

2006 márciusában klónozták a régóta keresett protoncsatorna-molekulát, mely egy feszültségfüggő káliumcsatornához hasonló, de annak pórusdoménjét nem tartalmazó fehérje. A molekulát egérben kezdetben mVSOP-nak, később, az emberihez hasonlóan, Hv1-nek nevezték el.

Megklónoztuk monocitákból differenciáltatott dendridikus sejtekből az emberi Hv1 fehérje cDNS-ét, és ellene siRNSeket terveztünk, melyek közül 2 hatékonynak bizonyult COS-7 sejtben heterológ módon túlexpresszáltatott, V5-epitóp taggelt Hv1 fehérjén. Ezen siRNSelek átlagosan 1/3-ára csökkentették a Jurkat sejtek (humán limfóma sejt vonal) endogén protonáramát. Előállítottunk továbbá Hv1 ellenes siRNS klónokat stabilan kifejező Jurkat klónokat, melyek közül néhányat elektrofiziológiailag is teszteltünk. Ezek közül egyben szintén az áramdenzitás mintegy 2/3-ával csökkent.

GST-fúziósfehérjét állítottunk elő az emberi Hv1 intracelluláris domainjéből (N-terminális 99 aminosav) poliklonális antitest termeltetés céljára. A fúziósfehérjével nyulakat immunizáltunk. Az egyik immunizált nyúl szérumból sikerült nagy affinitású Hv1 ellenes antitesteket izolálnunk. A fúziósfehérjével tisztított antitest (aHv1-N) Western-blotban (WB) alkalmazva ~32 kDa magasságban erős jelet adott egyes fehérvérsejt típusokban, míg ~70 kDa magasságában fagocitákban esetenként egy halvány csíkot lehetett detektálni (a Hv1 számított molekulásúlya ~31,5 kDa). Megfelelően előkezelt (proteázgátlás) eozinofil és neutrofil granulocitákban, és esetenként granulocita irányba differenciáltatott PLB-985 sejt vonalban is a ~70 kDa magasságban látható csík a ~32 kDa-oshoz hasonló intenzitásúvá válik. A nagyobbik molekula megfelel (ld. lentebb) az irodalomban heterológ expressziós rendszerben kimutatott Hv1-dimernek. Az antitest specificitását igazoltuk V5-ös epitóppal jelzett Hv1-el transzfektált Cos-7 sejtekben. A V5 ellenes antitest ugyanazt a fehérjét (WB) és ugyanazokat a struktúrákat (immunfluoreszcencia, konfokális lézermikroszkópia) jelölte, mint az aHv1-N. Továbbá a protonáram visszanyomásra hatékony siRNS-t stabilan kifejező Jurkat klónban a ~32 kDa-nál az aHv1-N jelölődés jelentősen csökkent.

A Hv1 molekula fehérjepartnerek szkrínelését immunoprecipitációval, keresztkötési reakciókkal, és a Hv1 N-terminálisával végzett „horgászással” is megkíséreltük. A Hv1 egyetlen detektált és azonosított fehérjepartnere maga a Hv1 volt, mivel a molekula stabil homodimert is alkot (ld. lentebb). Az előzetes kísérletek alapján stratégiát váltottunk, és az RNS interferencián alapuló további szkrínelés helyett a Hv1 protoncsatorna fehérje funkcionális jellemzőinek és szöveti kifejeződésének vizsgálatát helyeztük előtérbe.

Az antitestkészítmény segítségével immunofluoreszcens (IF) vizsgálattal kimutattuk emberi vérkenetben (perifériás vér), hogy a Hv1 döntően granulocitákban (eozinofil>neutrofil) és monocitákban van jelen, míg vörösvértestekben csak háttérnek tekinthető a jelölődés. Továbbá limfocitákban csak egy szubpopuláció festődik erősen. A mieloid sejtekben és B-sejtekben a jelentős kifejeződést WB és qPCR technikákkal is sikerült igazolni. Az expresszió nagyon alacsony szintjét T-limfocitákban qPCR és WB, míg vörösvértestek membránjában WB segítségével igazoltuk. A fenti eredményeinket összefoglalva tehát mRNS és fehérje szinten a Hv1 nagy mennyiségben megtalálható fagocitózisra képes mieloid sejtekben illetve B-limfocitákban. Nyugvó perifériás T-sejtekben és enyhén aktivált T-sejtekre hasonlító Jurkat sejt vonalban az expresszió szintje rendkívül alacsony (WB és részben qPCR), noha feszültségfüggő protonáram mérhető ezen sejt típusokban (patch-clamp).

