

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

**IONCSATORNÁK SZEREPE EGYES SEJTFUNKCIÓK
AKTIVÁCIÓJÁBAN**

RUBOVSZKY BÁLINT



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2004**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	5
1.1. A transzmembrán jelátvitel szerepe az élő rendszerek működésében.....	5
1.2. A jelátviteli folyamatok hatása a sejtmembrán ioncsatornáinak működésére.....	6
1.3. Az adenozin által kiváltott jelátviteli folyamatok hatása a membránpotenciálra és az ioncsatorna-aktivitásra.....	8
1.4. Az ozmózis, mint a spermiumok motilitását befolyásoló tényező. A feszülés-szabályozott csatornák szerepe a jelátviteli folyamatban.....	12
1.5. Csatorna-közelség mérése toxin-kötődés nanorészecskék általi késleltetésével	14
2. Célkitűzések	18
3. Anyagok és módszerek	20
3.1. Vegyszerek.....	20
3.2. Sejtkultúra.....	21
3.3. Elektrofiziológia.....	22
3.4. A membránpotenciál áramlási citometriás mérése.....	23
3.5. A kontraktilitásváltozás számszerű jellemzése.....	24
3.6. Kísérleti állatok.....	25
3.7. Izolált pitvari szívizomzat.....	26
3.8. Érpreparálás.....	27
3.9. A sperma-motilitás mérése.....	28
3.10. A membránfluiditás mérése	29
3.11. Kétdimenziós poliakrilamid-gél elektroforézis	31

3.12. A Pi2 toxin tulajdonságai és a mérés kivitelezése.....	32
3.13. A Pi2 által megvalósított csatornablokkolás adatainak elemzése.....	32
3.14. Monoklonális antitestek.....	33
3.15. Sejtek indirekt jelölése monoklonális antitestekkel és immunogold részecskékkel a patch-clamp kísérletekhez.....	33
3.16. Patch-clamp bemosási idő mérések az L243 monoklonális antitesttel.....	34
3.17. Sejtek jelölése áramlási citometriás mérésekhez.....	34
3.18. Áramlási citometriás energia transzfer (FCET).....	35
3.19. A sejt felszíni receptorok expressziós szintjének meghatározása.....	36
4. Eredmények	37
4.1. A CPA és CGS 21680 adenzin-agonisták elektrofiziológiai hatásának mérése áramlási citometriával és patch-clamp technikával	37
4.2. A NECA és F-NECA adenzin-származékok által kiváltott kontraktilitásváltozások vizsgálata szöveteken	41
4.2.1. <i>A₁-receptor-mediált kontraktilitásváltozások: pitvari szívizomzat és tüdőartéria</i>	<i>41</i>
4.2.2. <i>A_{2B}-receptor által kiváltott relaxáció: aorta és tüdőartéria</i>	<i>44</i>
4.2.3. <i>A NECA és F-NECA elektrofiziológiai hatása simaizomsejteken</i>	<i>45</i>
4.3. Mechanikai feszülés-aktivált csatornák szerepének vizsgálata spermiumok aktivációs folyamataiban	47
4.3.1. <i>A fugu hal (Takifugu niphobles) spermájának motilitása</i>	<i>47</i>
4.3.2. <i>Gadolinium hatása a fugu hal, közönséges ponty, és Ciona intestinalis zsákállat spermájának motilitására és sebességére</i>	<i>51</i>
4.3.3. <i>Membránfluiditás-mérések</i>	<i>53</i>

4.3.4. A gadolinium gátolja bizonyos sperma-proteineknek az aktivációval együtt bekövetkező, izoelektomos pontbeli eltolódását	54
4.4. Receptorok proximitásának vizsgálata a sztérikus kötődés jelenségének felhasználásával	55
4.4.1. A sztérikusan gátolt toxin-kötődés elmélete	55
4.4.2. A Kit 225 K6 sejtek vizsgált receptorainak expressziós szintje	63
4.4.3. Az MHC I és MHC II molekulák, az IL-2R α alegység és a VLA-4 integrin asszociációi: energiatranszfer-mérések	64
4.4.4. A sejtfelszíni receptorok aranygömb-jelölése különbözőképpen növeli a Pi2 toxin-kötődés bemosási időállandóját	67
4.4.5. Az MHC I glikoprotein immunogold jelölése megváltoztatja az L243 antitest által kiváltott blokkolás időállandóját	72

5. Megbeszélés

5.1. Az A ₁ és A _{2A} adenzin-receptor agonisták hatása a membránpotenciálra és az ioncsatornákra simaizomsejteken	75
5.2. A NECA és F-NECA adenzin-analógok által kiváltott funkcionális válasz kontraktilis szöveteken	77
5.3. A NECA és F-NECA elektrofiziológiai hatása simaizomsejteken	78
5.4. A spermiumok motilitásának változása gadolinium hatására	79
5.5. Korreláció a toxin-kötődés térbeli gátlása és az MHC-molekulákat tartalmazó lipid raft receptorsűrűsége között	85

5.6. A Kv1.3 elhelyezkedésének funkcionális következményei	85
5.7. Receptor-proximitások detektálása ioncsatornák receptor általi modulációjának térbeli gátlásával	87
5.8. A Kv1.3 MHC-ket tartalmazó lipid raftokban történő lokalizációjának biológiai szerepe	87
6. Összefoglalás	90
7. Irodalomjegyzék	93
8. Köszönetnyilvánítás	113

1. Bevezetés

1.1. A transzmembrán *jelátvitel* szerepe az élő rendszerek működésében

Az élő szervezetben a sejtek közötti kommunikációt extracelluláris szignál-molekulák közvetítik. Ezek közé tartoznak a hormonok, neurotranszmitterek és a növekedési faktorok is. Bár néhány szignál-molekula a plazmamembránon keresztül diffundálva, a citoszolban található fehérjéhez kötődik, a legtöbbjük sejt felszíni receptorhoz kapcsolódva fejt ki hatását [1-3].

A jelátvételi folyamat során egy ilyen külső kémiai inger vált ki valamilyen sejt választ az intracelluláris térben bekövetkező anyagcsereváltozások révén. A receptorokhoz specifikusan kötődő természetes vegyületek a ligandok [4], azok strukturális analógjai pedig az agonisták vagy antagonisták [5]. Az előbbi a természetes ligandhoz hasonló hatású, az utóbbi pedig nem idéz elő biológiai választ, viszont kompetíció révén gátolni képes az agonisták illetve ligandok hatását.

A ligandok sejt felszíni receptorokhoz történő kötődése a receptorban konformációs változást idéz elő, események sorozatát indítva el, amely a receptor és más fehérjék foszforilációjához és másodlagos hírvivők felszabadulásához vezethet [6,7]. Sok esetben a receptorok indirekt hatását G-proteinek közvetítik, amelyek a sejtmembrán belső rétegében helyezkednek el, és összeköttetést jelentenek a receptorok és azon enzimek között, melyek a másodlagos hírvivők szintézisét katalizálják [8,9].

A jelátvételi útvonalakat két nagy csoportba sorolhatjuk aszerint, hogy másodlagos hírvivők szintjének változása vagy receptor-foszforilációs folyamatok aktivációja a meghatározó a kezdeti lépésekben. Az eredmény mindkét esetben intracelluláris, sejt-specifikus fehérjék foszforilációja.

A másodlagos hírvivők közé tartozik a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP). A cAMP szintjét meghatározó adenilát-cikláz enzim regulációját kétféle G-protein szabályozza: A G_s stimulálja, míg a G_i gátolja az enzim

működését [10,11]. Az előbbit a kolera-toxin permanensen aktiválja, az utóbbit pedig a pertussis toxin inaktiválja, így mindkét toxin a cAMP-szint növekedéséhez járul hozzá. Használatukkal megállapítható, hogy egy adott stimulus hatására a G_i vagy a G_s által mediált jelátviteli útvonal aktiválódott-e [12,13].

A cAMP-n kívül a másodlagos hírvivők családjába tartozik a cGMP, az intracelluláris Ca^{2+} és a lipid hidrolízis termékei (IP₃, DAG, arachidonsav) [1,2]. Szerepük vizsgálatára a jelátvitelben alkalmasak lehetnek a megfelelő gátlószerek.

A receptor-foszforiláció révén megvalósuló jelátvitel során a receptorhoz extracelluláris oldalról történő kötődés az intracelluláris doménhez tartozó tirozin-kináz funkciót aktiválva a receptor és más, citoplazmikus fehérjék foszforilációjához vezet. A növekedési faktor-receptorok ilyen tirozin-kináz aktivitás útján közvetítik a jelet a sejt belseje felé, így a sejtmag irányába is a MAP kináz útvonalon keresztül [14,15]. Ezen útvonalak szerepét egy adott funkció kiváltásában tirozin-kináz gátlókkal vizsgálhatjuk (pl. Geldanamycin, Herbimycin A, Genistein) [16,17].

A két különböző jellegű útvonal (másodlagos hírvivők és receptor-foszforiláció által közvetített) nem független egymástól, közöttük csatolás léphet fel: példaként hozható erre az a tény, hogy bizonyos sejtekben a megemelkedett cAMP-szint a MAP kináz útvonal gátlásához vezet [18-19].

1.2. A jelátviteli folyamatok hatása a sejtmembrán ioncsatornáinak működésére

A jelátviteli folyamatok során bekövetkező foszforilációs események befolyásolhatják az ioncsatornák funkcionális tulajdonságait [20]. Az ioncsatornák ilyen módon megvalósuló modulációját sok csatorna-típussal kapcsolatban leírták, így kalcium-aktivált káliumcsatornák [21], feszültségfüggő kalciumcsatornák [22], kloridcsatornák [23] és nátriumcsatornák [24] esetében.

A funkcionális változások a csatornák által képviselt áram kinetikai paramétereit (aktiváció, inaktiváció), az aktiváció feszültségfüggését és az áram amplitudóját is érinthetik, illetve ezek kombinációját, komplex működésbeli változást létrehozva [25,26]. Számos esetben kimutatták, hogy az ioncsatornák fenti regulációját a csatornafehérje direkt foszforilációja okozza [27].

A limfocitákban nagy számban expresszálódó Kv1.3 feszültségfüggő káliumcsatorna foszforiláció általi modulációja kiterjedt vizsgálat tárgyát képezte az elmúlt évtized során. A PKC általi foszforiláció növeli a Kv1.3-áramot [28], a csatornákon található szerin-helyek foszforilációjának következtében [29]. A Kv1.3 tirozin foszforilációja a csatorna inaktivációjához vezet. Az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor és inzulin receptor tirozin kinázok által indukált foszforiláció csökkenti a csatorna-áramot [30]. Az áramszint modulációja 10-20 perc alatt következik be, EGF vagy inzulin-kezelés hatására, patch-clamp felvétel alatt. A v-Src nonreceptor tirozin-kináz szintén inaktiválja a Kv1.3 ioncsatornákat [31]. A csatornán elvégzett mutációs vizsgálatok szerint az áramamplitudó és kinetika különböző modulációja különböző tirozin-helyek foszforilációjának eredménye a csatornán. A kiváltott áramszint-változást részben, vagy teljesen meg lehetett szüntetni, amikor tirozin-kináz gátlószereket alkalmaztak, vagy tirozin-helyek mutációját hozták létre a csatornán.

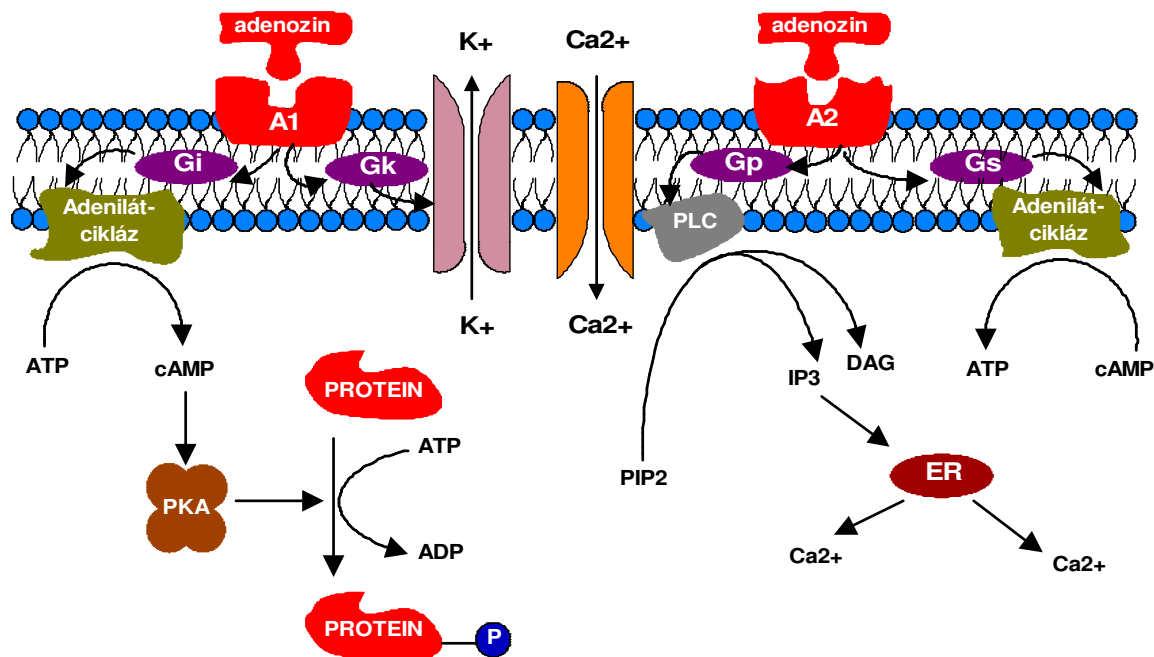
Egy extracelluláris szignál által kiváltott jelátviteli folyamat nem csak liganddal történő kezelés (pl. inzulin, EGF) esetén képes csatornamodulációt kiváltani, hanem antitest-receptor kölcsönhatás révén is [32]. A CD95 antigénhez történő antitest-kötődés csökkenti a Kv1.3 csatornák áramát, amikor az antitestet whole-cell konfigurációban, perfúzióban adják a sejthez. A konduktanciaváltozás közvetítésében a p56^{lck} tirozin-kináz jelentős szerepet játszik, mivel annak deficienciája, vagy a Herbimycin A kináz-gátló alkalmazása csökkentette a Kv1.3-modulációt.

Egyes ioncsatornák működésére a G-proteinek közvetlenül is hatást gyakorolhatnak, vagyis a jelátvitelt membránbeli komponensek közvetítik, abban citoplazmikus fehérjék nem vesznek részt [33].

1.3. Az adenzin által kiváltott jelátviteli folyamatok hatása a membránpotenciálra és az ioncsatorna-aktivitásra

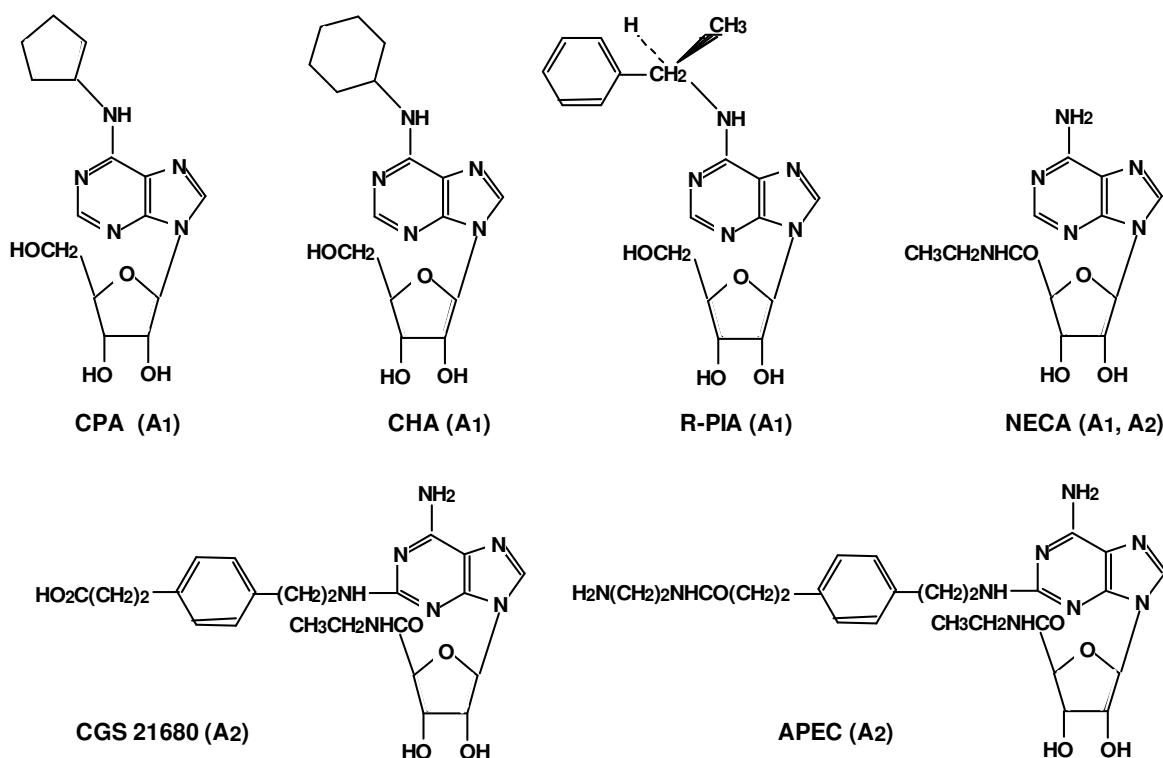
Az adenzin a szervezet minden sejtjében megtalálható vegyület. Meghatározott fiziológiás körülmények között kerül az extracelluláris térbe, megnövekedett oxigénszükséglet/oxigénellátás arány esetén [34]. Az adenzin számos szövetben és sejtben sokféle hatás kifejtésére képes: A szívben csökkenti a pacemaker-aktivitást [35], lassítja az atrioventrikuláris csomón keresztül történő vezetést [36], antiaritmiás hatású [37]. A koszorúereket tágítja [38], csökkenti a perifériás érellenállást [39]. A központi idegrendszerbeli hatásai közé tartozik a neurotranszmisszió gátlása [40].

Az adenzin a hatását a sejtmembrán specifikus receptoraihoz kapcsolódva fejt ki. Az adenzin-receptorok között megkülönböztetnek A_1 , A_2 és A_3 receptorokat, az A_2 receptorok pedig az A_{2a} és A_{2b} altípusokba sorolhatók [41]. Ezen receptorok mindegyike G-protein-csatolt [42]. Az A_1 -receptorok által mediált jelátvitel a G_i és G_o proteineken keresztül történik, ennek megfelelően gátolja az adenilát-cikláz enzim aktivitását (és ezzel a cAMP-szintet csökkenti), valamint az A_1 -en keresztül kifejtett hatás blokkolható pertussis-toxinnal [43,44]. Az A_2 -receptorok ezzel szemben G_s -protein-csatolt receptorok [45], így stimulálják az adenilát-ciklázot. Az A_3 -receptorok G_i -csatoltak. Az A_{2A} és A_{2B} között strukturális és farmakológiai különbségek vannak [46].



1. Ábra Az adenosin receptorához történő kötődése nyomán kialakuló jelátviteli folyamatok sematikus ábrázolása. Az A_1 adenosin-receptor a G_i proteinen keresztül gátolja az adenilát-cikláz enzim aktivitását, ami az intracelluláris cAMP-szint csökkenéséhez vezet. Az A_2 adenosin-receptorhoz történő kötődés ezzel szemben a G_s protein közvetítésével stimulálja az adenilát-cikláz és így a cAMP termelődését segíti elő. A tényleges sejtválasz a PKA rendszer aktivációja és további fehérjék foszforilációja nyomán alakul ki. Az adenosin-receptorok G-proteinek közvetítésével a foszfolipáz-C (PLC) enzim működését is befolyásolhatják, melynek megnövekedett aktivitása az IP_3 termelésén keresztül az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} felszabadulását eredményezheti. Az adenosin hatását kifejtetheti másodlagos hírvivők nélkül is: Az A_1 receptorok aktivációját követő kálium-csatorna-aktiváció közvetítheti egy – a membránban található – G-protein (az ábrán ezt G_k -val jelöltük).

Számos szelektív adenosin-receptor agonista, illetve antagonistá létezik, melyek eltérő affinitással kötődnek az egyes receptor-típusokhoz [47]. Ez lehetőséget ad a receptorok farmakológiai módszerrel történő azonosítására. Viszonylag nagy affinitású A_1 -agonista az N6-ciklopentil-adenozin (CPA), A_{2A} -agonista a 2-[p-(2-karbonil-etil)-feniletilamino]-5'-N-etilkarboxamidoadenosin (CGS) [48], A_{2B} -agonista az 5'-N-etil-karboxamidoadenosin (NECA) [49,50]. A_1 -antagonista az 1,3-dipropil-8-ciklopentilxantin (DPCPX) [51]. Nonszelektív adenosin-receptor antagonistá a koffein, a teofillin, illetve a 8-fenil-teofillin (8-PT) [52].



2. Ábra Adenosin-receptor agonisták kémiai szerkezete. Nagy specificitással bír az A_1 receptorral szemben a CPA, a CHA és az R-PIA, ezzel szemben A_2 -szelektív a CGS 21680 és az APEC. A NECA közel azonos mértékű agonistája az A_1 és az A_2 receptoroknak.

Az adenosin az agyi erek és a vázizmok relaxációját is kiváltja [53-56], valamint véd az agy és a vázizomzat oxigénhiányos állapotában bekövetkező károsodása ellen. Tengerimalac pitvari szívizomzatban csökkenti a kontraktilis erőt, az aortában pedig relaxációt vált ki [57]. A tüdő artériáiban ezzel szemben kontrakciót indukál az adenosin, ami a légzési ritmust befolyásolja [58].

Bár az adenosin-receptorok legismertebb jelátviteli útvonala az adenilát-cikláz-aktivitás gátlása vagy aktivációja, az adenosin számos hatása konduktanciabeli változásokkal jár, különösen a K^+ és Ca^{2+} -csatornák módosításával, amely természetesen a membránpotenciál megváltozását is maga után vonja [59-62]. Ismert, hogy a membránpotenciál alapvető szerepet játszik a

jelátvitelben, azonban a membránpotenciál megváltozásának lehetséges szerepét a sejtek adenosin-receptor-aktivációra történő válaszában még nem vizsgálták részletesen.

1. táblázat Egyes adenosin-receptor típusok által közvetített folyamatok különböző fajokban.

