálni. 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.

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 jellemző, 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, ugyanakkor jelentős különbséget mutattunk az áramot jellemző kinetikai paraméterekben. IS-ben lévő T sejteken a Kv1.3 aktivációs kinetikája szignifikánsan lassabb, míg az inaktivációs kinetika szignifikánsan gyorsabb volt mint egyedülálló T sejtek esetén. 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 jelenleg vizsgáljuk protein kináz és foszfatáz inhibitorok alkalmazásával.

E kísérleti rendszer segítségével igen jelentős felfedezést tettünk a T sejtek membránpotenciál szabályozásával kapcsolatban. Feltételeztük, 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 állódságát fenntartó un. 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 ioncsatorna gátlószerepét. 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 PNAS folyóirathoz nyújtottuk be közlésre.

A Kv1.3 csatornák protein kinázok és foszfatázok általi szabályozásán felül az is elképzelhető azonban, hogy az immunológiai szinapszisban, ahová a Kv1.3 átrendeződik, eltérő a sejtmembránban a lipid környezet, ami a csatorna kapuzásának megváltozását okozhatja. A lipid összetétel és a csatorna kapuzása közötti kapcsolat modell szintű vizsgálatát úgy végeztük el, különböző zsírsavak membránba történő beépülésének hatását vizsgáltuk a Kv1.3 csatornák 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 telítetlenségének 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.

A Kv1.3 csatornák aktivitásának leghatékonyabb módosítása olyan peptidtoxinok segítségével érhető el. A kutatómunka során jelentős eredményeket értünk el a csatorna fehérjék és a toxinok közötti kölcsönhatás megértése terén. Ennek egyik kulcspontja a toxinok csatornák közötti szelektivitásának megértése, melynek fontos terápiás következményei is lehetnek. Ezen belül is részletesen vizsgáltuk a Tst26 és a Css20 toxinok Kv1.2 és Kv1.3 csatornák közötti szelektivitását.

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 jellemző 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 oldalláncról 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 fenti adatokat figyelembe véve hipotézisünket a Tst26 peptid toxin felhasználásával is igazoltuk. A Tst26 részletes vizsgálata azt mutatta, hogy a Kv1.3 és Kv1.2 közötti szelektivitásért a Css20-ban azonosított, azzal ekvivalens pozícióban található aminosavak a felelősek.

Úgy érezzük, a pályázatban ismertett célokat elértük, a pályázati programot sikeresen teljesítettük. A pályázat által biztosított anyagi forrás, különös tekintettel az infrastrukturális beruházásokra, közvetlenül hozzájárult a tervezett projekt sikeres végrehajtásához, ill. hosszú távon is biztosíthatja a korszerű kutatómunkát.