Továbbiakban immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia segítségével azt vizsgáltuk, hogy hogyan viszonyul egymáshoz a Hv1 és gp91phox (avagy Nox2, a fagocitaoxidáz avagy phox központi enzime) expressziójának mértéke, ill. elhelyezkedése. A gp91phox kifejeződését 7D5 jelű monoklonális egér hibridóma felülűszójával detektáltuk. Polimorfonukleáris sejtek esetén az aHv1-N jelölés eozinofilekben bizonyult a legerősebbnek. A neutrofilek jelölődése ennél általában gyengébb, de meglehetősen változó mértékű volt. 7D5-tel viszont neutrofileken tapasztaltunk erőteljesebb jelölődést. A kolokalizáció mértéke eozinofilekben bizonyult erősebbnek. Monocitákban az eozinofilekhez hasonlóan magas aHv1-N jelintenzitást és gyakori kolokalizációt tapasztaltunk. Limfociták közül csak a sejtek egy része jelölődött (B-sejtek), de azok általában mindkét antitesttel. Szérum opszonizált zimozánnal összehozott granulocitákban 10 perc elteltével

fagoszómák kialakulása tapasztalható, melyek falában a Hv1-N és 7D5 nagyon hasonló mintázatban dúsul. Western blot és konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy a Hv1 (a Nox2-vel együtt) főként a neutrofilek granulumaiban található nyugvó sejtekben. PMA-val aktivált sejtek esetén azonban mind a Hv1, mind a Nox2 masszív plazmamembrán lokalizációját tapasztaltuk számos sejtben. Érdekes módon ezen sejtekben a sejtmag felbomlása (apoptózis) is megfigyelhető volt. Fenti kísérleteink igazolják, hogy a Hv1 valóban jelen van a legtöbb emberi fehérvérsejt membránjában, így létrehozhat ott protonáramot. Az pedig, hogy a Hv1 a fagoszóma falában a Nox2-vel együtt dúsul, igazolni látszik a neki tulajdonított oxidázt támogató szerepet.

A fagocitózis vizsgálatokat granulocita irányba differenciáltatott vad típusú és Nox2-hiányos (X-CGD) PLB-985 humán mieloid leukémia sejtvonalon is elvégeztük. Hv1 minden esetben a fagoszóma falában dúsult, függetlenül a funkcióképes Nox2 jelenlététől. PLB-985 sejtvonalon azt is megfigyeltük, hogy differenciálódás során a Hv1 és Nox2-kifejeződés párhuzamosan indukálódik. A Hv1 indukciója normál Nox2 fehérje hiányában lassul. A maximálisan indukálható Hv1-szint azonban X-CGD-s sejtekben nem tér el a vad típusúakban tapasztalhatótól. PLB-985-ös, Hv1-re nézve knock-down klón segítségével kimutattuk, hogy súlyosan gátolt Hv1-kifejeződés gátolja az intenzív szuperoxid-termelést. Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy a Hv1 masszív visszanyomása nem akadályozza a NADPH-oxidáz alegységek intenzív kifejeződését. A fenti adatok alapján kijelenthető, hogy a funkcionálisan szorosan kapcsolt Hv1 és Nox2 molekula kifejeződése egymástól nagymértékben független. A PLB klónokban mérhető protonáram denzitása arányos volt a detektálható Hv1 fehérje mennyiségével, megerősítve, hogy a Hv1 granulocitákban is elengedhetetlen a feszültségfüggő protonáramhoz.

Keresztkötő anyagok és/vagy nem ionizáló detergens alkalmazásával kimutattuk fehérvérsejtekben és PLB-985-ös granulocitákban, hogy a natív Hv1 mind monomer, mind homodimer formában kifejeződik. Granulocitákban azt is kimutattuk, hogy a Hv1 N-terminális ciszteinje képes diszulfidkötéssel stabilizálni a Hv1 dimert, azonban intakt, nyugvó sejteken ez a cisztein redukált formában van, és a dimerizációban nem vesz részt. Érdekes módon ha a granulociták szabadgyök termelését PMA-val aktiváltuk, akkor sem sikerült ezen cisztein jelentős oxidációját/diszulfid-képzését kimutatnunk. A PMA-val kiváltott aktiváció nem befolyásolta a monomer vs. dimer arányt sem. A fenti kísérletek alapján úgy tűnik továbbá, hogy magasabb rendű Hv1 homomultimer (pl. tri- vagy tetramer) nem fordul elő jelentős mennyiségben granulocitákban az általunk vizsgált körülmények között.

Az eddig ismertetett eredményeink jelentős részét a PLoS ONE nevű, nyílt hozzáférésű, online lapban közzeltük 2010 végén.