Szövet/szerv	Faj	Hatás	A₁	A₂
Agy	patkány	szívritmuscsökkenés	+	
Szív	tengerimalac	antiadrenerg	+	
Koszorúér	humán	vazodilatáció		+
Vese	kutya	renin felszabadulás ↓	+	
Tüdő	humán	hisztamin felszabadulás ↓	+	
Hasnyálmirigy	patkány	inzulin-termelés ↓	+	
Vas deferens	patkány	neurotranszmitter-felszabadulás ↓	+	

Az adenosin érfal-simaizomzatot relaxáló hatása olyan mechanizmusok révén valósul meg, melyek az intracelluláris Ca²⁺-szintet csökkentik illetve a kontraktilis apparátus Ca²⁺-érzékenységet redukálják [63]. A K⁺-csatornák fontos szerepet játszanak a relaxáció közvetítésében [64-66]: Megnövekedett aktivitásuk hiperpolarizálja a simaizomsejtet, és így a feszültségfüggő Ca²⁺-csatornákon át kevesebb Ca²⁺ tud beáramlani a sejtbe, ezáltal csökken a simaizom-kontrakció. Ebben a folyamatban szerepet játszanak a Ca²⁺-aktivált K⁺-csatornák, és az ATP-függő K⁺-csatornák is: A nagy konduktivitású Ca²⁺-aktivált K⁺-csatornák gátlása blokkolja az adenosin által indukált koszorúér-dilatációt [67], az ATP-függő K⁺-csatornák adenosin hatására történő aktivációja pedig az artéria elernyedését eredményezi [68]. Újabban feszültségfüggő káliumcsatornákra is leírták az érfal-izomtónust befolyásoló funkciót [63]. Ezért új vagy ismert adenosin-származékok hatásának vizsgálata

izomsejtek káliumáramaira egy alkalmas módszer lehet a származék funkcionális vizsgálatára.

A pozitron-emissziós tomográfia (PET) segítségével vizsgálható az adenzin-receptorok eloszlása a központi idegrendszerben és a szívizomzatban. Ilyen vizsgálatok elvégzésére az elmúlt évtized során több protokollt is kidolgoztak, különböző ligandok használatával. Ezen technika radioaktívan jelölt ligandok alkalmazását igényli, amelyek nagy aktivitással és szelektivitással rendelkeznek. A ^{18}F -NECA az A_2 adenzin-receptor agonista NECA radioaktívan jelölt származéka, ahol egy pozitron-emittáló fluor-atomot kötnek az eredeti molekulához. Az F-NECA a ^{18}F -NECA nem-emittáló változata. A ^{18}F -NECA már bizonyítottan alkalmas radioligand az adenzin-receptorok eloszlásának PET-tel történő megjelenítésére [69,70].

1.4. Az ozmózis, mint a spermiumok motilitását befolyásoló tényező. A feszülés-szabályozott csatornák szerepe a jelátviteli folyamatban.

Mind az édesvízi, mind a tengeri halak spermiumsejtjei immotilisak a hím szaporítószervben vagy olyan oldatokban, amelyeknek az ozmolaritása hasonló, mint a szeminálplazmaé. A spermiumok mozgása azonnal megindul, amint olyan külső közegbe kerülnek, ahol az ívás történik [71]. Az édesvízi halak spermiumsejtjei motilisakká válnak, amikor hipoozmotikus oldatba kerülnek [72-76]. A tengerben élő halfajok sperma-motilitását is megindítja a hiperozmotikus tengervízbe történő kerülésük [71,72,77,78]. Mind az édesvízi, mind a tengeri halak esetében kimutatták, hogy az intracelluláris K^+ és Ca^{2+} -koncentrációbeli változások a környezet hiper- vagy hipoozmotikus irányba történő változásának eredménye [72,78].

A Ciona zsákállat szeminálplazmájának ozmolaritása hasonló a tengervízéhez, vagyis nincs változás az ozmolarításban az ívásnál. A spermát aktiváló és vonzó anyag, az SAAF, mely a petéből származik, a felelős a Ciona

spermájának aktiválásáért, kiváltva a Ca^{2+} -ionok Ca^{2+} -csatornákon történő beáramlását [79,80].

Számos tanulmány kimutatta, hogy az emlősök spermiumsejtjeiben a motilitás szabályozásában szerepet játszanak a ciklikus nukleotidok, bikarbonátok, koleszterin és fehérje-foszforiláció, viszont eddig még nem találtak ozmolaritás-függést a folyamatban [81-83].

A különböző fajok spermiumsejtjeiben közös, hogy a sejtek viselkedését elsődlegesen a Ca^{2+} -ionok határozzák meg [84]. A spermiumok több olyan csatornát expresszálnak, melyek a Ca^{2+} -ionok számára átjárhatók és ezek a csatornák nélkülözhetetlen szerepet játszanak a sperma-motilitás szabályozásában. Feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák (Ca_v 1.2, 2.1, 2.2, 2.3), ciklikus nukleotid-vezérelt csatornák (CNG), tranziens receptor-potenciál-vezérelt csatornák [85-88], R-, N- és T-típusú feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornák mind megtalálhatók a spermiumokban [89-92], bár a spermiumok Ca^{2+} -csatornáinak molekuláris felépítése és működési tulajdonságai még nem teljesen tisztázottak.

A feszülés-aktivált, mechanikailag érzékeny csatornák egyaránt megtalálhatók a növényi és állati sejtekben [93,94]. Ezek a csatornák sokféle mechanikai hatásra adott válaszban szerepet játszanak, így a sejtterfogat szabályozásában, az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megemelkedésében és a sejtek proliferációjában [95,96]. Ezek a csatornák nagymértékben érzékenyek a membrán mechanikai feszültségére, számos membránfehérje aktivitását befolyásolják [97], ezért szerepet játszhatnak a halak spermiumsejtjeinek motilissá válásában. A mechanikailag érzékeny csatornák a leggyakrabban kation-szelektívek, a Ca^{2+} -ionokat és az egyértékű kationokat egyaránt átengedik [94]. A gadolinium, amely egy háromértékű lantanida, többféle ioncsatornát blokkol, többek között az alacsony és magas feszültség-aktivált Ca^{2+} -csatornákat [98] és késleltetett egyenirányító káliumcsatornákat [99]. Azt is igazolták, hogy

a gadolinium blokkolja a feszülés-aktivált csatornákat, és így több fiziológias folyamatot gátol [100,96].

A spermiumok különböző érzékenységet mutatnak a környezet ozmolaritásának megváltozásával szemben. Ez felveti azt a kérdést, hogy az ozmolaritás által szabályozott mechanoszenzitív kalcium-csatornák szerepet játszanak-e abban a mechanizmusban, amely a spermiumok motilitássá válását eredményezi édesvízi és tengeri halfajok esetében. Ezeken a csatornákon keresztül áramolhat ugyanis be a sejtbe a Ca^{2+} -ionok döntő hányada, amely szükséges a spermiumok motilitásának kialakulásához [95].

Bár a spermiumok motilitásának aktivációját és kemotaxisát már vizsgálták tengeri sünök [101], zsákállatok [102], pisztrángok [103] és emlősök [84,92] esetében, a transzmembrán jelátvitel, amely a sperma-motilitás ozmózisnyomás általi szabályozásában szerepet játszik, még nem teljesen ismert.

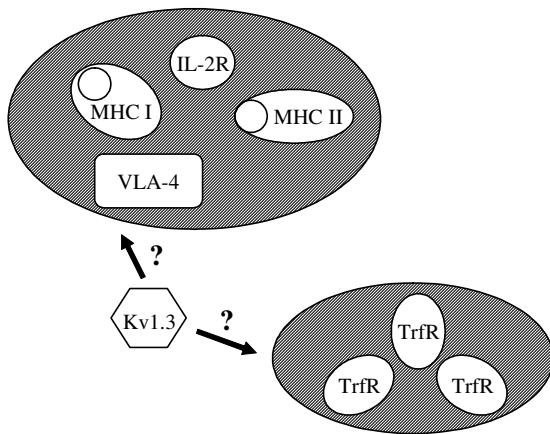
1.5. Csatorna-közelség mérése toxin-kötődés nanorészecskék általi késleltetésével

Az immunológiai szempontból fontos jelátviteli molekulák sejt felszíni együttállásaiból adódó szuperstruktúrák létezésére és lehetséges biológiai szerepére a közelmúltban több kísérleti eredmény is felhívta a figyelmet [104, 105, 106, 107, 108, 109, 110]. Ezen molekulák közé tartoznak az I.-es és II.-es osztályba sorolt Fő Hisztokompatibilitási Antigének (MHC I és MHC II), az Interleukin-2 citokin receptor-komplex (IL-2R), és az Intercelluláris Adhéziós Molekula 1 (ICAM-1). Az ilyen molekulák nano- és mikrométeres nagyságrendű homo- és heteroasszociációi figyelemreméltó hasonlóságot mutatnak a vizsgált különböző sejtvonalakon [104,108,109,110]. Az ion-detergensben oldhatatlan, glikoszfingolipidben és koleszterinben gazdag mikrodomének (DRM-ek), melyeket lipid raftoknak is hívnak, bizonyítottan részt vesznek ezeknek a receptor-klasztereknek az összetartásában [108,110]. A

lipid raftok fizikailag összetartanak egyes fehérjekomponenseket, így összekapcsolják a receptorokat a megfelelő, a jelet a sejt belseje felé továbbító szignalizációs molekulákkal („fókuszáló”, „átváltó” hatás). Így adapter és kináz molekulák kihorgonyzási helyül is szolgálnak [111]. A citokin IL-2 receptor (IL-2R) a Janus kinázokon (Jak) keresztül aktiválja a STAT3, STAT5 és *lck* családba tartozó foszfortirozinokat (pl. a p56^{lck}-t) [112,113], és a helper és citotoxikus T-sejtek autokrin módon történő aktivációjával fontos szerepet játszik a mitogének illetve antigének által kiváltott immunválaszokban és az aktiváció-indukált sejthalál (AICD) lezajlásában. A már régóta ismert antigénprezentáló funkciójukon kívül az MHC I és MHC II molekulákról érdekes módon újabban kimutatták, hogy egyfajta aktív, „nemklasszikus” szerepet töltenek be a transzmembrán szignalizációban: apoptózist indukálhatnak vagy sejteket aktiválhatnak a differenciáltság mértékétől és a sejtvonal típusától függően [114,115]. Az elmúlt években azt találták, hogy IL-2 receptor szignalizációjához tartozó tirozin és szerin kinázok az MHC által kiváltott útvonalakban is részt vesznek [114,115,116]. Ezekből a megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy a fenti molekulákat receptor-klaszterekbe szervező lipid raftok a jelátvitel funkcionális egységeinek tekinthetők, ennek eredményét pedig a fehérjekomponensek egymáshoz viszonyított aránya és minősége határozza meg.

A lipid raftok összetételén kívül a transzmembrán jelátvitelt egy másik fontos fiziológiai tényező is befolyásolja: a membránpotenciál [117]. A hatékony jelátvitelhez szükséges potenciál-ablak fenntartásában meghatározó szerepet játszanak a feszültség- és Ca²⁺-függő káliumcsatornák [118,119,120,121,122,123,124,125]. Ezek az ioncsatornák vélhetően direkt vagy indirekt módon csatoltak az MHC-t és IL-2R-t tartalmazó lipid raftokhoz. A csatolás tényét a következő megfigyelések támasztják alá: (1) A fenti receptorok által megvalósított transzmembrán jelátvitel bizonyítottan membránpotenciálváltozással is jár: IL-2 liganddal és MHC II-ellenes antitestekkel történő kezelés

depolarizálja a sejtmembránt [126,127]. (2) Azt is kimutatták, hogy az MHC I molekulák válaszreakciót adnak a membránpotenciál változására [123,127]. (3) Az MHC és IL-2R által mediált szignáltranszdukcióban részt vevő tirozin és szerin kinázok képesek modulálni egyes káliumcsatornák áramát [114,30,28,128,129]. (4) A lipid raftok integritásának koleszterin-kivonással történő modulációja megváltoztathatja a csatornaáram kinetikáját [130]. A receptor-csatorna kölcsönhatás természetétől függetlenül (melyet közvetíthet membránpotenciálbeli változás vagy intracelluláris hírvivő-molekula), a csatornák és raft-komponensek relatív elhelyezkedése a receptor-csatorna kölcsönhatás hatékonyságát meghatározó tényező lehet [131,132].



3. Ábra A vizsgálni kívánt receptorok membránbeli kompartmentalizációja. Az MHC I és MHC II glikoproteinek, az IL-2R α alegység és a VLA-4 integrin ugyanazon lipid raft elemei. A transferrin-receptor (TrfR) egy másik kompartmentben helyezkedik el. Vizsgálni kívántuk, vajon Kv1.3 csatornák az MHC-t tartalmazó lipid raftok közelében helyezkednek-e el.

Az immunsejtek felszínén jelentős számban expresszálódó Kv1.3 feszültségfüggő káliumcsatornák hatékony ($K_d = 44$ pM) és szelektív gátlószere a *Pandinus imperator* skorpió toxinjából kivont Pi2 frakció. A Pi2 peptid-toxinnak a térbeli takarás demonstrálása céljából végzett kísérletben való alkalmazása azért előnyös, mert más káliumcsatorna-gátlószerekhez (4-AP, TEA) viszonyítva nagyságrendekkel nagyobb a molekulatömege és így a térkitöltése is. Ha a kérdéses lipid raftok receptorait elsődleges antitestekkel megjelöljük, majd ezekhez másodlagos antitestekkel bevont aranygömböket kötünk, akkor a receptorok homoasszociáltsága miatt egy térhálós szerkezet jöhet létre az esetlegesen közelségben lévő ioncsatornák felett. Ez az aranygömbökből és antitestekből álló hálózat takarhatja az csatornákat az

áramlási rendszerben érkező, nagyméretű peptid-toxintól, ami így a toxin csatorna-szájadékba való bekötődését és a csatornaáram-gátlás késleltetését eredményezheti. A Pi2 toxin-molekulák fiziológias oldatban pozitív töltésűek és áramlási (perfúziós) rendszerben konduktív valamint konvektív transzporttal jutnak a sejtfelületre. A toxin-csatorna kölcsönhatás gátlása adódhat az aranygömbök és antitestek térfoglalása miatti lokális toxin-hígulásból, illetve a diffúzió az akadályrendszer jelenléte miatti csökkenéséből (hidrodinamic drag).

2. Célkitűzések

Meg kívántuk vizsgálni az A_1 és A_{2A} adenosin-receptorokhoz történő ligand-kötődés hatását simaizomsejtek membránpotenciáljára és a membrán kálium-konduktanciájára. A méréseket DDT1 MF-2 sejteken terveztük, ezek hörcsög vas deferens-éből nyert simaizom-sejtek [133], melyek A_1 és A_2 típusú receptorokat egyaránt expresszálnak [134,135] és feszültségfüggő K^+ -csatornák is találhatóak a sejtmembránjukban [136], ezért a fenti vizsgálatok számára alkalmas rendszert szolgáltatnak.

Továbbá össze kívántuk hasonlítani az F-NECA és a NECA (adenosin-receptor agonisták) által kiváltott, adenosin A_1 és A_2 -receptorok által közvetített kontrakció- és relaxációbeli változásokat egyes szövetekben, valamint a sejtmembrán kálium-konduktanciájára gyakorolt hatásukat egyedi sejteken. A szövetek, melyeken a kísérleteket el kívántuk végezni: tengerimalac pitvari szívizom, tüdőartéria és aorta, melyeken A_1 illetve A_{2B} -mediált kontraktilitásbeli változásokat írtak le [57,58]. Az egyedi sejten történő méréseket pedig DDT1 MF-2 sejteken terveztük, a patch-clamp technika segítségével.

Az extracelluláris ozmolaritás hatással lehet a membrán fizikai állapotára és ezen keresztül az ott lévő ioncsatornákra is [137]. Ezzel összefüggésben célul tűztük ki a mechanoszenzitív csatornák szerepének vizsgálatát a *Takifugu niphobles* tengeri hal és *Cyprinus carpio* édesvízi hal, és a *Ciona Intestinalis* zsákállat aktivációjában. Ebből a célból a feszülés-aktivált kationcsatorna-blokkoló Gd^{3+} alkalmazását és fluorimetriás fluiditás, valamint fénymikroszkópos motilitásvizsgálatokat terveztünk.

A Kv1.3 csatornák bizonyos receptorok és kinázok általi modulációjának ismeretében [29-31] arra is kerestük a választ, hogy az immunválaszban szerepet játszó sejt felszíni receptorok és a Kv1.3 fizikai közelségben vannak-e. Méréseinket Kit 225 K6 humán T-limfóma sejt vonalon kívántuk elvégezni, a kérdéses receptorok pedig az MHC I, MHC II, az IL-2R α alegység és a VLA-4

integrin, melyek ezeken a sejteken egyazon lipid rafthoz asszociáltak. Negatív kontrollként az előbbitől különböző rafthoz tartozó TrfR-t kívántuk használni.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Vegyszerek

Az alkalmazott vegyszerek mindegyike analitikai vagy spektroszkópai minőségű volt. A *Bis*(1,3-dibutilbarbiturát sav(5)) trimetin oxonol (diBA-C₄-(3)) (oxonol)-t a Molecular Probes-tól szereztük be (Eugene, OR, USA). Az adenzin dezamináz-t a Boehringer-Mannheim-től vásároltuk (Indianapolis, IN, USA). Az adenzin-receptor ligand 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ylamino]etil)fenol (ZM 241385)-t a Tocris-tól rendeltük (Bristol, UK). A 2-[p-(2-karbonil-etil)-feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamido-adenzint (CGS 21680) és a 8-ciklopentil 1,3-dipropilxantin-t (DPCPX) az RBI-től szereztük be. (Natick, MA, USA). A noradrenalin bitartrát a Richter Gedeon-tól származott. A 18F-NECA-t és nem emittáló analógját saját laboratóriumunkban készítettük, a [138]-ben megadottak alapján. A 8-fenil-teofillin-t (8-PT) a Calbiochem-Behring-től rendeltük (La Jolla, CA, USA). A 8-(3-klorosztiril)koffein-t (CSC) a [139]-ben leírtaknak megfelelően készítettük el. Az oxonol-ból és az adenzin-receptor-ligandokból törzsoldatokat készítettünk DMSO oldószerrel és azokat -20 °C-on, sötétben tároltuk. A kísérletek elvégzéséhez a törzsoldatokból a mérés napján hígítottunk friss oldatokat. A DMSO végső koncentrációját mindig 0.5 % (v/v) alatt tartottuk. A Ouabain, tetraetilammónium-klorid (TEA), 4-aminopiridin (4-AP), N⁶-ciklopentiladenzint (CPA), 5'-N-etil-karboxamido-adenzint (NECA), pertussis toxin és szervesetlen vegyületek a Sigma-tól származnak (St. Louis, MO, USA). A foszfát-pufferelt sóoldat (PBS) tartalma: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7.3.

A valinomycin-t, verapamil-t és a Ca²⁺-ionofór A23187-t a Sigma-tól vásároltuk (St. Louis, MO). A kalcium- és káliumcsatorna blokkolókat és az intracelluláris Ca²⁺-mobilizáló thapsigargin-t az Alomone Labs Ltd.-től

rendeltük (Jeruzsálem, Israel). A kalmodulin inhibitor W-7 (N-(6-aminohexyl)-5-chloro – 1 – naftalin - szulfonamid), W-5 (N- (6- aminohexyl) – 1 – (naftalin-szulfonamid) és protein-kináz inhibitor KN-93 (N-[2-(N-(4-klór-cinnamil)-N-metilaminom-etil)fenil]-N-[2hidroxietil]-4-metoxibenzénsulfonamid) és KN-92 a Seikagaku Kogyo CO.-tól származik (Tokyo, Japán). A spermiumok mérésével kapcsolatos egyéb anyagokat a Wako Pure Chemical Industries Ltd.-től vásároltuk (Japán). Az A23187-t és valinomycin-t DMSO-ban oldottuk.

A halak számára készített fiziológias oldat (FPS) összetétele: 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM CaCl₂ és 10 mM HEPES, pH 8.5. A kalcium-mentes FPS (NoCaFPS) tartalma: 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM EGTA és 10 mM HEPES, pH 8.5, az aktiváló oldat (AS) összetétele: 25 mM KCl, 25 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, és 5 mM HEPES, pH 8.5. A kalcium-mentes aktiváló-oldat (NoCaAS) tartalma: 25 mM KCl, 25 mM NaCl, 5 mM EGTA és 5 mM HEPES. A szeminálplazmához hasonló összetételű oldat (SLS) összetétele: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.5. A szeminálplazmához hasonló összetételű oldat Ca-mentes változata (NoCaSLS) az alábbiakat tartalmazta: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Hepes, 5 mM EGTA, pH 7.5. A mesterséges tengervíz (ASW) összetétele: 300 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM CaCl₂, pH 8.5. A kalcium-mentes mesterséges tengervíz (NoCaASW) tartalma: 300 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, pH 8.5. A módosított mesterséges tengervíz (ASW-2) összetétele: 462 mM NaCl, 9 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 48 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 8.2.

3.2. Sejtkultúra

A szíriai aranyhőrcsög vas deferens-éből származó simaizom-sejtvonalat (DDT1 MF-2) az European Collection of Animal Cell Cultures-től (Salisbury, UK) szereztük be. A DDT1 MF-2 sejteket 37 °C-on tenyésztettük, 5 % CO₂-t és 95 % O₂-t tartalmazó nedves környezetben. A tenyésztési médium a Dulbecco's

modified Eagle's medium, melyet kiegészítettünk 2 mM L-glutaminnal és 10 % (v/v) fetal calf serum-mal (FCS). A sejteket mechanikai úton távolítottuk el, ezután mostuk PBS-ben. Az áramlási citometriás mérésekhez 2×10^7 /ml koncentrációban sejtszuszpenziót alkalmaztunk. Az endogén adenozin eltávolítására adenozin-deaminázt (2 E/ml) adtunk a sejtekhez, 10 perccel a mérés megkezdése előtt. A sejtek életképességének vizsgálatára tripánkék jelölést használtunk, mely szerint a sejtek 90 %-a élő volt. Az elektrofiziológiai mérésekhez a sejteket Ringer-típusú fizioiógias oldatban vettük fel. A Kit-225 K6 egy humán T-limfóma sejtvonal helper fenotípussal. Osztódásához IL-2 ligand rendszeres adása szükséges. A sejteket RPMI-1640 médiumban tenyésztettük, amely 10 % fetal calf serum-ot, penicillint és streptomycin-t tartalmazott. A sejtekhez 20 egység/ml rekombináns IL-2 ligandot adtunk 48 óránként.

3.3. Elektrofiziológia

A patch-clamp méréseket feszültség-zár üzemmódban, teljes-sejt konfigurációban végeztük, Axopatch-200-A patch-clamp erősítővel, melyet összekötöttünk egy Digidata 1200 számítógépes interfésszel (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). A mintavétel során aluláteresztő szűrést használtunk, a mintavételezési frekvencia felénél. A patch-elektrodák ellenállása 3-4 Mohm volt, amelyet GC150 F-15 boroszilikát üvegapillárisokból gyártottunk (Clark Electromedical Instruments, Reading, UK). A pipettákat KF alapú intracelluláris oldattal töltöttük meg, melynek összetétele 140 mM KF, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 11 mM EGTA és 10 mM HEPES volt, pH 7.22. A sejteket Normál Ringer (NR) oldatot tartalmazó petri-csészében mértük, a NR tartalma: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 5.5 mM glükóz, pH 7.35. Az oldatok mért ozmolaritása 320 mOsm volt. 1-10 Gohm nagyságrendű nagy kontaktusú ellenállást alakítottunk ki a sejten, a patch-

pipetta belsejére irányuló szívás alkalmazásával. Ezt követően teljes-sejt konfigurációt hoztunk létre szívás-impulzusok alkalmazásával. A kísérletek döntő részében a szivárgási áram elhanyagolható volt a sejten mérhető K^+ -áramokhoz képest. A soros ellenállás 3-10 Mohm volt, kompenzációként 80 % korrekciót és 40 % predikciót alkalmaztunk. Minden patch-clamp mérés 20 °C-on történt. Az árammérési protokollokat legalább 12 perccel a teljes-sejt konfiguráció kialakítása után indítottuk. A patch-clamp kísérletek kezdetéig a sejteket jégen tartottuk, így több órán keresztül változatlanok maradtak az azokon mérhető K^+ -csatornák tulajdonságai. Az adenzin-receptor ligandokat a NR-ben oldottuk, majd folyamatos áramlási rendszerrel juttattuk a sejtekhez, szelepek felhasználásával.