További munkáinkban megklónoztuk az egér Hv1-et (V5 és poly-His taggalt formában) és annak N-terminális 99 aminosavát (GST fúziós fehérje formájában). Két nyulat immunizáltunk az egér Hv1 molekula (mHv1) N-terminális peptidláncával. Az egyik nyúl mHv1 ellenes antitestek termelésével válaszolt. A továbbiakban az immunogén segítségével az anti-mHv1 antitesteket tisztított formában is előállítottuk. Megvásároltuk spermium és embrió formájában az mHv1 allélt elrontott (KO) formában tartalmazó egeret. Beállítottuk a vad típusú és elrontott mHv1 allél PCR alapú kimutatását genotipizálás céljából. Külső szolgáltató (Biotalentum Kft., Gödöllő) segítségével felélesztettük heterozigóta formában az mHv1-KO egértörzset. Állatházunkban azóta homozigóta-KO (mHv1<sup>-/-</sup>) egereket is előállítottunk keresztezéses tenyésztés útján. Vad típusú és KO egerekből származó szöveteken igazoltuk, hogy az anti-mHv1 készítményünk szelektíven detektálja az mHv1 molekulát Western blotban és egyes immunfluoreszcens vizsgálatokban.

Western blotban kimutattuk, hogy jelentős mennyiségű mHv1 fehérje termelődik egerekben pl. fehér zsírszövetben, tüdőben és húgyhólyagban, míg pl. szív- és vázizomban, illetve barna zsírszövetben a fehérje alig detektálható. Eddigi vizsgálataink alapján a fehérzsírban a csatorna döntően nem a zsírisejtekben, hanem egyes ún. strómasejtekben fejeződik ki. Húgyhólyagban mind az urotéliumban, mind a denudált hólyagfalban jelentős mennyiségű mHv1-et detektáltunk Western blot eljárással. Egyelőre kérdéses, hogy a hólyagban pontosan mely sejt típus fejez ki az mHv1-et

(immunsejtek vagy egyéb). Remélhetőleg az immunfluoreszcens jelölés optimalizálásával erre is választ kapunk majd.

További kísérleteinkben a Hv1 molekula fehérvérsejtek apoptózisában játszott szerepét vizsgáljuk. Ehhez részben a korábban említett PLB-985 klónjainkon, részben a vad típusú és mHv1-KO egerekből származó B-limfocitákon és csontvelői makrofágokon végzünk összehasonlító vizsgálatokat. Az apoptotikus sejteket propidium jodid jelölés és morfológia alapján azonosítjuk. Eddigi, előzetes adataink alapján a Hv1 molekula csökkent kifejeződése, illetve hiánya eltérően befolyásolja az apoptotikus rátát spontán, illetve indukált (pl. szérummegvonás) apoptózis esetén.

A fentiekén kívül egér B-sejtek szuperoxid termelését vizsgáljuk vad típusú és Hv1 hiányos egerekben. Irodalmi adatok alapján ugyanis mHv1-KO egerek B-sejtjeiben az indukálható (B-sejt receptor keresztükötése) szuperoxid-termelés jelentősen csökken. Az irodalomban megjelent interpretációval ellentétben mi azt gondoljuk, hogy a csökkenés hátterében teljesen más mechanizmusok állhatnak, mint a fagociták esetében. Vizsgálni kívánjuk, hogy B-sejtekben a hiányzó protoncsatorna művi helyettesítése (gramicidinnel, vagy amfotericinnel) normalizálja-e a szabadgyök-termelést, amint azt a fagocitákban tapasztalták. Előzetes eredményeink alapján ugyanis a protoncsatorna cinkkel történő gátlása, a fagocitáktól eltérően, B-sejtekben nem okoz jelentős csökkenést a szabadgyök-termelésben. Feltételezzük, hogy az mHv1 genetikai hiánya a B-limfociták fejlődését/működését sokkal alapvetőbben zavarja meg, mint a fagocitákét. Vizsgálatokat kezdtünk annak tisztázására, hogy a B-sejtek szabadgyök-termelésének támogatásában esetleg kálium és kloridcsatornák is fontos szerepet játszanak.

Végezetül szisztematikus, kvantitatív vizsgálatokat kezdtünk annak tisztázására, hogy hogyan viszonyul egymáshoz az egészséges emberekből származó neutrofil és eozinofil granulociták oxidatív robbanása, Nox2 és Hv1 kifejeződése. Véleményünk és előzetes adataink szerint ugyanis téves az vélekedés, hogy az eozinofil granulociták oxidáz expressziója és légzési robbanása kifejezettebb, mint a neutrofileké. A hibás vélekedést szerintünk az okozza, hogy a témában fellelhető adatok, nem humán eredetűek, vagy ha mégis, akkor eozinofiliában szenvedő emberekből származnak.

A fenti, még nem közölt témák közül a két utolsó vizsgálata előrehaladott annyira, hogy egy, maximum két éven belül közlemény formájában is nyilvánosságra hozhatóvá válik.