A patch-clamp adatok értékelését a pClamp8 programcsomag segítségével végeztük (Axon Instruments, Inc.). Az aktivációs és inaktivációs időállandókat egy illesztőrutinnal határoztuk meg, a Levenberg-Marquard keresési módszerrel, egy minimalizációs módszerrel, a legkisebb négyzetek módszerének alkalmazásával. Minden kísérletet legalább háromszor végeztünk el. Az adatokat átlag \pm SD alakban számoltuk, amelyeket n független kísérlet felhasználásával kaptunk.

3.4. A membránpotenciál áramlási citometriás mérése

Az áramlási citometriás membránpotenciál-méréseket a negatívan töltött oxonol festék használatával végeztük, amely a membrán két oldala között a Nernst-egyenletnek megfelelően oszlik meg. A kísérletben a [140]-ben leírt protokollt használtuk, amely a membránpotenciál meghatározását teszi lehetővé millivoltos pontossággal, ahol a depolarizált és az érdeklődésre számot tartó állapotban lévő sejtek fluoreszcenciáját olvassuk le. A mérésekhez egy módosított, argon-ion lézerrel ellátott FACSTAR áramlási citométert

használtunk (Becton Dickinson, Parsippany, NJ, USA). Az oxonol festék fluoreszcenciáját 488 nm-es vonallal gerjesztettük 200-400 mW teljesítménnyel. A kimeneti optika része volt egy 520 nm-es felülateresztő szűrő a szórt gerjesztő fény kiszűrésére, és egy 540 nm-es sávszűrő. A kis szögben előreszórt fényt az adatgyűjtés során elektronikus kapuzásra használtuk, amely lehetővé tette az elpusztult sejtek kiszűrését az analízisre kerülő sejtek halmazából. A sejteket $10^6/\text{ml}$ koncentrációban, szobahőmérsékleten futtattuk. A fluoreszcencia-hisztogram mérését a festődés egyensúlyának kialakulását követően kezdtük el, mely 2 percet vett igénybe. A sejtfluoreszcencia ligand-indukált változását 3-5 perccel a megfelelő ligand adását követően mértük, ennyi időre volt szükség az új egyensúly eléréséhez. A másodjára adott ligand módosító hatásának vizsgálatára a ligandot a másodjára kialakult egyensúly beállta után adtuk a festett sejtszuszpenzióhoz. Minden ilyen kísérletet legalább háromszor ismételtünk.

3.5. A kontraktilitásváltozás számszerű jellemzése

A mechanikai aktivitásban bekövetkező, adenzin-receptor-ligandok által indukált csökkenést a kontraktilis erőben bekövetkező százalékos csökkenésként adtuk meg (pitvari szívizomzat, aorta és tüdőartéria az A_1 adenzin-receptorok blokkolását követően). A kontrakciót a tónusnak a ligand adása előtti helyzethez képest bekövetkező növekményeként határoztuk meg és mN/mm^2 egységekben fejeztük ki. A $E/[A]$ görbe pontjait az egyedi adatok illesztésével határoztuk meg, a legkisebb négyzetek módszerét használó iteratív számítógép program segítségével, a következő alakú függvénnyel illetve: $E = E_{\text{max}} [A]_{\text{H}}^n / ([A]_{\text{H}}^n + [\text{EC50}]_{\text{H}}^n)$, ahol E jelöli a hatást, E_{max} az aszimptóta, $[A]$ a ligand koncentrációja, EC50 az a koncentráció, amely a maximális hatás felét idézi elő, és n_{H} a görbe közepéhez tartozó meredekség (Hill-koefficiens). Bizonyos esetekben, ahol meg lehetett tenni, lineáris regressziós analízist

végeztünk, hogy meghatározzuk az EC_{25} értékeket (EC_{25} : az a ligand-koncentráció, amely 25 %-os relaxációt indukál). Az EC_{50} értékeket negatív tízes alapú logaritmusokkal fejeztük ki az egész szövegben. A populációk közötti különbségek statisztikai analízisét a t-próba alkalmazásával vizsgáltuk, 0.05-ös szignifikanciaszint alkalmazásával.

3.6. Kísérleti állatok

Az adenzin-receptorok által közvetített jelátviteli folyamatok vizsgálatát célzó kísérletekhez hímnemű Hartley tengerimalacokat használtunk, amelyek 420-560 g súlyúak voltak. A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Kutatásetikai Bizottságának állatokkal foglalkozó előírásai szerint végeztük.

A spermiumok motilitásával kapcsolatos kísérletek során használt hímnemű közönséges pontyokat (*Cyprinus carpio*) kereskedelmi forrásból szereztük be és 25 °C-os, beltéri akváriumban tartottuk. A napot 14 órás világos és 10 órás sötét szakaszra osztottuk. A sperma képzését testsúlykilogrammonkénti 1 mg/kg intraperitonális injekcióval adott, FPS-ben oldott, acetonban szárított agyalapi miriggyel váltottuk ki. A spermát a hasfal óvatos nyomásával gyűjtöttük be, 10-20 órával az injekció adását követően. Ügyeltünk arra, hogy a spermát a víz, illetve vizelet ne szennyezze.

A hímnemű fugukat (*Takifugu niphobles*) haltenyésztő iskolákból rendeltük, a Japánban található, Arai-Öbölben lévő Misaki Tengerbiológiai Állomásról, június végétől július végéig, és 18 °C-os, keringtetett tengervizet tartalmazó tartályokban tartottuk. A spermát a hal hasfalának enyhe nyomásával nyertük.

A *Ciona intestinalis* zsákállatokat a Japán Kanagawa tartományában lévő Yokohama-Öbölből és Aburatsubo-Öbölből szereztük, és egy keringtetett, tengervizet tartalmazó akváriumban tartottuk 18 °C-on, állandó megvilágítás mellett, hogy elkerüljük a spontán ívást. A burok eltávolítása és a test ollóval

történő felvágása után a petevezetékét csipesszel szűrtük ki, hogy kinyerjük a petéket.

A spermavezetékéből csipesszel nyomtuk ki az ondósejteket, és pasteur-pipettával szívtuk fel azokat. Egy egységnyi térfogatú spermát tíz egységnyi térfogatú ASW-2 oldatban hígítottunk, és a használatig jégen tartottuk. A sperma-szuszpenziót 1:1000 arányban hígítottuk a kísérletek megkezdése előtt. A sperma-motiliást SAAF-el vagy valinomycin-nel indukáltuk. Az SAAF faktort nem megtermékenyített petékből nyertünk, a [80]-ban leírtak alapján.

3.7. Izolált pitvari szívizomzat

A tengerimalacok éterrel történő altatás alatti dekapitálása után a mellkast kinyitottuk és a szívet gyorsan kivágtuk és 30 °C-os, oxigénnel átáramoltatott Krebs oldatban mostuk. A bal pitvart izoláltuk és 10 ml-es, függőleges szervfürdőbe helyeztük (TSZ-04, Experimetria, Budapest), amelyben 37 °C-os Krebs oldat volt, melynek tartalma: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.0 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgCl₂, 24.9 mM NaHCO₃, 11.5 mM glükóz, pH 7.4, és 95 % O₂ valamint 5 % CO₂-vel jellemezhető gázzal érintkezett. A pitvart elektromosan ingereltük, 3 Hz-el, 1 ms időtartamig, a küszöb feszültség kétszeresének alkalmazásával, egy programozható stimulátor segítségével (PST-02, Experimetria, Budapest). Az izometrikus összehúzódásokat egy transzducerrel mértük (SG-01D, Experimetria, Budapest) és poligráffal vettük fel (WR 3101, HSE, Hugstetten). 10 mN kezdeti, nyugalmi mechanikai feszültséggel feszítve a preparátumokat, 50 percig vártunk, és hagytuk, hogy beálljon az egyensúlyi helyzet. A kontraktilis paraméterek stabilizációját követően kumulatív NECA illetve F-NECA dózis-hatás görbéket (E/[A]) vettünk fel.

3.8. Érprenparálás

A [141]-ban leírtak alapján a tengerimalacok mellkasi aortájának és fő tüdőartériájának középső részéből körívben futó szegmenseket preparáltunk (2mm hosszúságú, endotéliummal rendelkező, nyitottra vágott gyűrűk). A szöveteket vertikálisan rögzítettük selyemszállal egy 10 ml-es, hőmérséklet-szabályozott, 37 °C-ra beállított szövetkamrában, amely Krebs-oldatot tartalmazott. A Krebs-oldat összetétele: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.0 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM MgCl₂, 24.9 mM NaHCO₃, 0.004 mM dinátrium EDTA, 0.11 mM aszkorbinsav, 11.5 mM glükóz, pH 7.4, 95 % O₂-t és 5 % CO₂-t tartalmazó gáz jelenlétében. A tüdőartériából és aortából származó ércsíkok mechanikai feszültségét izometrikusan mértük, transzducer alkalmazásával (SG-01D, Experimetria), és a kimenetet feszültségmérő és regisztráló berendezéshez kapcsoltuk (SP-K2V, Riken Denshi). A mintákra 10 mN kezdeti mechanikai feszültséget adtunk és legalább 3 óráig vártunk, hogy stabilizálódjanak ezen a mechanikai feszültség szinten. Az egyensúly elérése után a preparátumokat 1µM noradrenalinnal inkubáltuk, amíg a mechanikai feszültség egy stabil értéket fel nem vett.

Ismert, hogy az adenzin és az adenzin-analógok nem képesek kiváltani kontraktilis választ a nyugvó tüdőartéria-preparátumokban, kizárólag az előzetesen összehúzott (általában noradrenalinnal) szövetekben. A szervfürdőt ezt követően friss tápoldattal mostuk át 5-ször, 3 perces szüneteket tartva, ezután 30 percig állni hagytuk. Amikor a kontrakció stabillá vált, 10 µM NECA oldatot vezettünk a szervfürdőbe és addig vártunk, míg a maximális hatást el nem értük. A szöveteket ezután többször friss, 1 µM noradrenalint tartalmazó Krebs-oldattal mostuk és vártunk, amíg stabilizálódtak. A kísérleteket az érszövetdarabokban a NECA hatására bekövetkező, legalább két egymás utáni, stabil és reprodukálható kontraktilitásváltozás megléte után kezdtük. A tüdőartériákon a NECA és F-NECA hatásának vizsgálatára non-kumulatív

méréseket végeztünk, míg a mellkasi aortákon az adenzin-analógokkal kumulatív mérést folytattunk. A purinvegyületek hatását befolyásoló 8-PT-t a nyugalmi állapot alatt adtuk 30-40 percig, a szövetek ezt követően noradrenalinot kaptak, melynek hatására a tónus kontrollnak megfelelő szintjére húzódtak össze. A NECA és F-NECA által kiváltott, A₁-receptor-mediált kontrakciók vizsgálatára szolgáló mérések végén a szöveteket enyhén festettük és megmértük a hosszúságadataikat és a súlyukat. A preparátumok keresztmetszetét a következő képlet alapján számoltuk ki: keresztmetszet (mm²) = súly (mg) / (hosszúság (mm) x sűrűség (mg / mm³)). Az érszövet-darabkák sűrűségéről feltételeztük, hogy értéke 1.05 mg / mm³. Az adenzin-analógokra adott válaszokat ezt követően úgy számoltuk ki, hogy meghatároztuk a mechanikai erő növekedését (mN egységekben), és ezt osztottuk a szövet keresztmetszetével (mm² egység használatával).

3.9. A sperma-motilitás mérése

A fugu- illetve közönséges pontyspermából 20 µl-t 1 ml megfelelő fiziológiás oldatban hígítottunk (SLS vagy FSP) és ezt 700 g-n centrifugáltuk 5 percig. A letapadt sejteket felszuszpendáltuk 40 µl megfelelő fiziológiás oldatban. 1 µl mosott spermiumsejtet 100 µl megfelelő fiziológiás oldatban hígítottunk, amely a vizsgálandó vegyületet tartalmazta az adott koncentrációban. A kívánt inkubációs idő eltelte után 1 µl sperma-szuszpenziót cseppentettünk egy üveg-lemezre és ezt aktiváltuk a megfelelő aktiváló oldattal (ASW vagy AS), amely a vizsgált vegyületet is tartalmazta. A spermiumok mozgását nagy érzékenységű videokamerával rögzítettük (Hamamatsu 2400-07), amely egy fáziskontraszt-mikroszkóphoz volt kapcsolva (Nicon-Optiphot), amelyhez egy invertált kontraszt-objektív lencse tartozott (Olympus Splan NH). A motilis sejtek százalékos hányadát és a sebességüket a CellSoft automatizált sperma-analizáló programmal határoztuk meg (CRYO Resources, Ltd, USA). A

sebességet a spermiumokról készült, a szuszpendálásukat követő 30 percen belül készített felvételek alapján határoztuk meg. A mérést abban a kísérleti médiumban végeztük, melyben a sejtek hozzávetőleg egyenes irányú mozgást végeztek. A sebességet úgy számoltuk ki, hogy a spermiumok útvonalához tartozó távolságokat, melyeket az egymást követő képfelvételek között a sejt megtett, összeadtuk és ezt elosztottuk azon időintervallumok összegével, amelyek alatt a spermiumsejtet nyomon követtük. A sebességméréseknél négy képet vettünk fel. Abból a célból, hogy a Ca^{2+} hatását megvizsgáljuk az ép fuguk spermium-motilitására, a sperma-mintákat 50-szeresen hígítottuk NoCaSLS-ben, 30 percig inkubáltuk, és 700 g-n centrifugáltuk 5 percig. A sejteket ugyanolyan térfogatú NoCaSLS-ben újra felszuszpendáltuk. A spermiumok motilitását 5 mM EGTA-t tartalmazó AS-ben vagy NoCaAS-ben történő 40-szeres hígítást követően vizsgáltuk. A sejtek motilitását és sebességét a Cellsoft rendszerrel mértük.

3.10. A membránfluiditás mérése

A trimetilammónio-difenil-hexatrién-ből (TMA-DPH) 10^{-4} M koncentrációjú, dimetil-formamid-os törzsoldatot készítettünk. A ponty-spermát FPS-ben mostuk, 5 percig centrifugáltuk 700 g-n és FPS-ben szuszpendáltuk. A spermiumok koncentrációját 6×10^6 /ml értékre állítottuk be. 1 ml sejtuszuspenzióhoz 10 μl TMA-DPH törzsoldatot adtunk (a TMA-DPH végső koncentrációja: 10^{-6} M), és quartz-küvettában inkubáltuk 5 percig 20 μM GdCl_3 mellett vagy anélkül. 2 ml FPS-t (a sperma immotilis maradt) vagy 2 ml desztillált vizet (kiváltott sperma-motilitás) adtunk a küvettákhoz és így mértük az anizotrópiát. A hozzáadott FPS és desztillált víz ugyanolyan koncentrációban tartalmazott TMA-DPH-t vagy GdCl_3 -ot.

Az egyensúlyi anizotrópiát egy Perkin Elmer spektrofluoriméter segítségével határoztuk meg, úgy, hogy mértük a vertikálisan (I_v) és

horizontálisan (I_H) polarizált intenzitáskomponenseket. A mintát 340 nm-es vertikálisan poláros fénnel gerjesztettük, és az emissziót 430 nm felett detektáltuk. A fluoreszcencia intenzitásokat azt követően mértük, hogy a hőmérséklet a mintában beállt 25 °C-ra. Az anizotrópia r_f értékét a következőképpen számoltuk ki:

$$R_f = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2 GI_{VH})$$

ahol a v_v és v_h indexek rendre a gerjesztési és emissziós polarizátorok párhuzamos és merőleges pozícióira utalnak. A G-érték egy – a műszerre jellemző – korrekciós tényező, amely a polarizátorok és a monokromátorok tökéletlenségét jellemzi, és a következő formulával adható meg:

$$G = I_{HV} / I_{HH}$$

Az anizotrópia a TMA-DPH festék rotációs mozgását jellemzi (amely a foszfolipid kettősréteg külső felének poláros fejcsoport-régiójába épül be), és a membránfluiditással fordítva arányos. A kisebb r_f értékek nagyobb membránfluiditást jelentenek.

3.11. Kétdimenziós poliakrilamid-gél elektroforézis

5-szörös hígítású fugu-spermából 40 μ l-t adtunk 1 ml SLS-hez, 20 μ M gadolinium jelenléte mellett vagy anélkül. A spermiumokat úgy aktiváltuk, hogy 40 μ l 5 M-os NaCl oldatot adtunk a sejtszuszpenzióhoz és 15 percig állni hagytuk. A sejteket 12000 g-n történő centrifugálással gyűjtöttük össze 4 °C-on 30 percig. A felülúszó eltávolítása után a sperma-fehérjéket 500 μ l, 8 M-os urea és 1 % Triton-X alkalmazásával oldottuk. Alapos szuszpendálást követően az oldatot 12000 g-n centrifugáltuk 30 másodpercig és a tiszta felülúszót

összegyűjtöttük. 50 µl felülúszóhoz 200 µl IEF puffert adtunk, amelynek a tartalma: 8 M urea, 2 M thiourea, 10 % izopropanol, 1 % Triton X-100, 4 % CHAPS, 50 mM DTT, 0.5 % IPG-puffer, és 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A centrifugálást követően a felülúszót a csík-tartóhoz adtuk (7 cm-es, immobilizált, pH gradiens gél, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Az IPG száraz csíkok (a pH-tartományuk 3-10 között volt és lineárisan változott) tettünk a mintára buborékmentesen, és szilikonolajjal fedtük. A 4 órán át 0 V-on történő rehidratáció után 10 óráig 30 V-on elektroforetizáltunk, majd 1 óráig 200 V-on, 1 óráig 500 V-on, 1 óráig 1000 V-on és 5 óráig 8000 V-on. Az IPG-csíkokat 30 percig hagytuk állni egy SDS-PAGE minta-pufferben, amely 8 M urea-t és 50 mM DTT-t tartalmazott. Ezt követően egy második dimenzióknak megfelelő, horizontális SDS-PAGE-et alkalmaztunk, ahol a szeparáló gél 13 %-os poliakrilamid volt.

3.12. A Pi2 toxin tulajdonságai és a mérés kivitelezése

A *Pandinus imperator* mérget elkábított állatokból nyertük elektromos stimulációval. A peptid-toxin komponensek szeparálásához az oldható mérget először egy Sephadex G-50 oszlopon frakcionáltuk, azután az alfrakciókat tovább frakcionáltuk nagynyomású folyadékkromatográffal (HPLC), egy Waters 600E HPLC berendezés C18-as, fordított fázisú oszlopát használva (Vydac, Hysperia, CA). A tisztított minták homogenitását lépcsős-gradiens HPLC-vel és direkt Edman degradációval, automatikus szekvenálóberendezés felhasználásával végeztük [142]. A patch-clamp mérések során használt NR-oldathoz, melyben a Pi2 toxint oldottuk, 0.1 mg/ml szarvasmarha szérumban albumint adtunk, hogy megakadályozzuk a toxinmolekulák nonspecifikus kötődését a csövek falához és a petri-csészéhez.

A Pi2 toxin egy 38 aminosavból álló peptid, amelynek 6 pozitív töltése van, molekulásúlya $M_w = 4370$ Dalton, becsült sugara $r = 1.11$ nm, a rá vonatkozó diffúziós konstans szobahőmérsékletű, fiziológiás oldatra $D = 2 \times 10^{-6}$ cm²/s. A Pi2 toxin Kv1.3 csatornához történő kötődésének reakciókinetikai állandója, ha NR oldatban történik a kötődés, a következők adódtak: $k_{on} = 2.18 \times 10^8$ M⁻¹s⁻¹, $k_{off} = 6.33 \times 10^{-3}$ s⁻¹, $K_d = 44$ pM [142].

3.13. A Pi2 által megvalósított csatornablokkolás adatainak elemzése

A toxin-csatorna kötődés bemosási és kimosási időállandóját a mért adatok exponenciális illesztésével határoztuk meg, ezek jelölése rendre: τ_{in} és τ_{out} . A bemosási fázisra az $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau_{in}) + I_{min}$, a kimosási fázisra pedig az $I(t) = (I_{max} - I_{min}) [1 - \exp(-t/\tau_{out})] + I_{min}$ függvényt illesztettük, ahol $I(t)$ a csúcsáram értéke t idővel a toxin adását illetve eltávolítását követően, I_0 a csúcsáram értéke a toxin alkalmazása előtt, I_{min} a toxin adása után beállt egyensúlyi csúcsáram-szint, I_{max} pedig a toxin kimosását követően visszatért csúcsáram értéke [143].

3.14. Monoklonális antitestek

A transferrin-receptor (TrfR) specifikus MEM75 antitestet (IgG₁) Dr. Vaclav Horejsi (Prága, Csehország) bocsátotta rendelkezésünkre. A W6/32 (IgG_{2ak}) és L368 (IgG_{1k}) olyan monoklonális antitestek, melyek rendre az MHC I nehézláncán lévő α_2 , α_3 doménjén lévő monomorf epitóphoz, illetve az MHC I könnyűlánc β_2 -mikroglobulinjához kötődnek [144,145]. Az L243 monoklonális antitest (IgG_{2ak}) MHC II-ellenes [146]. A W6/32, L368 és L243 antitesteket Dr. Frances Brodsky-tól (UCSF, CA, USA) kaptuk. Az Interleukin-2 receptor α -alegysége (IL-2R α) elleni anti-Tac antitest (IgG_{2a}) Thomas A. Waldmann (NIH,

Bethesda, MD, USA) adta számunkra. A TS2-7.11 (IgG₁) a „Nagyon Késői Aktivációs Antigén-4” („Very Late Activation Antigen-4”, VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ integrin, CD49) elleni antitest, amelyet a Pierce Biotechnology (Rockford, Nagy-Britannia) vásároltunk. A fenti monoklonáris antitesteket hybridomafelülúszóból preparáltuk és protein A-Sepharose-on végzett affinitáskromatográfiával tisztítottuk.

3.15. Sejtek indirekt jelölése monoklonáris antitestekkel és immunogold részecskékkel a patch-clamp kísérletekhez

Az első jelölési lépés során először a frissen nyert sejteket kétszer mostuk 4 °C-os PBS-ben (pH 7.4). A sejtes csapadékot ezután 100 μ l PBS-ben felfuszpendáltuk (1×10^6 sejt/ml) és 40 percig jégen inkubáltuk 10 μ g jelöletlen teljes antitesttel (elsődleges jelölés, ehhez az antitesthez kötődik majd az anti-Fc fragmens specificitással rendelkező immunogold gömb a jelölés második szakaszában). Az antitestek esetleges aggregációjának elkerülése céljából azokat lecentrifugáltuk (9×10^4 rpm-en, 30 percig) a jelölés előtt. A jelölt sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben. Az inkubálás második lépésében 40 percig jégen inkubáltunk 30 nm átmérőjű aranygömbökhöz kötött poliklonális antitesttel (másodlagos jelölés, Aurogamig g30 a monoklonális jelöletlen teljes antitest Fc fragmense ellen, az Amersham Pharmacia, USA-tól).

3.16. Patch-clamp bemosási idő mérések az L243 monoklonáris antitesttel

A stabil teljes-sejt konfiguráció kialakítása után legalább öt depolarizáló impulzust adtunk a sejtre. Az impulzusok -120 mV-os tartófeszültségről indultak és +50 mV feszültséget adtak 20 ms ideig. Az impulzusokat 15 másodpercenként ismételtük. Miután meggyőződünk arról, hogy az áramszint

stabil, egyensúlyi értékre állt be, 30 µl L243 antitest-oldatot pipettáztunk közvetlenül a sejtre (az oldószer PBS volt). A csúcsáram értékét depolarizáló impulzusok adásával mértük, amíg az áram az alsó egyensúlyt el nem érte (3- 6 perc). Az antitest-oldat koncentrációja 2.5 mg/ml volt.

3.17. Sejtek jelölése áramlási citometriás mérésekhez

A frissen nyert sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-ben (pH 7.4), a sejtes csapadékot 100 µl PBS-ben felfuszpendáltuk (10^6 sejt/ml) és 10 µg xFITC és xTRITC-konjugált Fab-vel inkubáltuk 40 percig jégen, sötétben. Az inkubálás során az Fab-felesleg legalább 30-szorosa volt a kötési állandónak (K_d). Az Fab fragmentumokat a jelölés előtt lecentrifugáltuk, hogy elkerüljük esetleges aggregációjukat (11×10^4 g, 30 percig). A FRET-mérések előtt kiemelt figyelmet fordítottunk arra, hogy a sejteket 4 °C-os hőmérsékleten tartsuk, hogy elkerüljük a sejtfelszíni receptorok nemkívánt aggregációját és a receptor-internalizációt. A jelölt sejteket 4 °C-os PBS-el mostuk, azután pedig 1 %-os formaldehiddel fixáltuk.

3.18. Áramlási citometriás energia transzfer (FCET)

A gerjesztett donor-festéktől az akceptorral megjelölt receptor-populáció felé irányuló energia-transzfert sejtenként határoztuk meg egy módosított, kétlézeres gerjesztéssel ellátott Beckton-Dickinson FACSstar Plus áramlási citométerrel. A sejtfelszínhez kötött, xFITC- és xTRITC-konjugált Fab fragmentumok közötti energiáttranszfer hatékonyságát egy speciális szoftverrel számoltuk ki. Számos korábbi publikációban megtalálható a módszer részletes leírása [147,148,149,150,106,107]. Az energia-transzfer számolásánál figyelembe vettük mind a donor általi gerjesztésből adódó akceptor-oldali fluoreszcencia-intenzitás növekedését, mind az akceptor jelenlétéből adódó

donor-kioltást (quenching), a spektrális átfedések miatti szükséges korrekciók elvégzése után. A transzfer-hatékonyság a donor-akceptor távolság hatodik hatványával fordítottan arányos, így az energia-transzfer rendkívül érzékeny a donor-akceptor párok közötti távolság változásaira a 2-10 nm-ig terjedő távolságon belül [151]. A receptorokhoz kötött donor és akceptor közötti távolságot tükröző energiatranszfert sejtenként számítottuk és energia-transzfer hisztogramként ábrázoltuk. Ezen kívül az energiatranszfer-eloszlások középértékeit is kiszámoltuk, ezek a receptorok közötti átlagos proximitásról adnak információt. Ha a donor-akceptor távolság nagyobb, mint a 10 nm-es effektív Förster-távolság, az energia-transzfer hatékonyság gyorsan nullára esik, ezért 5 %-os hibahatáron belül nem járultunk hozzá szignifikánsan az energia-transzfer hatékonysághoz.

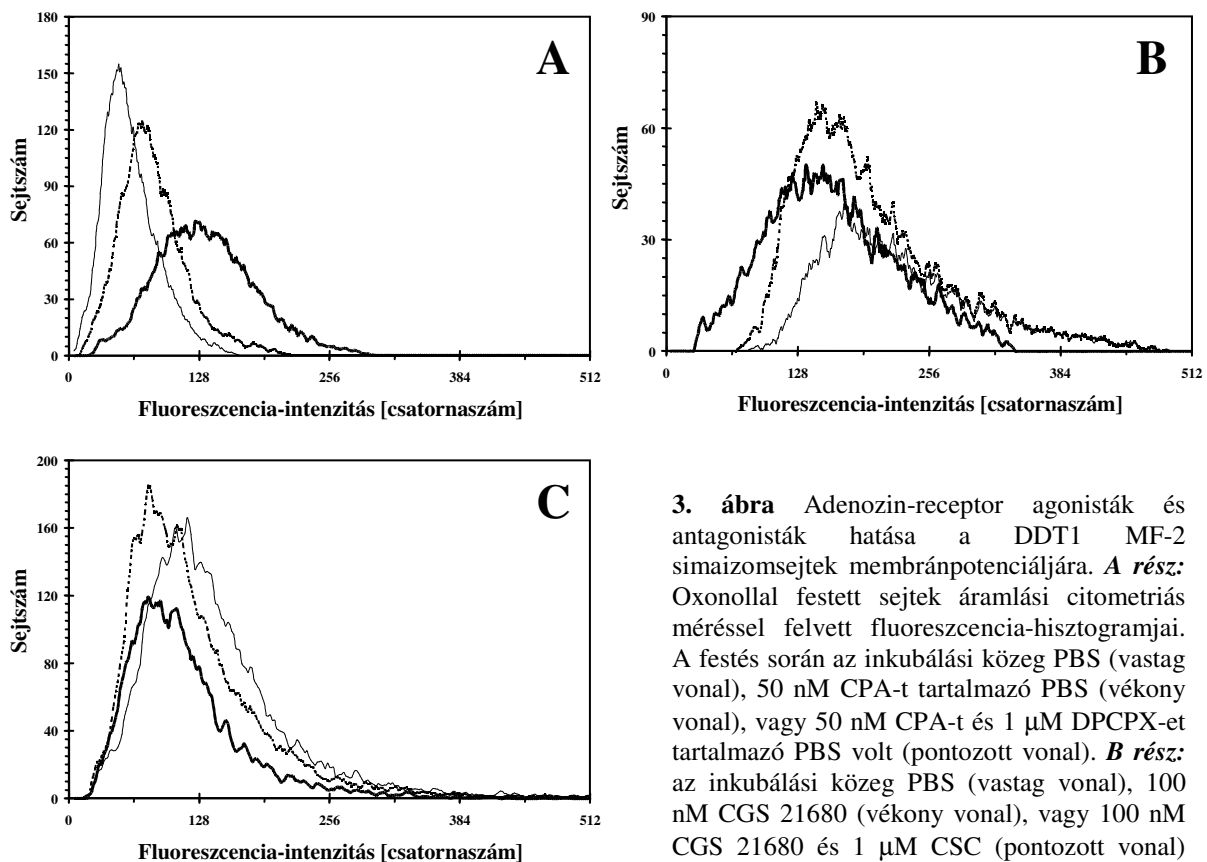
3.19. A sejt felszíni receptorok expressziós szintjének meghatározása

A sejt felszíni kötőhelyek számát az áramlási citometriás fluoreszcencia-intenzitás hisztogramok középértékeiből határoztuk meg, amelyeket olyan sejtekből nyertünk, melyekhez telítésben adtunk xFITC-konjugált, a kérdéses receptor ellenes Fab fragmenseket. A fluoreszcencia-intenzitások középértékéből a kötőhelyek számát fluoreszcens mikrogöngyökkel (QuantumTM25 Flow Cytometry Standards, San Juan, Puerto Rico) való kalibrálás útján határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. A CPA és CGS 21680 adenzin-agonisták elektrofiziológiai hatásának mérése áramlási citometriával és patch-clamp technikával

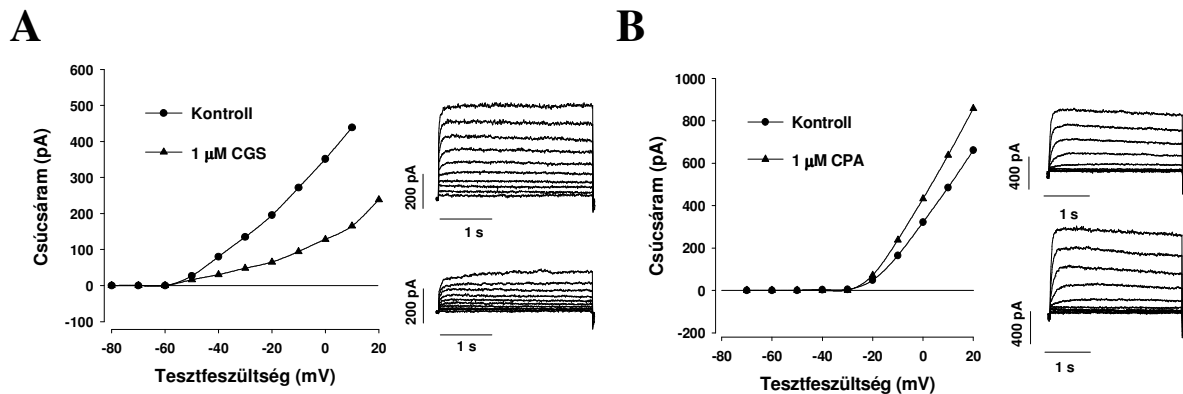
Az oxonollal – mely egy membránpotenciál-érzékeny fluoreszcens festék – végzett áramlási citometriás mérések gyorsan kialakuló és sokáig fennmaradó hiperpolarizációt jeleztek a DDT1 MF-2 sejteken 50 nM CPA hatására, amely egy nagy affinitású, szelektív A_1 adenzin-receptor agonista (**3. ábra**). A CPA hatása (3 és 10 μM között) azonnal jelentkezett és a maximális hiperpolarizáció 2 percen belül alakult ki. 1 μM DPCPX, mely egy rendkívül specifikus A_1 -receptor antagonist, szignifikánsan csökkentette az agonista által indukált hiperpolarizáló hatást.



3. ábra Adenzin-receptor agonisták és antagonisták hatása a DDT1 MF-2 simaizomsejtek membránpotenciáljára. **A rész:** Oxonollal festett sejtek áramlási citometriás méréssel felvett fluoreszcencia-hisztogramjai. A festés során az inkubálási közeg PBS (vastag vonal), 50 nM CPA-t tartalmazó PBS (vékony vonal), vagy 50 nM CPA-t és 1 μM DPCPX-et tartalmazó PBS volt (pontozott vonal). **B rész:** az inkubálási közeg PBS (vastag vonal), 100 nM CGS 21680 (vékony vonal), vagy 100 nM CGS 21680 és 1 μM CSC (pontozott vonal) volt. **C rész:** az inkubálási közeg PBS (vastag

vonallal), **C rész:** az inkubálási közeg PBS (vastag vonal), 50 nM CGS 21680 (vékony vonal), vagy 50 nM CGS 21680 és 100 nM CPA volt (pontozott vonal). Az ábrán bemutatott hisztogramok 10000 sejt mérési adatait tartalmazzák.

A sejtek előinkubálása 100 μM 4-AP-vel, mely egy feszültségfüggő káliumcsatorna-blokkoló, vagy 1 μM DPCPX-el, teljesen megszüntette a CPA membránpotenciálra gyakorolt hatását. Ezzel szemben az 5 μM Na^+/K^+ ATP-áz blokkoló ouabain-nal történő előkezelés nem változtatta meg a CPA-indukált hiperpolarizációt (nincs ábrán feltüntetve).



4. ábra Adenozin-receptor agonisták hatása a DDT1 MF-2 simaizomsejt membránjának káliumkonduktanciájára. A teljes-sejt konfigurációban mért káliumáram csúcsértékeit ábrázoltuk a tartófeszültség függvényében a kezelt és a kontroll sejtekre vonatkozóan. **A rész:** a kezelés az A_1 -agonista CPA-val történő perfúzió volt. **B rész:** a kezelés az $\text{A}_{2\text{A}}$ -agonista CGS 21680-nal történő perfúzió volt. A mérés során 1000 ms időtartamig depolarizáló impulzusokat adtunk a sejtre, melyek között 60 s idő telt el. A tartófeszültség -120 mV volt, a feszültség szintek pedig -70 mV-től $+20$ mV-ig terjedtek, 10 mV-os növekménnyel. A jobb oldali ábrarészen egy-egy kiválasztott sejtről készített felvétel látható, a görbék a különböző amplitudójú testimpulzusok hatására bekövetkező áramokat mutatják az idő függvényében. Az ábrák felső részeiben a NR extracelluláris oldattal perfundált sejt látható (kontroll), az alsó részen pedig ugyanezen sejt, miután a NR-ben oldott agonista perfúziójára váltottunk. A teljes-sejt káliumáram mérése 2 perccel a ligandok adását követően történt. A szívárgási áramot levontuk. Az ábrán 5 független mérésből kiemelt adatok láthatók.

A DDT1 MF-2 sejteken teljes-sejt konfigurációban elvégzett patch-clamp kísérletek kifelé irányuló, feszültségfüggő áramot mutattak, -75 mV megfordulási potenciállal, amely a káliumionok egyensúlyi potenciáljának felel meg. Ezt azt áramot teljes mértékben gátolni tudtuk a feszültségfüggő káliumcsatorna-blokkoló 4-AP (5 mM) vagy TEA (10 mM) perfúziójával, és ez a gátlás kimosással megszüntethető volt. A CPA alkalmazása a 10 nM-tól 10 μM -ig terjedő tartományban fokozatosan és jelentősen növelte ezt az áramot, 1 μM koncentrációnál közelítőleg 30 %-os növekedést produkálva ($n = 5$), (4.

ábra A része). Így a kálium-permeabilitásban bekövetkező változás lehet felelős azért a hiperpolarizációért, amelyet ez az A_1 -receptor agonista vált ki.

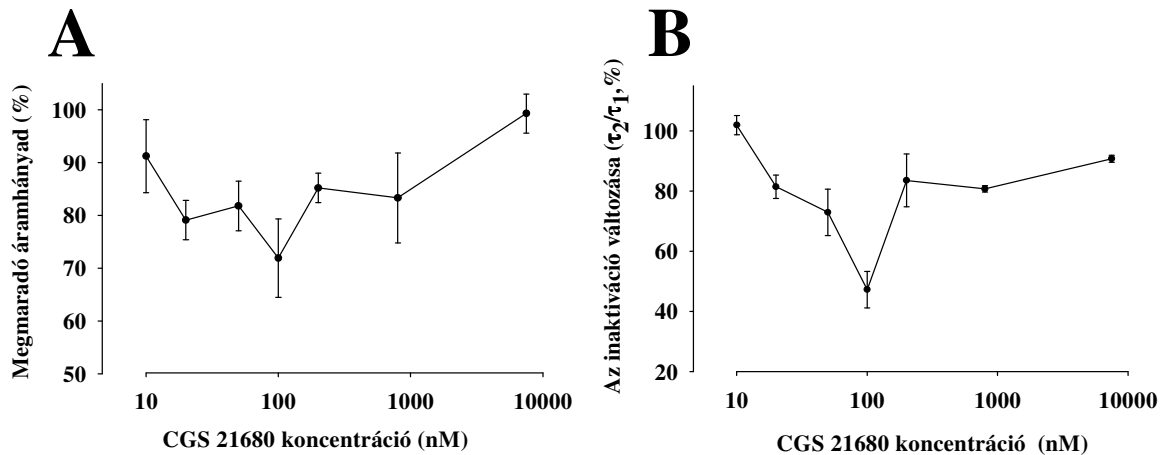
Az A_{2A} -receptor agonista CGS 21680 a 10 nM-tól 3 μ M-ig terjedő koncentráció-tartományban az A_1 -agonista CPA-val ellentétes hatást fejtett ki a DDT1 MF-2 sejtek membránpotenciáljára és káliumkonduktanciájára vonatkozóan. A CGS 21680 még olyan kis koncentrációban is, mint 50 nM, 2 percen belül jelentősen depolarizálta a sejtmembránt (**3. ábra** B része). Ha ezután 1 μ M CSC-t adtunk a sejtekhez, ez 5 percen belül repolarizációt eredményezett, és a membránpotenciál visszaált az eredeti érték közelébe. Azokon a sejteken, amelyeket előinkubáltunk xantin-típusú (CSC, 1 μ M) vagy nem xantin-típusú (ZM 241385, 1 μ M) A_{2A} adenozin-receptor antagonistákkal, nem találtunk szignifikáns CGS 21680-indukált csökkenést a transzmembránpotenciálban (nincs ábrán feltüntetve).

Emellett a CPA megszüntette a CGS 21680 által indukált depolarizációt a sejteken (**3. ábra** C része). A CPA-nak ez a tulajdonsága feltehetően abból adódik, hogy az A_1 -receptoroknak négyszer nagyobb az expressziós szintje DDT1 MF-2 sejteken az A_{2A} -receptorokhoz viszonyítva.

Amikor a patch-clamp mérések során 10 nM – 10 μ M CGS 21680-t perfundáltunk a sejtekhez, a teljes-sejt káliumáram azonnali csökkenését tapasztaltuk (n = 5). Egy jellemző feszültség/áram görbét mutatunk be a **4. ábra** B részén. A káliumcsatorna-gátlás teljes mértékben megszüntethető volt az A_{2A} agonista kimosásával.

A CGS 21680-mediált gátlás megfordíthatóságát az A_{2A} antagonistá CSC (1 μ M) által kiváltott részleges áramszintnövekedés is mutatja. A CGS 21680 káliumáram-kinetikára gyakorolt hatását a **5. ábra** mutatja. A CGS 21680 10 nM-os koncentrációban kismértékben csökkentette a káliumáram-amplitudót (**5. ábra** A része), de nem befolyásolta az áram inaktivációját. Ezzel szemben a nagyobb koncentrációban alkalmazott szer az áram inaktivációjának

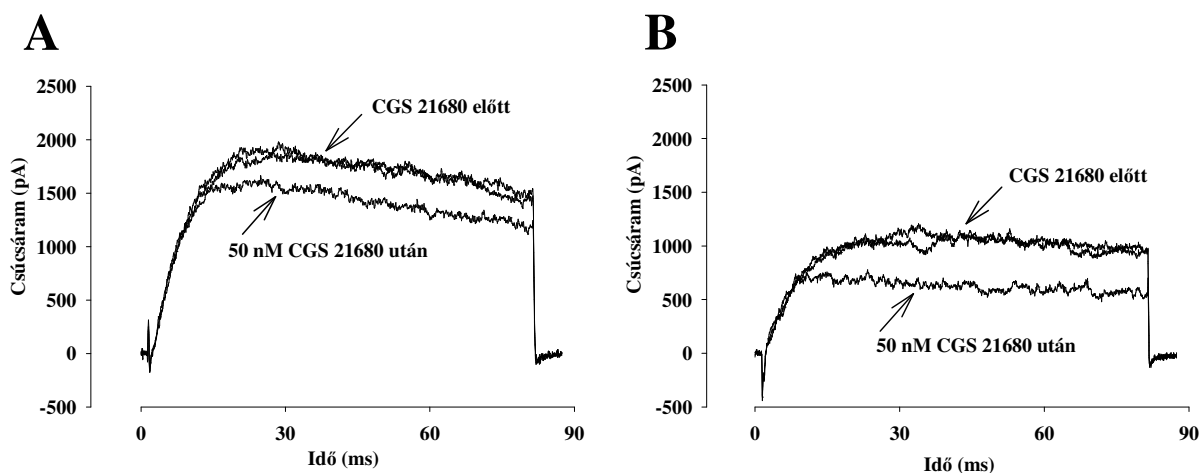
szignifikáns gyorsulásához vezetett ($n = 5$). Az inaktiváció változása a 100 nM-os CGS 21680 koncentrációnál a legkifejezettebb (**5. ábra B része**).



5. ábra Az A_{2A} agonista CGS 21680 hatása a DDT1 MF-2 simaizomsejtek membránjának káliumkonduktanciájára. A teljes-sejt káliumáram felvétele közben a sejteket először a kontroll extracelluláris NR-oldattal perfundáltuk. Amikor a K^+ -áram csúcsértéke és a kinetikája is stabilizálódott, a perfúziós rendszert átváltottuk a 10 nM és 7.5 μ M közötti koncentrációjú, NR-ben oldott CGS 21680 oldatra, és az áram új egyensúlyi értékét regisztráltuk. A CGS 21680-kezelés által előidézett változások koncentrációfüggést mutatnak, a legnagyobb hatás 100 nM-nál figyelhető meg. A fentiek érvényesek mind a csúcsáram megmaradó hányadára, melyet az **A rész** mutat, illetve az inaktiváció gyorsulására, melyet a **B rész** mutat ($n = 5$). Az áramszintek mérése a depolarizáló impuzusok adását követően történt, melyeket -120 mV-os tartófeszültségről indítottunk $+ 50$ mV-ra, időtartamuk 2 s volt és ezt 15 s-onként ismételtük. Az inaktivációs időállandókat egyexponenciális illesztéssel határoztuk meg. A hibavonalak korrigált empirikus szórásokat jelentenek.

Annak a demonstrálása céljából, hogy a káliumáram tulajdonságaiban bekövetkezett változások során a receptorok a csatornákra G-protein-független módon fejtik ki hatásukat, a kísérletet a leghatásosabb CGS 21680 koncentrációnál (100 nM) megismételtük pertussis-toxin kezelt sejteken.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a pertussis-toxin-kezelt (200 μ g / ml, 4h-ig inkubált) és a kontroll sejtek között sem a csúcsáram blokkolásában (rendre 73 ± 12 %, és 66.9 ± 8.8 %, $n=5$, **6. ábra**), sem az áram inaktivációs kinetikájának változásában (rendre 54 ± 9.7 %, és 64.8 ± 12 %, $n=5$).



6. ábra Az A_{2A} adenzin-receptor agonista CGS 21680 hatása pertussis toxin jelenlétében a DDT1 MF-2 simaizomsejtek membránjának káliumkonduktanciájára. Az ábrán a teljes-sejt káliumáram csúcsértékeit ábrázoltuk a perfúzióban a sejtekhez juttatott A_{2A} agonista CGS 21680 (50 nM) jelenlétében, feltüntetve a kontroll értékeket is. Depolarizációs impulzusokat alkalmaztunk 100 ms időtartamig, 60 s-onként, -120 mV-os tartófeszültségről $+40$ mV-ra. A kezelés előtt és után felvett, kiválasztott görbéket mutatunk be. A felső (A) grafikon a kontroll sejtekre jellemző görbéket mutatja, az alsó (B) grafikon pedig azon sejteken regisztrált áramokat, melyeket 4 óra időtartamig $200 \mu\text{M}$ pertussis-toxinnal inkubáltunk. A pertussis toxin a mérések teljes időtartama alatt jelen volt a külső oldatban. A K^+ -áram mérése 2 perccel a ligand adását követően kezdődött. Az áramértékekből kivontuk a leak-áramot. Az ábrán 5 független mérésből kiemelt adatok láthatók.

4.2. A NECA és F-NECA adenzin-származékok által kiváltott kontraktilitásváltozások vizsgálata szöveteken

4.2.1. A_1 -receptor-mediált kontraktilitásváltozások: pitvari szívmizomzat és tüdőartéria

Az elektromosan stimulált pitvari szívmizomzatban – mely egy adenzin A_1 -receptorokat tartalmazó szövet [48,141] – A NECA és az F-NECA is koncentrációfüggő módon csökkentette a kontraktilis erőt. A szövetek mérése során a NECA és F-NECA adott koncentráció-tartományát vizsgáltuk, hogy megfelelő dózis-hatás görbét készíthessünk. Amint az az **2. táblázat**ban látható, a NECA és F-NECA $E(A)$ görbéihez tartozó E_{max} és a félhatásos dózis görbemeredeksége (Hill-koefficiens, n_H) nem különbözött szignifikánsan a két vegyületre vonatkozóan, míg az F-NECA látszólagos affinitása (EC_{50}) kisebb volt, mint a NECA-é (rendre 7.50 ± 0.18 és 8.23 ± 0.12). $1 \mu\text{M}$ noradrenalin

előkezelt és így összehúzott, tengerimalac tüdőartériából származó izolált csíkokon a NECA koncentrációfüggő módon fázisos (gyorsan kialakuló kezdeti) kontrakciót idézett elő (7. ábra B része és 2. táblázat).

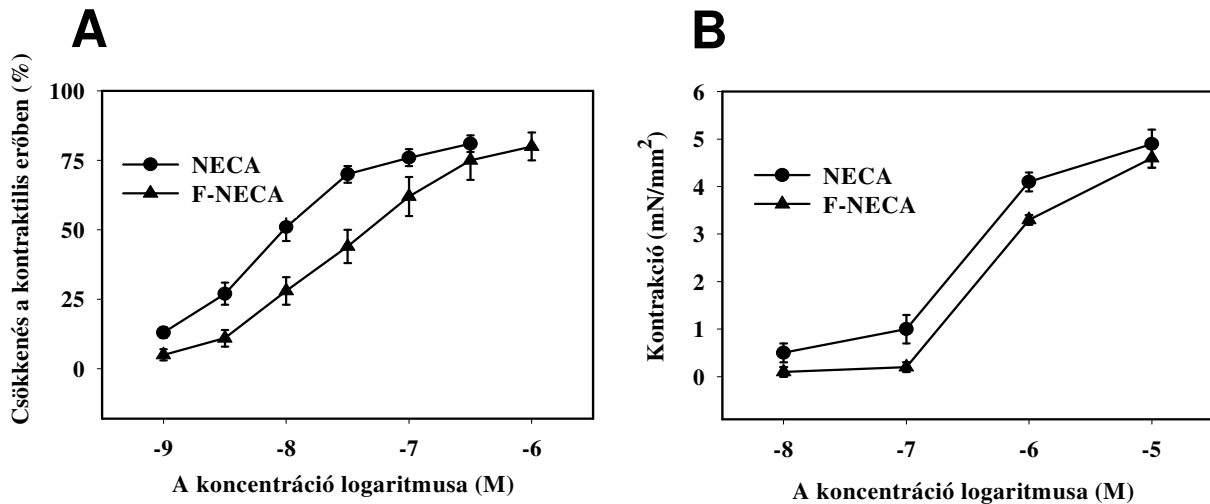
2. Táblázat

Vegyület	pD ₂	n _H	E _{max}	n
Pitvari szívizomzat (kardiodepresszív hatás: A ₁ adenosin receptor-mediált hatás)				
NECA	8.23 ± 0.12	1.04 ± 0.06	83 ± 3	5
19F-NECA	7.50 ± 0.18*	0.86 ± 0.15	87 ± 2	4
Tüdőartéria (fázisos kontrakció: A ₁ adenosin receptor-mediált hatás)				
NECA	6.58 ± 0.05	1.20 ± 0.14	5.00 ± 0.14	4
19F-NECA	6.20 ± 0.01*	1.59 ± 0.09	4.88 ± 0.15	4
Aorta (relaxáció: A _{2B} adenosin receptor-mediált hatás)				
NECA	6.58 ± 0.16	0.88 ± 0.13	87 ± 8	5
19F-NECA	6.43 ± 0.04	1.06 ± 0.03	85 ± 2	4
Tüdőartéria (gyors relaxáció DPCPX jelenlétében: A _{2B} adenosin receptor-mediált hatás)				
NECA	5.47 ± 0.16	0.64 ± 0.07	61 ± 5	6
19F-NECA	5.49 ± 0.12	0.75 ± 0.04	53 ± 3	4

pD₂: az EC₅₀ értékek negatív tízes alapú logaritmusai

n_H: a dózis-hatás görbe közepének meredeksége

E_{max}: a noradrenalin-indukált prekontrakciót követő maximális relaxáció %-os értéke (kivéve a tüdőartéria esetében, ahol az E_{max} értékek a kontrakció abszolút értékeit jelentik mN/mm² egységben).

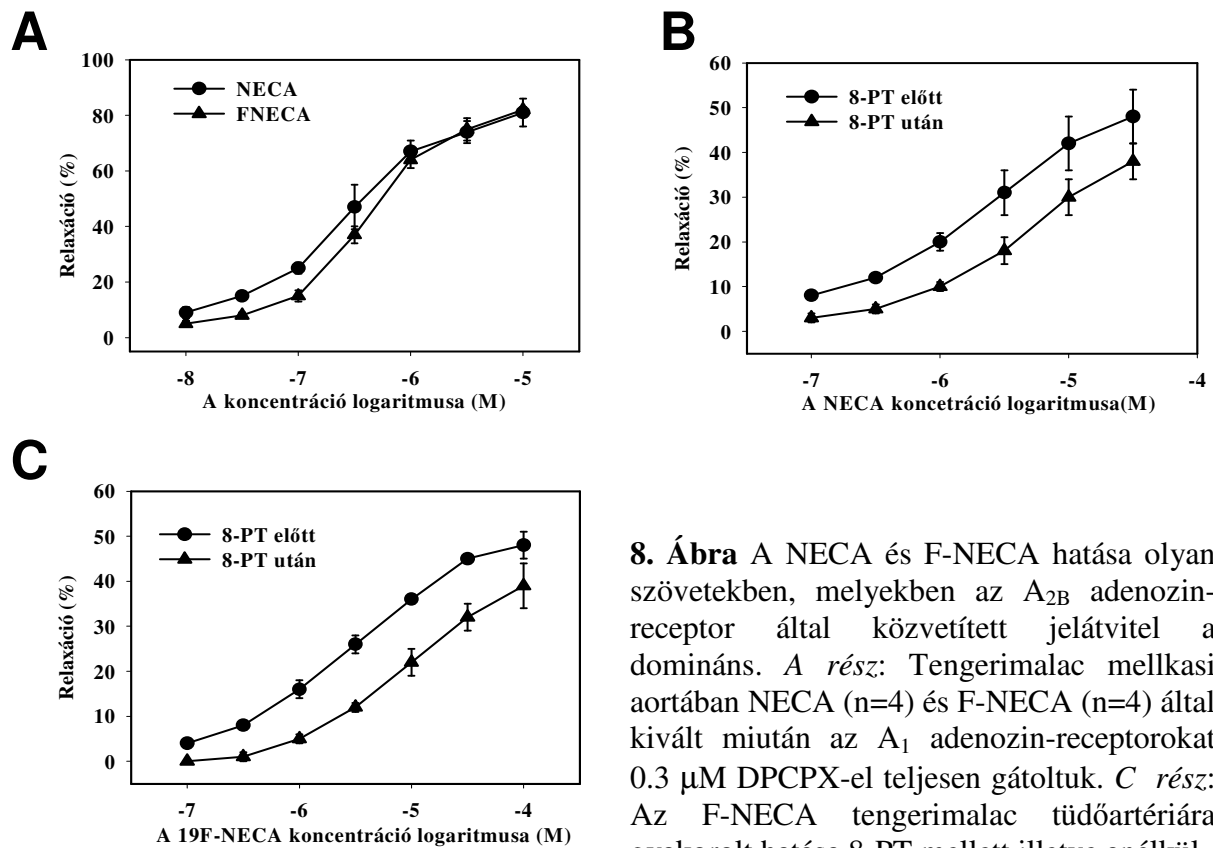


7. Ábra Adenozin A_1 receptor-mediált hatások a NECA és F-NECA különböző koncentrációban történő alkalmazásának hatására két különböző szöveten. **A rész:** A NECA (n=4) és F-NECA (n=4) kontraktilis erőt csökkentő hatása elektromosan stimulált, tengerimalacból származó pitvari szívizomzatban. **B rész:** A NECA (n=4) és F-NECA (n=4) által kiváltott kontrakció tengerimalac tüdőartériákban. A preparátumokat $1 \mu\text{M}$ noradrenalinval előzetesen összehúztuk (prekontrakció). A mechanikai feszültség agonisták által indukált növekedését az érfal-csík keresztmetszetének megfelelő területre normáltuk. Az adatokat n független kísérletből számított átlag \pm SEM értékekkel mutatjuk be (az n értékét az **2. Táblázat**ban adjuk meg).

A noradrenalin-indukált, hosszan megmaradó mechanikai feszültség 12.4 ± 2.1 mN volt. Az eredeti felvételeken látható, hogy a NECA és az F-NECA a tengerimalac tüdőartériákon nemcsak fázisos kontrakciót váltott ki, hanem tónusos (lassan kialakuló, hosszú ideig fennmaradó) kontrakciót és lassú relaxációt is. A pitvari szívizomzatnál elvégzett mérésekhez hasonlóan, az F-NECA E(A) görbéjére vonatkozó E_{max} és Hill-koefficiens értékei itt sem különböznek a NECA esetében kapott értékektől. A NECA-ra és F-NECA-ra felvett dózis-hatás görbékből számított EC_{50} értékek azonban itt is szignifikánsan különbözőnek adódtak (**2. táblázat**).

4.2.2. A_{2B} -receptor által kiváltott relaxáció: aorta és tüdőartéria

Az 1 μM noradrenalinral előkezelt és összehúzott, tengerimalac mellkasi aorta preparátumban – mely egy A_{2B} adenzin-receptort expresszáló szövet [57] – a NECA és az F-NECA is dóziszfüggő módon relaxációt váltott ki. Amint az a **8. ábra** A részén és az **2. táblázat**ban látható, a két vegyület hatása között nem találtunk szignifikáns különbséget sem az E(A)-görbékből számított maximális hatás (E_{max}), sem a Hill-koefficiens (n_{H}), sem a látszólagos affinitást jellemző E_{50} értékében.



8. Ábra A NECA és F-NECA hatása olyan szövetekben, melyekben az A_{2B} adenzin-receptor által közvetített jelátvitel a domináns. *A rész:* Tengerimalac mellkasi aortában NECA ($n=4$) és F-NECA ($n=4$) által kiváltott miután az A_1 adenzin-receptorokat 0.3 μM DPCPX-el teljesen gátoltuk. *C rész:* Az F-NECA tengerimalac tüdőartériára gyakorolt hatása 8-PT mellett illetve anélkül,

miután az A_1 adenzin-receptorokat 0.3 μM DPCPX-el teljesen gátoltuk. *C rész:* Az F-NECA tengerimalac tüdőartériára gyakorolt hatása 8-PT mellett illetve anélkül, miután az A_1 adenzin-receptorokat 0.3 μM DPCPX-el teljesen gátoltuk.

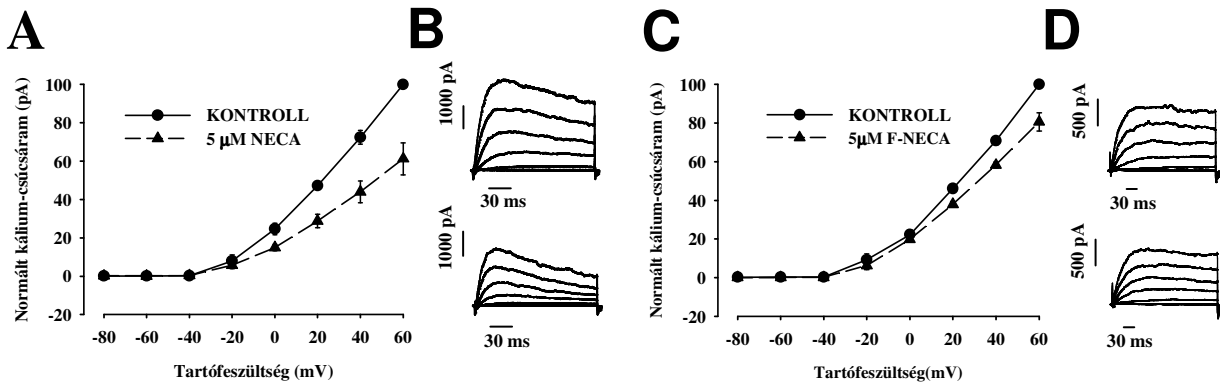
Egy másik kísérletsorozatban tengerimalac tüdőartériából származó – mely mind A_1 , mind A_{2B} adenzin-receptorokat tartalmaz [58] – mintákat

használtunk, ahol az A_1 adenzin-receptorokat DPCPX-el gátoltuk, amely egy specifikus A_1 adenzin-receptor antagonistája. Ilyen módon az A_{2B} adenzin-receptorok által indukált gyors relaxáció megbízhatóan tanulmányozható. A DPCPX alkalmazása nem befolyásolta a szövetek kontraktilitását. Tüdőartériákban, $0.3 \mu\text{M}$ DPCPX jelenlétében, non-kumulatív dózis-hatás görbéket vettünk fel a NECA, illetve F-NECA vonatkozásában. A NECA és az F-NECA hatása között nem találtunk különbséget sem az E_{max} sem a Hill-koefficiens sem az EC_{50} értékek esetében (**8. ábra** B és C része, valamint **2. táblázat**). A NECA és F-NECA metilxantin-szenzitivitásának vizsgálata céljából $1 \mu\text{M}$ 8-PT jelenlétében is felvettünk $E(A)$ görbéket (a 8-PT az adenzin-receptorok nonszelektív antagonistája). A 8-PT a NECA és F-NECA dózis-hatás görbét egyaránt jobbra tolta, és az általuk kiváltott maximális relaxáció szintén csökkent, ezek az antagonizmus kompetitív természetére utalnak. A NECA-ra és F-NECA-ra vonatkozó $E(A)$ görbék EC_{25} értékeit határoztuk meg a 8-PT hiányában és jelenlétében, majd ebből koncentráció-hányadosokat számoltunk. A NECA-ra és F-NECA-ra számított koncentráció-hányadosok rendre a következők voltak: 3.83 ± 0.69 és 4.94 ± 0.54 .

4.2.3. A NECA és F-NECA elektrofiziológiai hatása simaizomsejteken

A hörcsög vas deferens-éből származó DDT1 MF-2 simaizomsejteken mért teljes-sejt áramnak két komponense van: egy befelé irányuló, feszültségfüggő Na^+ -áram és egy kifelé irányuló, feszültségfüggő K^+ -áram. A sejtmembránra -120 mV -os tartófeszültségről -80 mV és $+70 \text{ mV}$ közötti értékekre depolarizáló tesztimpulzusokat adva, a Na^+ -áram -30 mV -nál nyitott és $+70 \text{ mV}$ -nál zárt. A K^+ -áram -20 mV -nál nyitott és nyitva maradt ettől magasabb feszültség szinteken is. A Na^+ -áram 1 ms alatt aktiválódott és 2 ms alatt inaktiválódott, míg a Na^+ -áram 80 ms alatt aktiválódott és 2 s alatt inaktiválódott. Mivel a nátriumáram hamarabb inaktiválódott, mint ahogy a

káliumáram aktiválódott, ezért lehetővé vált a káliumáram nátriumáramtól való szeparálása.



9. Ábra A NECA és F-NECA hatása a DDT-1 MF-2 simaizomsejtek káliumkonduktáciájára. A grafikonon a kapacitásra normált csúcsáram értékeit ábrázoltuk a membránpotenciál függvényében. A kezeltlen (kontroll) sejtek értékeit folytonos vonallal szemléltetjük, míg a NECA-kezelés utáni állapotot az *A rész* szaggatott vonala, az F-NECA-kezelés utáni helyzetet pedig a *C rész* szaggatott vonala mutatja. A mérés során teljes-sejt konfigurációban 30 s-onként négyszögimpulzust adtunk a sejtek membránjára 100 ms időtartamig, 20 mV-os lépcsőben -80 mV-től $+60$ mV-ig, -120 mV-os tartófeszültségről indulva. A vegyületeket a sejtekhez egy állandó, szelepek által szabályozott perfúziós rendszerrel juttatuk el. Az ábra *B-résznél* kiválasztott sejten mért áramgörbéket mutatunk be a NECA-kezelés megkezdése előtti (*B rész felső része*), illetve utáni (*B rész alsó része*) helyzetben. Az ábra *D-része* az F-NECA hatását jeleníti meg. Az adatok 3 független kísérletből számolt átlag \pm SD értékek.

A kontroll sejtek káliumáram-amplitudója 800 pA és 3000 pA között volt. A feszültségfüggő, kifelé irányuló káliumkonduktancia farmakológiai analízisét is elvégeztük, specifikus káliumcsatorna-blokkolók alkalmazásával. A nem-peptid típusú káliumcsatorna-blokkoló tetraetil-ammónium (TEA) csökkentette az áramot. Ugyanezt tapasztaltuk a két peptid-típusú gátlószer, a Charibdotoxin (ChTX) és Margatoxin (MgTx) használatakor. A félhatásos dózis (EC_{50}) értékei a gátlószerekre a következők voltak: TEA: 2.1 mM, MgTx: 43 pM, ChTx: 910 pM.

A DDT1 MF-2 sejteken a NECA- illetve F-NECA-kezelés szignifikáns mértékben csökkentette a teljes-sejt káliumáramot. A NECA elektrofiziológiai

mérések során használt koncentrációjának megválasztásakor az volt a szempont, hogy a NECA effektív agonista mind az A₁, mind az A_{2B}-receptorokon az 5 μM-os koncentrációban [41]. 5 μM NECA hatására a -120 mV-ról +40 mV-ra történő depolarizáció következtében kialakuló áram csúcsértéke az eredeti érték 61.2 ± 8.3 %-ra csökkent (n=3), míg 80.6 ± 4.7 %-ra esett, amikor az F-NECA-t használtuk. A DDT1 MF-2 sejtek káliumkonduktanciáját jellemző feszültség-áram görbe eltolódása (**9. ábra** A és B része) azt jelzi, hogy az adenoszín-származékok hatására az áram feszültségfüggetlen gátlása következik be. A grafikonok közötti különbség a NECA és F-NECA által kiváltott válaszok közötti különbséget is mutatja. A NECA-val és F-NECA-val történő perfúziós kezelés szignifikánsan gyorsította a membránáram inaktivációját is, amint az a **9. ábra** C és D részén látható. Ennek megfelelően az exponenciális illesztésből számolt inaktivációs időállandó az eredeti érték 55.1 ± 18.0 %-ára csökkent 5 μM NECA hatására, míg 5 μM F-NECA-nak kisebb hatása volt, az időállandót a kontroll 80.1 ± 15.3 %-ára csökkentve. A két származék különbözőképpen befolyásolta az áram aktivációs időállandóját is: míg 5 μM NECA 73.9 ± 10.0 %-ra történő csökkenést váltott ki, 5 μM F-NECA nem eredményezett szignifikáns változást, az eredeti szint 104.6 ± 1.8 %-ára állítva az időkonstanst.

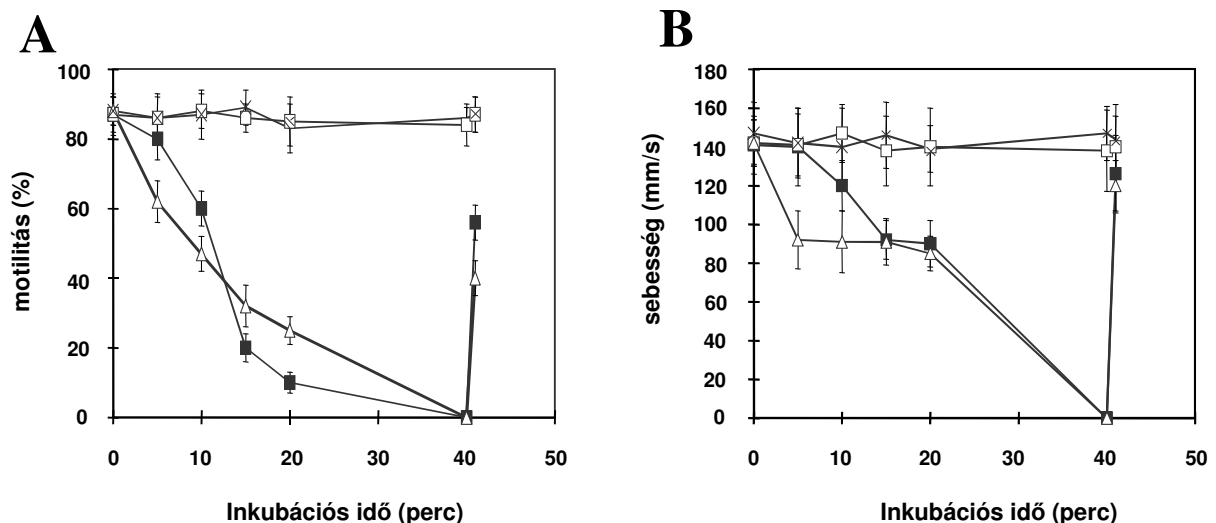
4.3. Mechanikai feszülés-aktivált csatornák szerepének vizsgálata spermiumok aktivációs folyamataiban

4.3.1. A fugu hal (Takifugu niphobles) spermájának motilitása

A fugu hal spermiumai immotilisak voltak az SLS illetve NoCaSLS oldatokban. Hipertóniás oldatokba juttatásukat követően motilissá váltak. A motilitásvizsgálatkor ASW- vagy NoCaASW-oldatot használtunk. A fugu halak spermiumsejtjei 90.6 ± 2.0 % motilitást mutattak, 163.2 ± 5.35 μm/s

sebességgel, amikor ASW-ben vettük fel azokat. Nem volt szignifikáns különbség sem a motilis hányadban ($87.6 \pm 3.1 \%$), sem a sebességben ($149.7 \pm 7.3 \mu\text{m/s}$), amikor a spermiumokat NoCaASW-ben vettük fel ASW helyett, amely azt jelzi, hogy extracelluláris Ca^{2+} nem szükséges a motilitás kiváltásához.

Az intracelluláris Ca^{2+} kionása a spermiumokból $10 \mu\text{M}$ A231186 kalcium-ionofór-t tartalmazó NoCaSLS oldatban 40 percen át történő inkubálással a motilitás teljes gátlását eredményezte. $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} adását követően a sejtek ismét mozogni kezdtek, és a sebességértékek megközelítették a kontroll értékeit (**10. ábra**).



10. ábra Az intracelluláris kalcium kionásának hatása a fugu hal spermájának motilitására. A spermiumokat NoCaSLS-ben (x), $10 \mu\text{M}$ A231186-ot (tömör négyzetek), $20 \mu\text{M}$ thapsigargin-t (nyitott négyzetek), vagy $20 \mu\text{M}$ thapsigargin-t és $10 \mu\text{M}$ A231186-ot (nyitott háromszög) tartalmazó NoCaSLS-ben mostuk és vettük fel. A motilitást (A) és sebességet (B) a NoCaASW-vel történő aktivációt követően mértük. 40 perc eltelte után az extracelluláris szabad kalciumion-koncentrációt $100 \mu\text{M}$ -ra változtattuk, és mértük a spermiumok motilitását és sebességét. A vegyületek összetétele az aktiváló oldatban és az inkubáló médiumban megegyezett. Az adatok négy független kísérlet átlagát és korrigált empirikus szórását mutatják.

Amikor a spermiumokat $20 \mu\text{M}$ intracelluláris Ca^{2+} -mobilizáló thapsigargin-t tartalmazó NoCaSLS-ben inkubáltuk, azt követően pedig NoCaASW-ben vettük fel, amely ugyanolyan koncentrációban tartalmazott

thapsigargin-t, a a sejtek mozogni kezdtek, és a motilitás aránya és sebességértékek az ASW-ben aktivált spermiumoknál mért értékekhez hasonlóak voltak. Amikor a sejteket 20 μM thapsigargin-t és 10 μM A231186-ot tartalmazó NoCaSLS-ben inkubáltuk, ez az intracelluláris Ca^{2+} -ot kivonta a sejtekből, ami a motilitás teljes gátlásához vezetett. Extracelluláris Ca^{2+} adása a kontroll értékek szintjére állította vissza mind a motilitásra mind a sebességre vonatkozó paramétereket (**10. ábra**). Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a fugu hal spermiumsejtjenek motilissá válásához intracelluláris kalcium megléte szükséges. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció hatását a fugu hal sperma motilitására 10 μM A231186 alkalmazásával (az extra- és intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációk kiegyenlítése céljából) és az extracelluláris oldat Ca^{2+} -koncentrációjának különböző értékekre történő beállításával (1 μM -tól 3 mM-ig) kívántuk részletesebben vizsgálni.

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedése nem váltotta ki a spermiumok motilitását, amikor a sejtek izotóniás SLS-ben voltak, és a fenti Ca^{2+} -koncentrációrtartományt és Ca^{2+} -ionofórt használtuk. Amikor azonban az intracelluláris Ca^{2+} -ot az 1 és 100 μM közötti tartományba állítottuk be, és után ASW-vel aktiváltunk, amely ugyanolyan koncentrációban tartalmazott Ca^{2+} -ot, a sperma-motilitás az eddiekhez hasonlóan megindult. Ezek szerint az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációban történő növekedés önmagában nem volt szignifikáns hatással a fugu hal spermájának motilitására és sebességére. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a környezet ozmolaritásának a változása az elsődleges lépés, ami a fugu spermiumok aktiválódását kiváltja, míg az intracelluláris Ca^{2+} szint eltolódása az aktivációhoz vezető folyamat része.

A kalmodulin szerepét is meg kívántuk vizsgálni a fugu spermiumai motilissá válásában, ezért a W-7 kalmodulin-antagonistát és annak inaktív analógját, a W-5-öt használtuk. A W-7 gátolja a Ca^{2+} -kalmodulin aktivált foszfodiészterázt, és a miozin könnyűlánc kinázt. Amikor 200 μM W-5-tel előinkubáltuk a sejteket, majd ugyanilyen koncentrációjú W-5-öt tartalmazó

ASW oldatban vettük fel a sejteket, a spermiumok motilitását ugyanúgy ki lehetett váltani, mint a kontroll esetben (W-5 nélkül). Ezzel szemben 100 μM W-7 alkalmazása 10 perc alatt a kontroll értékének 8 ± 3 %-ra csökkentette a motilitást.

A Ca^{2+} -kalmodulin függő protein-kináz II szelektív gátlószere, a KN-93, 50 μM -os koncentrációban teljes mértékben gátolta az ASW által kiváltott spermium-motilitást, viszont a KN-92, amely egy kevésbé hatékony analóg, csak a kontroll érték 40 ± 7 %-ára csökkentette a motilitást, 10 perces inkubálást követően.

A trifluoperazin (TFP), amely gátolja a 3':5'-ciklikus nukleotid foszfodiészteráz kalmodulin-függő stimulációját, dózis- és inkubációs idő-függő módon csökkentette a spermiumok motilitását és sebességét is. 10 perces inkubálást követően 100 μM TFP 35 ± 3 %-ára csökkentette a motilitást és 132 ± 11 $\mu\text{m/s}$ -ra a sebességet, míg 200 μM TFP a motilitást 3 ± 1 %-ra, a sebességet pedig 75 ± 8 $\mu\text{m/s}$ -ra csökkentette. 100 μM TFP-vel történő 20 perces inkubálás a sperma-motilitás teljes blokkolását eredményezte. A kalmodulin-inhibítorok hatása megfordítható volt.

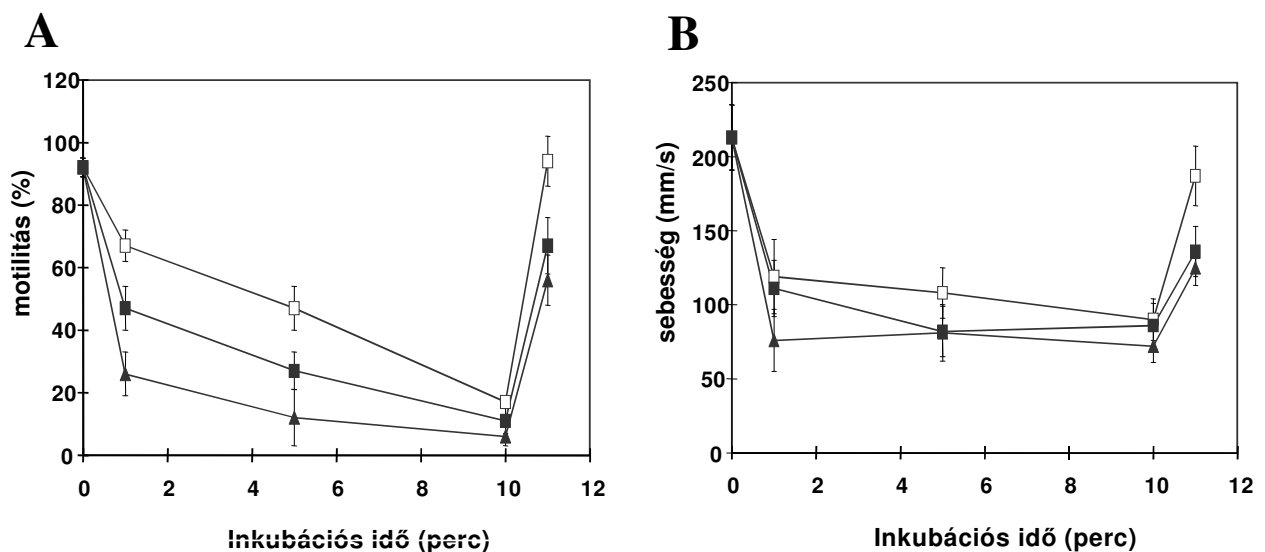
Az Alomone Labs (Izrael) által forgalmazott, 21 káliumcsatorna-blokkolót tartalmazó Econokit EK-300 gátlószerei közül csak a Penitrem A (10 μM , 15 perc inkubálás) csökkentette a fugu spermiumainak motilitását és sebességét (rendre 43 ± 12 % és 123 ± 16 $\mu\text{m/s}$). A többi 20 káliumcsatorna-blokkoló közül egy sem volt szignifikáns hatással a spermiumok motilitására és sebességére. Hasonló eredményeket kaptunk kalciumcsatorna-blokkolók alkalmazásával. Az Alomone Labs által forgalmazott kalciumcsatorna-blokkoló Econokit EK-400 gátlószereinek hatását is teszteltük a fugu spermiumok motilitására és sebességére vonatkozóan. A javasolt koncentrációk mellett egyik sem befolyásolta jelentősen a spermiumok motilitását vagy sebességét, az előbbi 68 ± 7 % és 92 ± 3 % között mozgott, az utóbbi pedig 127 ± 7 $\mu\text{m/s}$ és 163 ± 14

$\mu\text{m/s}$ közöttinek adódott. A kloridcsatorna-blokkoló chlorotoxin sem fejtett ki hatást $25 \mu\text{M}$ koncentrációban.

4.3.2. Gadolinium hatása a fugu hal, közönséges ponty, és *Ciona intestinalis* zsákállat spermájának motilitására és sebességére

A gadolinium klorid egy hatékony és széles körben alkalmazott feszülés-aktivált ioncsatorna-blokkoló. Ennek hatását vizsgáltuk két tengeri élőlény, a fugu hal és a zsákállat *Ciona intestinalis*, valamint az édesvízi közönséges ponty spermiumai mozgékonyására.

A gadolinium hatása a fugu spermiumának motilitására és a motilitás sebességére a **11. ábrán** látható.

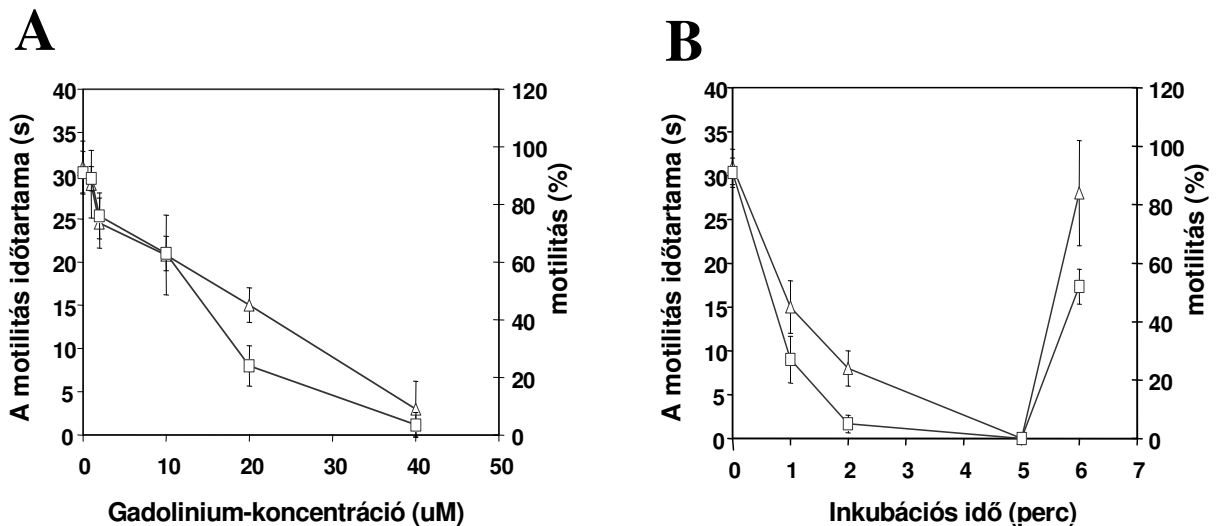


11. Ábra Gadolinium hatása a fugu hal sperma motilitására (A) és sebességére (B). A spermiumsejteket $5 \mu\text{M}$ (nyitott négyzet), $10 \mu\text{M}$ (tömör négyzet) vagy $20 \mu\text{M}$ (tömör háromszög) GdCl_3 -ot tartalmazó SLS-oldatban mostuk és inkubáltuk. A GdCl_3 -ot ugyanolyan koncentrációban tartalmazó ASW-oldattal történő aktivációt követően került sor a motilitás (A) és a sebesség (B) mérésére. 10 perces inkubációt követően az oldatokat 10-szeresére hígítottuk ASW-vel, és megmértük a spermiumsejtek motilitását és sebességét. Az adatok négy független kísérlet átlagát és korrigált empirikus szórását jelentik.

A kontroll sperma 92 ± 3 %-os motilitást mutatott. Az 5 , 10 és $20 \mu\text{M}$ koncentrációban alkalmazott gadolinium rendre 17 ± 9 , 11 ± 4 és 6 ± 3 %-ra

csökkentette a motilitást (**11. ábra** A része). A gadolinium sperma-motilitásra gyakorolt hatása reverzibilis volt. A gadolinium a fugu hal spermiumsejtjeinek sebességét dózis- és inkubációs idő-függő módon csökkentette (**11. ábra** B része).

A gadolinium a ponty-sperma motilitást dóziszfüggő módon csökkentette (**12. ábra** A része). A motilitás a kontroll érték negyedrésszére csökkent, miután a spermiumokat 1 percreg inkubáltuk 20 μM gadoliniumot tartalmazó FPS-ben, és 3 %-ára esett vissza, amikor 40 μM -os gadolinium-koncentrációt alkalmaztunk. A mozgékony sejtek arányának és a mozgékonyság időtartamának inkubációs időtől való függése 20 μM gadolinium-koncentráció mellett a **12. ábra** B részén látható. 5 perces inkubálás 20 μM gadoliniumot tartalmazó FPS-ben teljes mértékben gátolta a ponty-sperma motilitást. Az FPS-sel történő 10-szeres hígítás hatására a spermiumok motilis hányada 52 ± 6 %-ra, a motilitás időtartama pedig 28 ± 6 s-ra tért vissza (**12. ábra** B része).



12. ábra Gadolinium hatása ponty-sperma motilitására (**A**) és a motilitás időtartamára (**B**). A közönséges ponty spermiumsejtjeit mostuk, majd 1 percreg inkubáltuk FPS-ben, amely különböző koncentrációban tartalmazott GdCl_3 -ot. Ezt követően meghatároztuk a motilitás arányát (*üres négyzet*), és a motilitás időtartamát (*üres háromszög*) (A). A közönséges pontyból származó sperma-mintákat 20 μM gadolinium jelenlétében inkubáltuk, és mértük a vegyület motilitásra (*üres négyzet*) és a motilitás időtartamára (*üres háromszög*) gyakorolt hatását az idő függvényében (B). Az aktiváló oldat (AS) ugyanolyan koncentrációban tartalmazott GdCl_3 -ot, mint az előinkubálásra használt médium. 10 perces inkubálást követően az oldatokat AS-sel 10-szeresére hígítottuk, és megmértük a spermiumsejtek motilitását és sebességét. Az adatok négy független kísérlet átlagát és szórását jelentik.

A zsákállat *Ciona intestinalis* spermiumsejtjei tengervízben nyugalomban vannak. A spermiumok motilitását ki lehet váltani SAAF adásával vagy a kálium-ionofór valinomycin alkalmazásával [152]. Nem találtunk szignifikáns különbséget a 20 illetve a 40 μM -os gadolinium-kezelés hatása között még 30 perc inkubálási idő eltelte után sem, miután SAAF-el vagy valinomycin-nel aktiváltunk *Ciona* spermát.

4.3.3. Membránfluiditás-mérések

A nyugalomban levő, motilis illetve gadolinium-kezelt (40 μM GdCl_3) ponty-sperma-minták membránfluiditását is megmértük. Az eredményeket a **3. táblázat**ban foglaltuk össze. A TMA-DPH-val jelölt, nyugalomban levő spermiumok fluoreszcencia anizotrópia-értéke 0.242 ± 0.02 -nek adódott. A hypoozmotikus kezelés –amely a sperma-motilitást is indukálja- megnövelte a membránfluiditást (mért anizotrópia-érték: 0.182 ± 0.02). A gadolinium-kezelés mind a nyugvó, mind a hypoozmotikus kezelésnek kitett sejtek membránját rigidizálta (**3. táblázat**). Az r_f értékekben talált különbségek statisztikusan szignifikánsak $p = 0.01$ szignifikanciaszinten.

3. Táblázat A GdCl_3 és a hipoozmotikus kezelés módosítja a ponty-sperma membránfluiditását*

Kezelés	r_f érték	Megjegyzés	Motilitás
FPS kontroll	0.242 ± 0.02	Kontroll fluiditás	Immotilis
FPS + 40 μM GdCl_3	0.312 ± 0.02	Rigidebb	Immotilis
Hipoozmotikus kontroll	0.182 ± 0.02	Fluidabb	Motilis
40 mM GdCl_3 + hipotóniás	0.238 ± 0.03	A kontrollhoz hasonló	Immotilis

*A membránfluiditást TMA-DPH-val mértük 40 μM GdCl_3 jelenlétében és hiányában. Az adatok 3 független kísérletből számolt átlagot és szórást jelentenek.

4.3.4. A gadolinium gátolja bizonyos sperma-proteineknek az aktivációval együtt bekövetkező, izoelektromos pontbeli eltolódását

A fugu hal sperma-motilitás gadolinium-függő gátlási mechanizmusának elemzése céljából spermából kivont fehérjéket elemeztünk kétdimenziós poliakrilamid-gél elektroforézissel. A vizsgálatokat az aktiváció előtti és utáni állapotban levő mintákon végeztük el, illetve olyan mintán, melynek az aktivációját meggátolta a gadolinium. A mintákat először izoelektromos fókuszálással szeparáltuk, majd SDS-PAGE-et végeztünk. A sperma-proteinek körülbelül 200 pontra oszlottak, melyekből 4-nek az izoelektromos pontja változott meg a sperma-motilitás aktivációját követően. Az 1-es (54 kDa), 3-as (18 kDa) és 4-es (15 kDa) pontok izoelektromos pontja lúgos irányba tolódott el a spermiumok aktivációjának hatására, míg a 2-es pont (20 kDa) a savas irányba mozdult. Az 1-es, 3-as és 4-es pontok mindegyikének az izoelektromos pontja megváltozott a gadolinium által gátolt spermában, hasonlóan az aktivált spermáknál tapasztaltakhoz. Azonban a 2-es pont izoelektromos pontjának a motilitás aktivációjával járó változását teljesen gátolta 20 μ M gadolinium.

4.4. Receptorok proximitásának vizsgálata a sztérikus kötődés jelenségének felhasználásával

4.4.1. A sztérikusan gátolt toxin-kötődés elmélete

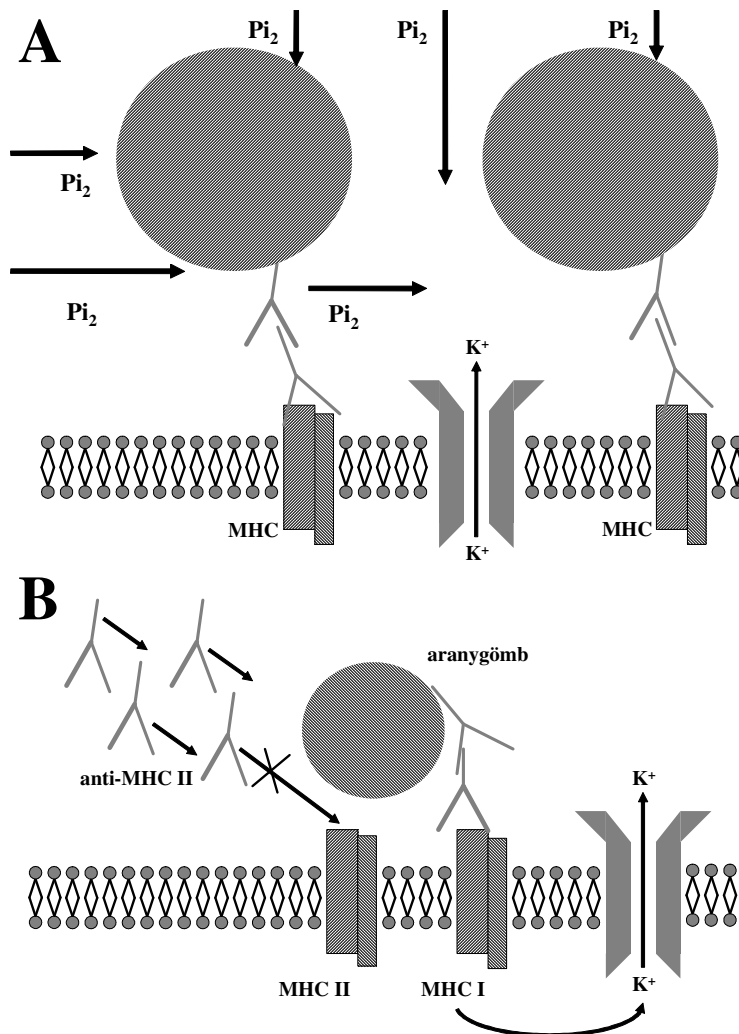
A sejtfelszíni csatornák közvetlen kimutatását nagyban nehezíti, ha rendkívül kis számban vannak jelen a membránban. Humán T-limfociták Kv1.3 csatornáira ez a helyzet áll fenn, az általunk használt Kit 225 K6 T-limfóma sejtvonalon 500-1000 Kv1.3 csatorna található (a becslésnél felhasználtuk, hogy +50 mV-os depolarizáció hatására ilyen sejteken 2-4 pA egyedi csatornaáram

indukálódik). A fluoreszcens monoklonáris antitestek illetve specifikus toxinok ugyan rendelkezésre állnak, de csak az újszerű és még kevésbé elterjedt egyedi fluoreszcens detektálási módszerekkel lehet velük mérni, amely nagymértékben specializált berendezést és technikai szakértelmet kíván [153].

Ezen kívül a rendelkezésre álló monoklonáris antitestek a csatornák intracelluláris részéhez kötődnek, és így ezeket használva csak transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) lehet mérni, élettelen körülmények között. A fluoreszcens festékekkel konjugált toxintól származó specifikus jelet általában eltorzítja a nagy háttér, amely a nonspecifikus toxin-kötődés eredménye. Ezért egy alternatív technikát kerestünk, amellyel olyan, a csatornákra specifikus jeleket tudunk detektálni, melyek korrelációt mutatnak a csatorna-receptor távolsággal. Megközelítésünkben kombináltuk a sejtfelszíni receptorok specifikus immunogold jelölési technikáját az elektrofiziológiai (patch-clamp) detektálási módszerek nagy érzékenységgel. A főbb feltevéseink a következők: (1) a csatornához történő toxin-kötődést modulálni lehet olyan arany nanogömbökkel, amelyek szoros közelségben lévő receptorokhoz vannak kötve és (2) a toxin koncentrációjában bekövetkező ugrást (concentration jump) követő toxin-kötődés kinetikáját jellemző relaxációs idők mérésével (bemosási és kimosási idők) ezt a modulációt ki lehet mutatni [143,142].

Ezektől a kísérletektől azért vártunk sikert, mert korábban már megfigyeltük (TEM-el, konfokális fluoreszcens mikroszkópiával és fluoreszcencia energia-transzfer mérésekkel) a vizsgált receptorok többségének nagyfokú homoasszociációját, és ez felvetette a lehetőségét kiterjedt kétdimenziós arany-szigetek létrehozását a sejtfelszínen [108]. Azért választottuk a Pandinus imperator skorpió-toxin Pi2 frakcióját a csatornablokkoló szerek közül, mert a Kv1.3 csatornához történő kötődésének tulajdonságait jól leírták, ez a kötődés nagy affinitású ($K_d = 44$ pM), és

specifikus [154,155,142,156], ezen kívül a toxin viszonylag nagyméretű (az átmérője kb. 2.2 nm). Abból a tényből, hogy az arany nanogömböket antitestréteg vonja be, felveti annak a lehetőségét, hogy egy kétdimenziós, hálószerű struktúra alakul ki, amelyek az arany-szigetekben lévő gömbök közötti tereket többé-kevésbé kitöltik [157].



13. Ábra *A rész:* A sematikus rajz az ioncsatornák és sejt felszíni receptorok közötti proximitás patch-clamp technikával történő meghatározásának elvét szemlélteti. A sejt felszíni receptorhoz (itt: MHC I) kötött 30 nm átmérőjű arany nanorészecskék befolyásolhatják a Pi2 toxin kötődési tulajdonságait. A kötődési tulajdonságok modulációja függ a ligandok és nanorészecskék méretétől, az intermolekuláris távolságtól, a receptorok számától és a kérdéses receptor-csatorna proximitástól. A receptor-klaszterek síkbeli elhelyezkedése miatt várhatóan a toxin-áramlás laterális komponense esik erősebb gátlás alá a merőlegeshez viszonyítva. (Egy Fab vagy Fc fragmens hossza 6.5 nm, az MHC I és MHC II membránsíkból kiemelkedő része kb. 10 nm.); *B rész:* A rajz két sejt felszíni receptor (itt MHC I és MHC II) közötti proximitás detektálásának az elvét illusztrálja, melyek közül

az egyik (MHC II), ha ligandot köt, modulálni képes bizonyos szignalizációs mechanizmusokon keresztül az ioncsatornák aktivitását. A ligand (itt L243 antitest) kötődését a "csatorna-aktív" receptorhoz (itt: MHC II) késeleteti a szoros közelségben lévő másik receptorhoz (itt: MHC I) kötött nanorészecske.

A diffúzió elméletével foglalkozó biofizikusok már tárgyaltak hasonló problémákat, amikor különböző méretű és alakú, akadályként szolgáló részecskék által gátolt háromdimenziós részecske-diffúziót próbáltak meg leírni,

a gélelektroforézissel és a méret-kivonásos kromatográfiával kapcsolatos jelenségeket modellezve [158,159]. Az arany-szigetek és csatornák kívánatos és lehetséges közelsége esetén a toxinnak a csatorna körüli térrészben lévő, lokális, effektív koncentrációját kétféle effektus csökkenti: (1) az aranygömbök és az azokat befedő antitestek véges mérete miatti térkitöltés [158,160,157] és (2) a toxin diffúziós állandójának csökkenése az arany-szigetek közelében, amelyet a térfoglalás miatti megnövekedett hidrodinamikai kölcsönhatás okoz [161,162,159,163]. A toxin diffúziós árama két komponensre bontható, az egyik a sejtfelszínnel párhuzamos, a másik pedig merőleges (a teljes toxin-fluxus konvektív járuléka elhanyagolható). Az arany-szigetek laterális elhelyezkedése miatt azt várjuk, hogy a laterális komponens gátlása erőteljesebb, mint a merőleges komponensé. Ezen kívül a toxin csatornához történő kötődését szükségszerűen megelőzi egy felületi diffúziós szakasz [164,165], amely növeli a diffúziós áram laterális komponensének jelentőségét.

A kvantitatív leírás során a toxin és csatorna kötődésének reakcióját 1:1-es sztöchiometriájúnak vehetjük, amelyet a k_{on} [$M^{-1}s^{-1}$] másodrendű asszociációs sebességi állandó és a k_{off} [s^{-1}] elsőrendű disszociációs sebességi állandó jellemez a következő módon [143]:



Ennek megfelelően az egyensúlyi blokkolás állapotához vezető relaxáció időállandója, τ_{be} (vagyis a bemosási időállandó) az aranygömbök hiányában a következőképpen adható meg:

$$1 / \tau_{be} = k_{off} + k_{on} \times c, \quad (2)$$

ahol c a toxin-koncentrációt jelöli. Az aranygömbök jelenlétében, fenomenológiailag, az arany hatását úgy lehet figyelembe venni, hogy

bevezetünk egy $p(<1)$ tényezőt (amelyet elérési valószínűségnek vagy árnyékolási tényezőnek nevezünk) a következőképpen:

$$1 / \tau_{be}' = k_{off} + k_{on} \times p \times c, \quad (3)$$

ahol τ_{be}' jelöli a megnövekedett relaxációs időt. Feltehető (és a kísérleteink is ezt bizonyították), hogy a toxin eltávolítását követő, a gátlás előtti áramszintre történő visszatérés időállandója (vagyis a kimosási időállandó), τ_{ki} egy olyan mennyiség, amelyet nem befolyásol jelentősen az aranygömbbel történő jelölés. Tehát:

$$1 / \tau_{ki}' = 1 / \tau_{ki} = k_{off}. \quad (4)$$

A toxin jelenlétében beálló egyensúlyban a nem blokkolt (vagyis megmaradó) áram hányada aranygömbök hiányában szintén függ ezektől a sebességi állandóktól a következőképpen:

$$f_u = k_{off} / (k_{off} + k_{on} \times c). \quad (5)$$

Hasonló egyenletet írhatunk fel, amikor az arany jelen van, azonban itt a p faktor is megjelenik:

$$f_u' = k_{off} / (k_{off} + k_{on} \times p \times c). \quad (6)$$

A 3. egyenletet elosztva a 2. egyenlettel azt kapjuk, hogy a bemosási idő növekedése, amelyet a τ_{in}' / τ_{in} -nel definiálunk, éppen egyenlő a nem gátolt

áram hányadának növekedésével, ami az f_u' / f_u (az 5. és 6. egyenletek hányadosa):

$$\tau_{in}' / \tau_{in} = f_u' / f_u = (K_d + c) / (K_d + p \times c) . \quad (7)$$

Itt felhasználtuk a toxin K_d -jének definícióját is:

$$K_d = k_{off} / k_{on} . \quad (8)$$

A 7. egyenletet használva a p érték meghatározható mind a bemosási idő növekedéséből, mind a nem gátolt áram hányada alapján. Ez a p érték ad információt a csatornák és arany-szigetek relatív proximitásáról, ha a toxin-kötődés K_d -ja és a c ismertek. Azonban, ha megvizsgáljuk a 7. egyenletet, észrevehetjük, hogy a p érték meghatározásának pontossága nagyobb c koncentrációknál nagyobb.

Azoknál a koncentrációknál, ahol a $c \gg K_d$, a 7. egyenlet határesetét kapjuk:

$$\tau_{in}' / \tau_{in} \approx 1 / p , \quad (9)$$

amely a τ_{in}' / τ_{in} legnagyobb lehetséges értékét adja (a p fix értéke mellett). Kísérleteink során a c értékét 2.5 nM-nak választottuk ($57 \times K_d$), tudatában annak, hogy ekkor a 9. egyenlet érvényes. Mivel nagy c értékeknél a megmaradó (nem gátolt) áram csak nagy hibával határozható meg, ezért a τ_{in}' / τ_{in} arányt preferáltuk.

Ezen kívül a $k_{on}' = p \times k_{on}$ "látszólagos" asszociációs sebességi állandó és a k_{on} kifejezhető a 2. és 3. egyenletekből, figyelembe véve a 4. egyenletet is, és a k_{on} relatív változása így meghatározható:

$$\Delta k_{on} / k_{on} = p - 1 \quad (10)$$

A p árnyékolási tényező kvalitatív értelmezése Axelrod és Wang [165] munkája alapján tehető meg, amely a dimenzionalitás csökkenésének (reduction-of-dimensionality) szerepét tárgyalja ligandok sejt felszíni receptorokhoz történő reakció-limitált kötődésére. A toxin Kv1.3 csatornához történő kötődése reakció-limitált, mert a Damköhler-faktor értéke kicsi ($Da < 10^{-4}$), amelynek számításánál a k_{on} , a diffúziós állandó és a sejt-sugár értékeit vettük figyelembe [165]. Átvéve [131]-ből a Haugh és Lauffenburger által megfogalmazott, a dimenzionalitás csökkenését leíró képletét a k_{on} asszociációs konstansra:

$$\frac{k_{on}}{k_{on}^{(0)}} = \frac{1 + 16 \cdot \chi_2 D_2 K_u / (3 \pi \cdot \chi_3 D_3 a_{cell})}{1 + 16 \cdot \chi_2 D_2 K_u / [(3 \pi \cdot \chi_3 D_3 a_{cell}) + 2 \sigma k_{off} / (a_{cell} c)]} \quad (11)$$

ahol a D_2 és D_3 a kétdimenziós (sejt felszíni) és 3 dimenziós (a sejt felszíntől távoli) diffúziós állandók, χ_2 és χ_3 annak valószínűségei 2D és 3D esetben, hogy a találkozáskor sikeres kötődés jön létre. K_u a toxinmolekula sejtmembránhoz történő aspecifikus kötődésének egyensúlyi állandója, az a_{cell} a sejt sugara, k_{off} a toxin csatornáról történő disszociációjának sebességi állandója, σ a toxin átlagos szabadúthossza (amelyet a 2D és 3D diffúzióra nézve egyenlőnek veszünk), c a toxin-koncentráció, $k_{on}^{(0)}$ az asszociáció sebességi állandója a toxin felületi diffúziójának hiányában, vagyis ha $D_2=0$.

A 11.-es egyenlet arra hívja fel a figyelmet, hogy a felületi diffúzió jelentőssé válik, amikor a felszínhez történő aspecifikus kötődés erős, vagyis a K_u nagy (ez a helyzet a Pi2 toxin esetében is, mert 6 pozitív töltése van), illetve amikor a c elég kicsi. Emellett a 11.-es egyenletből az is kiolvasható, hogy a k_{on} értékének csökkennie kell az aranygömbök jelenlétében, amennyiben az arany-szigetek csökkentik a D_2 -t és a c_2 -t (felületi elhelyezkedésük miatt). A Pi2 toxin fizikai paramétereire vonatkozó adatok alapján a dimenzionalitás csökkenésének közelítő értékeként 10 adódik a $c = 2.5$ nM koncentráció mellett.

Ha felírjuk az arany-szigetek mellett vagy azok közelében vett 2D diffúziós állandó és az arany hiányában vett (vagy az arany-szigetektől végtelen távolságban lévő) diffúziós állandó arányát mint egy H és egy S tényező szorzatát, ahol H a hidrodinamikai effektusokért és S a sztérikus takarásért felelős, az eredményül kapott kifejezés [Phillips, 163]:

$$D_2 / D_{2,\infty} = H(\lambda, \phi) \cdot S(\lambda, \phi), \quad (12)$$

ahol a H és az S exponenciális függvényei a λ és ϕ mennyiségeknek, melyek rendre a toxin sugarának és az aranygömb sugarának arányát és az arany-szigetben levő gömbök által elfoglalt térfogat hányadát jelentik. Kis ϕ térfogathányadoknál, az exponenciális kifejezéseket sorba fejtve, a $D_2 / D_{2,\infty}$ közelíthető a következő képlettel:

$$D_2 / D_{2,\infty} \approx 1 - a(\lambda) \cdot \phi, \quad (13)$$

ahol az $a(\lambda)$ kifejezés konstans, amit a toxin és aranygömb méretének aránya határoz meg. Ha az arany-szigetet egy R sugarú és h magasságú ekvivalens hengerrel helyettesítjük, akkor a kitöltött térfogat értéke lokálisan a következőképpen fejezhető ki:

$$\begin{aligned}\phi &= \text{a hengerben lévő gömbök térfogata} / \text{a henger térfogata} = \\ &= (N \cdot 4 r^3 \pi / 3) / (R^2 \pi h),\end{aligned}\quad (14)$$

ahol N a szigetben lévő aranygömbök száma, r pedig egyetlen aranygömb sugara. Ezt a kifejezést a következő alakban is írhatjuk, bevezetve a részecskék közötti d távolságot és az aranygömbök szigetben lévő $\sigma = 1/d^2$ lokális felületi sűrűségét:

$$\begin{aligned}\phi &= (4/3) \cdot (r/h) \cdot (r^2 \pi) \cdot \sigma = \\ &(4\pi/3) \cdot (r/h) \cdot (r/d)^2.\end{aligned}\quad (15)$$

A sok ismeretlen fizikai állandó megléte ellenére a 10-15. egyenletből látható, hogy kapcsolat van mérendő p érték és az aranygömbök helyi felszíni sűrűsége (vagy elkülönülése) között. Ennek a viszonynak a kimutatására adhat lehetőséget, amikor a patch-clamp mérések során kapott, k_{on} -beli relatív változásokat korreláltatjuk az áramlási citometriás energia-transzfer (FCET) mérések során kapott d részecske-távolsággal.

4.4.2. A Kit 225 K6 sejtek vizsgált receptorainak expressziós szintje

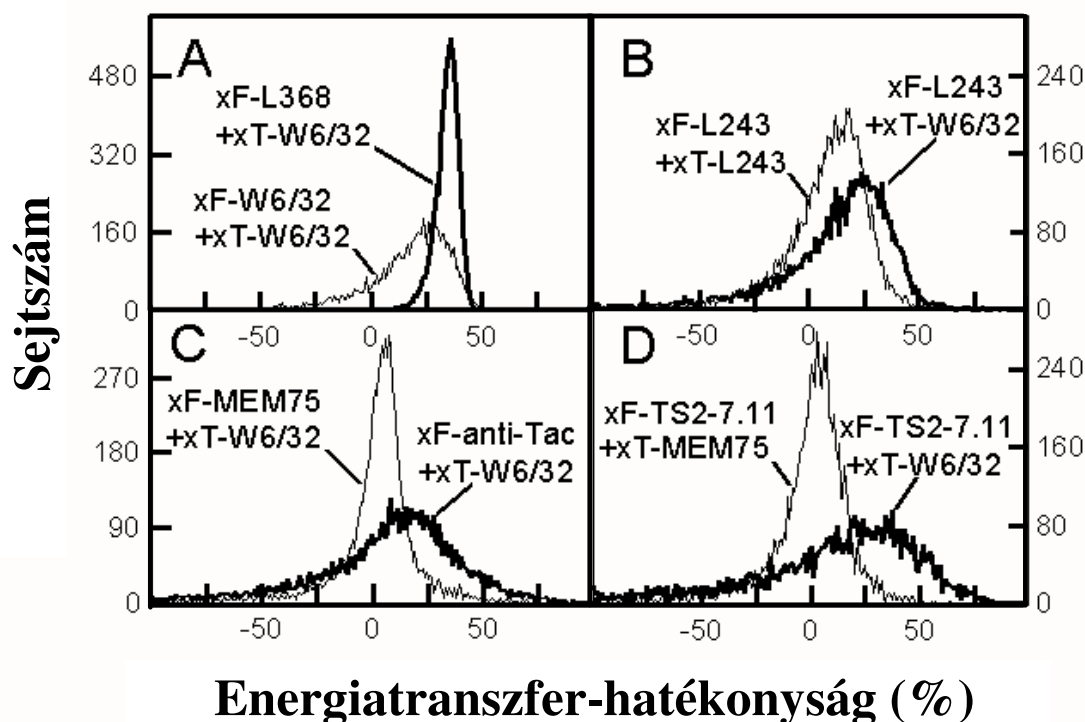
A toxin-kötődés gátlása a fehérjék közelségén túl azok számától is függ, ugyanis ha több objektum takar egy csatornától azonos átlagos távolságban, akkor a takarási effektus is nagyobb. A receptorok közelségének vizsgálatához éppen ezért fontos tudni azok expressziós szintjét a sejtfelszínen. A **6. táblázat** áramlási citometriás fluoreszcencia-intenzitás-mérésekből kapott adatokat mutat az egyes kötőhelyek relatív számára vonatkozóan. A receptorok mennyiségét ismert számú fluoreszcens festékmolekulát tartalmazó mikrogönggyökkel

történő kalibrálás után határoztuk meg. Az MHC I fehérjére kapott 1.5 millió receptor/sejt értéket 100 %-nak véve, a többi receptor expresszióját ennek %-os arányaként fejeztük ki. A Kit-225 K6 sejtek átlagos átmérője 14 μm volt.

4.4.3. Az MHC I és MHC II molekulák, az IL-2R α alegység és a VLA-4 integrin asszociációi: energiatranszfer-mérések

A **4. táblázat**ban feltüntetett energiatranszfer-hatékonyság értékek alapján a legerősebb homoasszociáció az MHC I-antigének között van (A rész), a leggyengébb pedig az IL-2R α alegységek között (B rész) közepes mértékű az MHC II-proteinek között (C rész), a VLA-4 integrin (D rész) és transferrin receptor (E rész). A legnagyobb energiatranszfer-hatékonyságot az MHC I molekula β_2 mikroglobulinja és nehézlánca között volt mérhető, amely főleg intramolekuláris eredetű, és az energiatranszfer mérések pozitív kontrolljául szolgáltak (**4. táblázat**, A rész).

A vizsgált receptorok molekuláris szintű hetero-asszociációjának foka az azonos jelátviteli platformba való tartozásuknak is mérőszáma lehet. Az MHC I és MHC II közötti jelentős, mintegy 20 %-os energiatranszfer-hatékonyság szoros molekuláris szintű összetartozást jelez (**4. táblázat**, B rész). Bár valamivel kisebb mértékű, mégis figyelemre méltó együttállást lehetett detektálni az IL-2R α alegység és az MHC I molekula között (**5. táblázat**, A rész).



14. Ábra Áramlási citometriás energiaátvitel-hatékonyság hisztogramok, 10000 sejt adatai alapján. A transzfer-hatékonyságokat az FCET módszerrel mértük, sejtenként, xFITC- és xTRITC-konjugált Fab fragmensek között, melyeket a megfelelő sejtfelszíni receptorokhoz kötöttünk. Az Fab-k specificitása: L368: anti-MHC I könnyűlánc ($\beta 2$ mikroglobulin), W6/32: anti-MHC I nehézlánc, L243: anti-MHC II DR α , anti-Tac: anti-IL-2R α , TS2-7.11: anti-VLA-4, MEM-75: anti-TrfR, xF:xFITC, donor, xT: xTRITC, akceptor. Az ugyanahhoz az MHC I receptorhoz kötött xF-L368 és xT-W6/32 Fab között mért nagy (30 %-os) intramolekuláris energiaátvitel-hatékonyság a szoros közelség pozitív kontrolljaként szolgál. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a gyakorisági eloszlások szélessége fordítottan arányos a donor-konjugált Fab-val jelölt receptorok expressziós szintjével. A független mérésekből származó ilyen hisztogramok átlagértékeit átlagoltuk és az **6. táblázat**ban tüntettük fel.

Mivel a Kit 225 K6 sejten a VLA-4 integrin expressziós szintje alacsony, az energiaátvitelt a donorfesték-konjugált anti-VLA-4 (TS2-7.11) antitestektől az akceptorfesték-konjugált anti-MHC I és anti-MHC II antitestek (rendre az L368 vagy W6/32 és L243 antitestek) felé mértük. A **4. táblázat** C részében szereplő, nagy intermolekuláris energiaátvitel-hatékonyságok a VLA-4 integrin és az MHC fehérjéket tartalmazó lipid raft szoros molekuláris szintű proximitásáról tanúskodnak.

4. Táblázat Az MHC I, MHC II, VLA-4 integrin és transferrin-receptor között mért energiáttranszfer-hatékonyságok.

	Donor (xFITC-jelölt)		Akceptor (xTRITC-jelölt)		<i>E</i> ± <i>SEM</i> (%)
	<i>antitest</i>	<i>antigén</i>	<i>antitest</i>	<i>antigén</i>	
A	L368	MHC I β_2 mikroglobulin	W6/32	MHC I nehézlánc	30.9 ± 3.8 ^{a)}
	W6/32	MHC I nehézlánc	W6/32	MHC I nehézlánc	20.4 ± 1.8
B	L243	MHC II DR α	W6/32	MHC I nehézlánc	20.6 ± 1.5
	L243	MHC II DR α	L243	MHC II DR α	12.3 ± 1.6
C	anti-Tac	IL-2R α	W6/32	MHC I nehézlánc	14.8 ± 0.6
	anti-Tac	IL-2R α	anti-tac	IL-2R α	6.3 ± 0.8
D	TS2-7.11	VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ integrin	L368	MHC I β_2 -mikroglobulin	13.7 ± 3.6
	TS2-7.11	VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ integrin	W6/32	MHCI nehézlánc	15.9 ± 1.0
	TS2-7.11	VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ integrin	L243	MHCII DR α	17.6 ± 2.5
	TS2-7.11	VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ integrin	TS2-7.11	VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ integrin	10.6 ± 1.0
E	TS2-7.11	VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ integrin	MEM-75	TrfR	5.7 ± 2.5
	MEM-75	TrfR	L368	MHCI β_2 -mikroglobulin	3.5 ± 2.0

^{a)} Az értékek öt független kísérletből számított átlagot (E) és szórást (SEM) jelentenek

A transferrin-receptor asszociációs tulajdonságait is vizsgáltuk: Elhanyagolható mértékű energiáttranszfer-hatékonyság értékeket mértünk a VLA-4 integrin és TrfR valamint az MHC-I glikoprotein és TrfR között (4. táblázat, D rész). Az a tény, hogy ezekben az esetekben nincs energiáttranszfer azt mutatja, hogy a transferrin-receptor valószínűleg az MHC-proteineket tartalmazó lipid raftokon kívül helyezkedik el.

4.4.4. A sejt felszíni receptorok aranygömb-jelölése különbözőképpen növeli a Pi2 toxin-kötődés bemosási időállandóját

Patch-clamp kísérleteink során a receptorok aranygömb-jelölésének toxin-kötődésre gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni. Ezekben a kísérletekben négyféle mintát készítettünk: (1) jelöletlen (kontroll) sejt, (2) immunogold részecskék jelenlétében inkubált sejtek, hogy megvizsgáljuk a nanorészecskék aspecifikus kötődésének lehetséges hatásait (3) adott receptor elleni antitestekkel jelölt sejtek, hogy a sejt felszíni antitest-réteg esetleges árnyékoló (gátló) hatását detektáljuk és végül (4) antitesttel (elsődlegesen) és aranygömbbel (másodlagosan) jelölt sejtek. A **5. táblázat**ban adjuk meg a toxin-koncentráció-ugrást követően mért relaxációs időket és az ezekből számolt kötődési állandókat ("látszólagos" asszociációs sebességi állandó, k_{on} , és disszociációs sebességi állandó, k_{off}).

5. Táblázat A Pi2 toxin Kv1.3 csatornához történő kötődésének nanorészecskék általi gátlása Kit 225 K6 sejtek felszínén. A táblázat megadja a mért bemosási és kimosási időállandókat (τ_{in} , τ_{out}) és az azokból számolt kinetikai állandókat (k_{on} , k_{off}).

A) jelöletlen sejtek (kontroll)

antitest	epitóp	$\tau_{in}^{b)}$ (s)	$\tau_{out}^{b)}$ (s)	$k_{on}^{c)}$ ($10^{-3}/nMs$)	$k_{off}^{c)}$ ($10^{-3}/s$)
—	—	27.3±1.7 ^{a)}	119.0±15.6	11.3±1.0	8.4±1.1

B) csak aranygömbbel inkubált sejtek (az aspecifikus g30-kötődés kontrollja)

antitest	epitóp	$\tau_{in}^{b)}$ (s)	$\tau_{out}^{b)}$ (s)	$k_{on}^{c)}$ ($10^{-3}/nMs$)	$k_{off}^{c)}$ ($10^{-3}/s$)
g30	—	26.1±1.7	131.6±19.0	12.3±1.1	7.6±1.1

5. Táblázat, folytatás

C) antitesttel elsődlegesen jelölt sejtek

antitest	epitóp	$\tau_{be}^{b)}$ (s)	$\tau_{ki}^{b)}$ (s)	$k_{on}^{c)}$ ($10^{-3}/nMs$)	$k_{off}^{c)}$ ($10^{-3}/s$)
W6/32	MHCI, α_2	30.1±1.4	133.3±21.3	10.3±0.8	7.5±1.2
L243	MHCII, DR α	28.7±1.6	135.1±21.9	11.0±0.9	7.4±1.2
Tac	IL-2R α	29.9±1.3	129.9±28.7	10.3±0.9	7.7±1.7
TS2-7.11	VLA-4	27.6±1.7	133.3±21.3	11.5±1.0	7.5±1.2
MEM-75	TrfR	27.8±1.6	111.1±12.3	10.8±0.9	9.0±1.0

D) antitesttel elsődlegesen és aranygömbbel másodlagosan is jelölt sejtek

W6/32	MHCI, α_2	45.9±4.7	142.9±8.2	5.9±0.9	7.0±0.4
L243	MHCII, DR α	40.0±3.1	117.6±22.1	6.6±1.0	8.5±1.6
Tac	IL-2R α	36.3±2.0	158.7±32.8	8.5±0.8	6.3±1.3
TS2-7.11	VLA-4	29.6±1.7	113.6±6.5	10.0±0.8	8.8±0.5
MEM-75	TrfR	29.2±1.2	125.0±15.6	10.5±0.7	8.0±1.0

^{a)} Az adatok 5 független mérésből számolt átlagot és szórást (SEM) adnak meg.

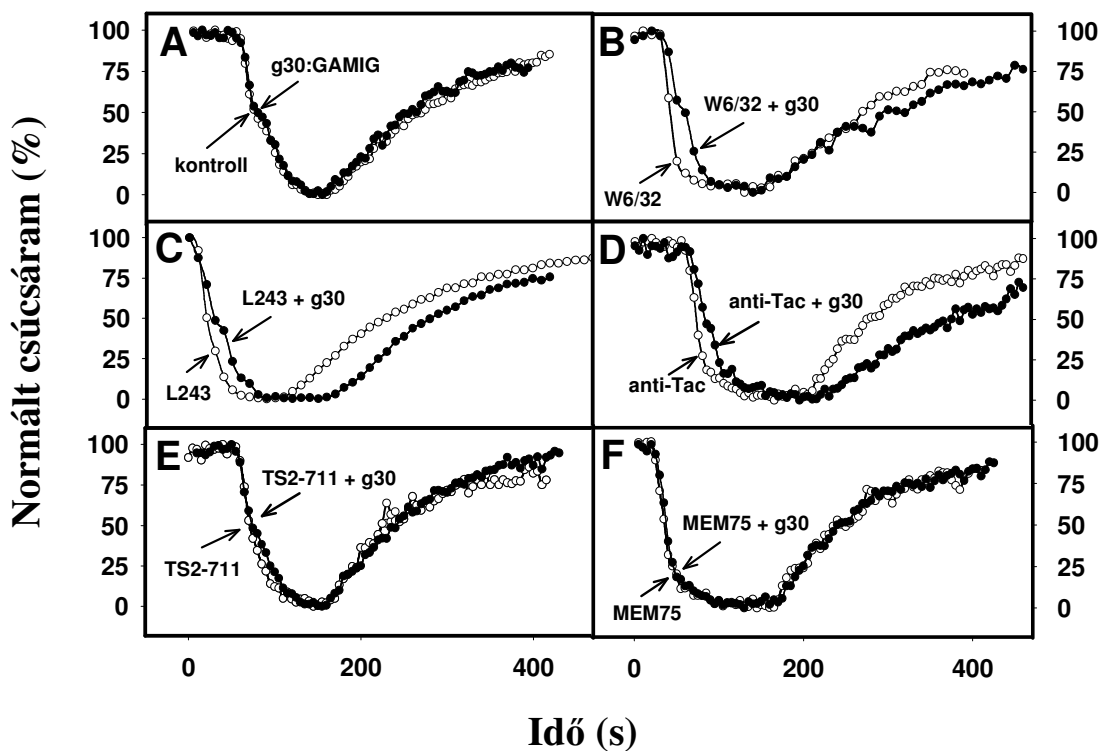
^{b)} A bemosási és kimosási időállandót (τ_{be} és τ_{ki}) a blokkolási görbék illesztésével nyertük, amelyekből néhány a **15. ábrán** látható.

^{c)} A k_{on} és k_{off} kinetikai állandókat a τ_{be} és τ_{ki} időállandók segítségével határoztuk meg a következőképpen: $k_{on}=(1/\tau_{in}-1/\tau_{out})/c_{tox}$, ahol c_{tox} a toxin-koncentráció; $k_{off}=1/\tau_{out}$.

Csak a kétszeresen, antitesttel és aranygömbbel jelölt minták sejteinek bemosási időállandóiban látható szignifikáns változás a kontroll mintákhoz képest (lásd a **15. ábrát**).

Ha csupán az elsődleges antitesttel jelöltünk (tehát a másodlagos aranygömb nélkül), az csak kismértékű, statisztikailag nem szignifikáns növekedést okozott a bemosási időállandóban, amely független volt az adott antitest típusától. A kimosási időállandók nem mutattak szignifikáns változást egyik, általunk végrehajtott kísérletben sem.

A τ_{in} -ben a legnagyobb változást, mely 40 %-os k_{on} -beli csökkenésnek felel meg, az MHC I és MHC II molekulákra figyeltük meg, közepes, 18 %-os volt a változás az IL-2R α alegységére és csak elhanyagolható a VLA-4 integrin és a TrfR megjelölésével nyert mintákra (5. és 6. táblázat). Itt a TrfR-t, mivel kívül van az MHC-raftokon, a receptorok szempontjából negatív kontrollként használtuk.



15. Ábra A Pi2 toxin Kv1.3 csatornához történő kötődésének bemosási és kimosási kinetikai görbéi kiválasztott sejteken az immunogold nanorészecskék hiányában (üres kör) és jelenlétében (tömör kör). Az *A* részen bemutatott sejteket nem jelöltük, a *B-F* részeken bemutatott sejteket a feltüntetett elsődleges antitesttel jelöltük (W6/32 anti-MHC I nehézlánc, L243 anti-MHC II DR α , anti-Tac anti-IL-2R α , TS2-7.11 anti-VLA-4, MEM-75 anti-TrfR), majd másodlagosan a kecskében termeltetett egér-ellenes IG-vel (GAMIG) konjugált 30 nm-es átmérőjű immunogolddal. A teljes-sejt konfigurációban lévő sejteket -120 mV-os tartófeszültségről $+50$ mV-ra depolarizáltuk 15 s-onként. A csúcsáramok értékeit a toxinnal való blokkolás előtti és utáni egyensúlyi értékeinek (rendre I_o és I_{min}) közötti különbségére normáltuk. Ezeket az értékeket az idő függvényében ábrázoltuk. Csak ugyanazon sejtuszpenzióból származó, ugyanazon napon mért sejteket hasonlítottunk össze.

6. Táblázat A vizsgált receptorokra vonatkozó sejtfelszíni expressziós szintek, intermolekuláris távolságok és átlagos klaszterméret, valamint a nanorészecskék által kiváltott relatív változások a Pi2 toxin-kötődést jellemző k_{on} asszociációs sebességi állandóban.

antitest	epitóp	$\Delta k_{on}/k_{on}$ (%)	expressziós szint (%)	intermolekuláris távolság (d, nm)	átlagos klaszterméret (R_c , nm)
W6/32	MHCI, β_2	$-42.7 \pm 9.8^a)$	$100.0 \pm 13.3^b)$	$7.0 \pm 0.1^c)$	$700 \pm 93^d)$
L243	MHCII, Dra	-40.0 ± 10.3	76.6 ± 8.6	7.8 ± 0.2	680 ± 136
Tac	IL-2R α	-17.5 ± 10.6	34.2 ± 8.3	8.8 ± 0.2	600 ± 46
TS2-7.11	VLA-4	-13.0 ± 10.3	< 4.0	8.1 ± 0.2	-
MEM-75	TrfR	-2.8 ± 10.4	15.3 ± 1.5	7.5 ± 0.1	200 ± 33

^{a)} Az adatok öt független mérésből számított átlagot és szórást (SEM) adnak meg. Ezeket az értékeket az **4. táblázatban** szereplő adatok felhasználásával számítottuk ki. A másodlagosan is jelölt sejteken mért k_{on} értékeket hasonlítottuk össze a csak elsődlegesen jelölt sejteken kapott megfelelő értékekkel.

^{b)} A receptorok expressziós szintjeit fluoreszcens festékekkel konjugált antitesttel jelölt áramlási citometriás fluoreszcencia-intenzitás mérésekkel határoztuk meg. A 100 % 1.25×10^6 kötőhelyet jelent.

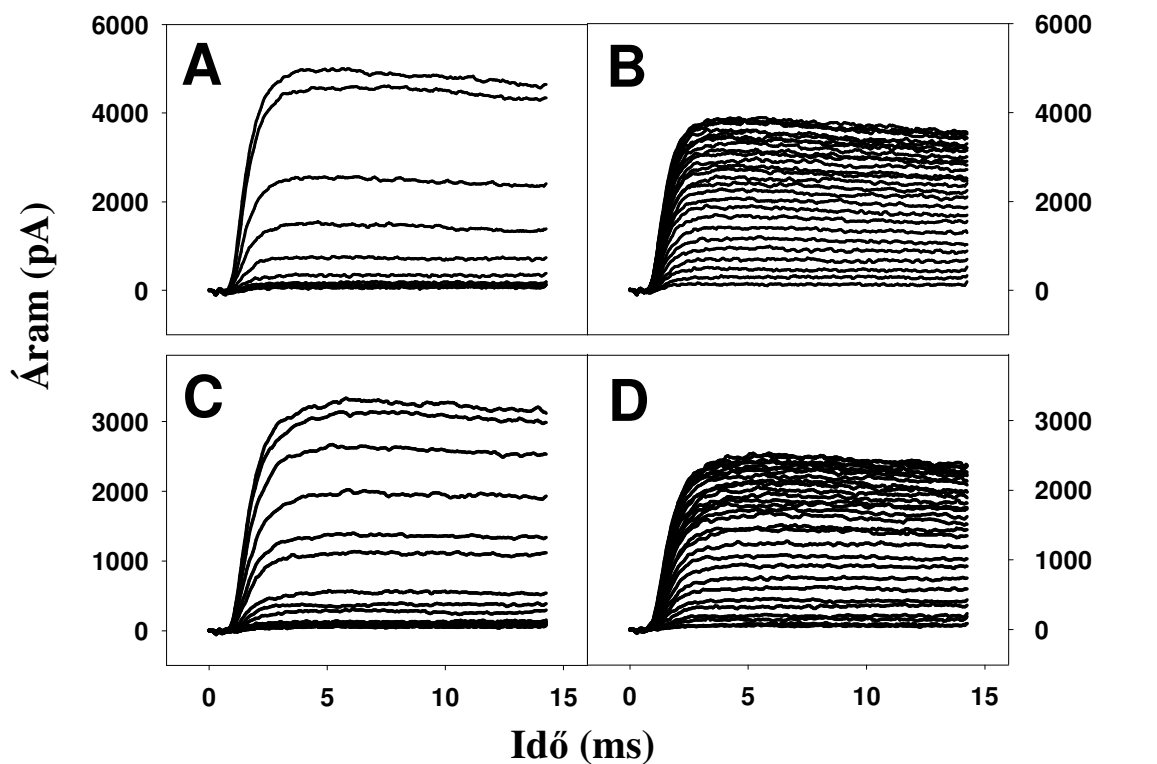
^{c)} Az intermolekuláris távolságokat a **5. táblázatban** feltüntetett energiatranszfer-adatokból határoztuk meg a $d=R_0(1/E-1)^{1/6}$ képlet alkalmazásával, az xFITC-xTRITC festékpárra jellemző $R_0= 5.6$ nm Förster-távolság használatával.

^{d)} A receptorok átlagos klaszterméreteit a (Vereb *et al.*, 2000)-ből vettük.

A kérdéses receptorokra vonatkozó egyedi blokkolási görbéket és az MHC II-ellenes L243 antitesttel jelölt, aranygömb nélküli és aranygömbbel is jelölt mintán mért áram-idő görbéket mutatunk be a **15. és a 16. ábrán**.

Amellett, hogy a τ_{out} kimosási idő nem változott az aranygömbök jelenlétének hatására, az I_0 kezdeti áramot (amelyet a toxin adása előtt mértünk), az I_{min} nem blokkolt (megmaradó) és I_{max} visszatért áramot sem befolyásolta ez a kezelés. Azonban amikor az I_0 értékeinek esetleges változását vizsgáltuk antitest-kötődés hatására, azt találtuk, hogy ezeket az áramértékeket jelentősen csökkentette (53 ± 15 %-kal) az L243 (MHC II-ellenes antitest) (**16. és 17. ábra**) és az anti-Tac (IL-2R α -ellenes antitest) (48 ± 24 %-kal).

Amikor az elsődleges antitestek toxin-kötődési kinetikára gyakorolt hatását vizsgáltuk, eredményül azt kaptuk, hogy a jelölés a τ_{in} bemosási (relaxációs) időállandóban csak kismértékű, nem szignifikáns változást okoz, bármely kérdéses receptorra vonatkozóan (5. táblázat).



16. ábra Kiválasztott sejteken, a Pi2 toxin bemosási és kimosási fázisaiban mért áram-idő görbék jelöletlen (kontroll) sejteken (A és B rész), és olyan sejteken, melyeken az MHC II glikoproteinhez az L243 elsődleges antitest közvetítésével 30 nm átmérőjű GAMIG-konjugált aranygömböt kötöttünk (C és D rész). A sejteket teljes-sejt konfigurációban -120 mV-os tartófeszültségről $+50$ mV-ra depolarizáltuk 15 s-onként. Kontroll NR extracelluláris oldattal perfundáltunk, amíg egy stabil áramszintet el nem értünk. Az A és C részben bemutatott sejteken (a specifikusan kötött aranygömb jelenlétében illetve hiányában) az első feltüntetett görbét követően a perfúziót 2.5 nM Pi2 toxint tartalmazó NR oldatra kapcsoltuk. A folyamatosan (15 s-onként) kapott áramgörbék láthatók, amíg a toxin egyensúlyi blokkolása ki nem alakult. B és D részek: Ugyanazon sejteken, az A és C részeken látható egyensúlyi blokkolási helyzetben a perfúziót kontroll NR oldatra váltottuk vissza. Minden áramfelvételt szivárgási áramra korrigáltunk. A mintavételezési frekvencia 20 kHz volt, és 2 kHz-es aluláteresztő szűrőt alkalmaztunk.

Felmerülhet az a kérdés is, hogy az arany nanogömbök indukálhatják, vagy módosíthatják-e a receptorok együttállását a receptorok keresztkötése által. Hogy megválaszoljuk ezt a kérdést, RAMIG antitestet használtunk másodlagos antitestként az aranygömb helyett. Ekkor csak nagyon kis növekedést kaptunk a relaxációs időkben (adatokat ezzel kapcsolatban nem mutatunk be). Méréseink során összehasonlítottuk az aranygömbök jelenlétében (elsődleges antitest nélkül) inkubált mintát is a kontroll mintával: az aranygömb esetleges aspecifikus kötődése csupán elhanyagolható változást okozott a τ_{in} bemosási időben. (**5. táblázat, 15. ábra, A rész**).

A **4. táblázat**ban összegeztük a k_{on} relatív változásait és a receptor-klaszterek geometriai paramétereit, így az energiatranszfer-mérésekből számolt receptor-receptor távolságokat és az átlagos klaszter-méreteket, melyeket a [108]–ből vett konfokális mikroszkópiás és TEM képek alapján határoztunk meg.

4.4.5. Az MHC I glikoprotein immunogold jelölése megváltoztatja az L243 antitest által kiváltott káliumáram- blokkolás időállandóját

Az MHC I és MHC II antigének már korábban ismert, fluoreszcencia energia-transzfer mérésekkel igazolt, szoros, nm-es közelségét, és az L243 antitest káliumcsatorna-áramokra kifejtett, előbb leírt hatását alapul véve olyan kísérletet is végeztünk, amelyben az L243 antitest MHC II glikoproteinhez történő kötődését vizsgáltuk. A mérés során három mintát készítettünk: (1) jelöletlen sejt (kontroll), (2) Az MHC I-ellenes W6/32 antitesttel jelölt sejt (3) Az MHC I-ellenes W6/32 antitesttel elsődlegesen és immunogold aranygömbbel másodlagosan jelölt sejt. Az aranygömbök (specifikus) jelenlétében illetve annak hiányában mért bemosási időállandó- és megmaradó áramhányad-értékek a **7. táblázat**ban találhatók.

7. Táblázat A nanorészecskék gátolják Kit 225 K6 T-sejtek felszínén lévő Kv1.3 csatornák áramának L243 antitest általi modulációját. A mért lecsengési időállandók és a megmaradó áramhányadok.

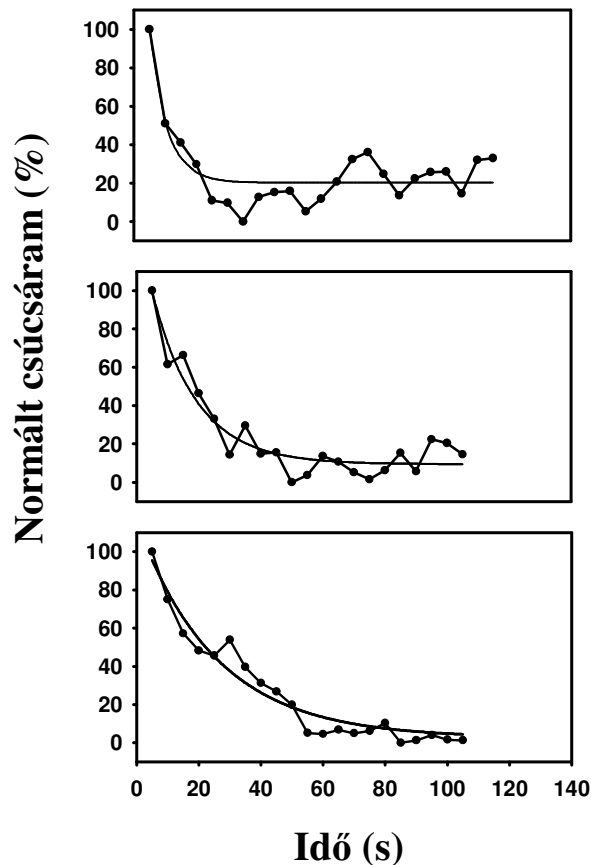
Minták	$\tau_{be}^{b)}$ (s)	I_{min} / I_0 (%)
kontroll sejt	$8.3 \pm 2.8^{a)}$	34.4 ± 10.1
W6/32 jelölt	11.3 ± 4.2	35.7 ± 8.1
W6/32 és gold30-jelölt	37.4 ± 9.5	45.8 ± 6.7

a) Az adatok négy független mérésből származó átlagot és szórást (SEM) adnak meg.

b) A lecsengési (bemosási) időállandókat és az L243 jelenlétében megmaradó áramhányadot (rendre τ_{in} és I_{min}/I_0) a megfelelő áramkinetikai görbékből határoztuk meg, melyekből néhányat a **17. ábrán** mutatunk be.

Az adatok alapján látható, hogy az arany nanogömbök MHC I glikoproteinhez történő kötése az (MHC II-ellenes) L243 által kiváltott Kv1.3 csatornaáram-gátlás τ_{in} relaxációs időállandóját 2.3-szeresére, a megmaradó áramhányadot pedig 1.3-szeresére növeli. Mivel ezekben a kísérletekben a kimosási időket nem mértük, a k_{off} esetleges változásairól sincs információnk.

A **17. ábra** az L243-kötődés által kiváltott áramszintcsökkenés időbeli lefutását jellemző görbét adja meg W6/32 nélkül, de az arany jelenlétében (kontroll), W6/32 antitest jelenlétében, de aranygömbök nélkül, végül a W6/32 antitest és arany együttes jelenlétében.



17. Ábra Kiválasztott relaxációs görbék, amelyek az MHC I arany-jelölésének hatását mutatják a Kv1.3 csatornák L243 – MHC II kötődés általi indirekt blokkolására. A bemosási időállandót szignifikánsan megnöveli az immunogold jelenléte. A tömör körrel jelölt vonalak a mért görbék, a jelöletlen vonalak pedig az $I(t) = (I_0 - I_{\min}) \exp(-t/\tau_{\text{in}}) + I_{\min}$ képlet alapján illesztett görbék, amelyből a τ_{in} bemosási időállandót meg lehet határozni. Az $I(t)$ csúcsáram-értékeket a csúcsáramok egyensúlyi szintjeinek az L243 antitesttel való blokkolás előtti és utáni különbségére normáltuk (rendre I_0 és I_{\min}).

A **7. táblázat** és az **17. ábra** alapján elmondható, hogy a W6/32 antitest kötődése önmagában kisebb mértékű növekedést idéz elő a τ_{in} relaxációs időállandóban, és a megmaradó (nem gátolt) áramhányadban, mint a specifikusan kötött arany nanogömb.

A **6. táblázatban** összegeztük a k_{on} relatív változásait és a receptor-klaszterek geometriai paramétereit, így az energiatranszfer-mérésekből számolt receptor-receptor távolságokat és az átlagos klaszter-méreteket, melyeket a [108]–ből vett konfokális mikroszkópiás és TEM képek alapján határoztunk meg.

5. Megbeszélés

5.1. Az A_1 és A_{2A} adenzin-receptor agonisták hatása a membránpotenciálra és az ioncsatornákra simaizomsejteken

Az áramlási citometriás adatok és a patch-clampmel végzett mérések eredményei azt mutatják, hogy az A_1 -specifikus agonista CPA kötődése hiperpolarizálja a DDT1 MF-2 sejteket, míg az A_{2A} agonista CGS 21680 kötődése depolarizációt vált ki. Az alkalmazott koncentrációtól függően a megfelelő antagonisták használatával csökkenthető vagy teljesen megszüntethető mindkét agonista hatása.

Eddigi ismereteink szerint ez az első alkalom, hogy a DDT1 MF-2 sejtek káliumáramának szelektív adenzin-receptor-aktiválószerrel általi modulációját sikerült kimutatni. Molleman és munkatársai [138] ezen a sejtvonalon sem magas dózisú adenzinnak (1 mM), sem ATP-nek membráramot befolyásoló hatását nem találták. Azonban ezek az eredmények nem mondanak ellent az általunk megállapítottakkal, mivel az adenzin a P_2 -receptorokhoz is kötődhet, emellett ennek a ligandnak a gyenge kötődése mind az A_1 és az A_2 receptorokhoz számos receptor-aktivációs folyamatot kiválthat, amely végül ahhoz vezethet, hogy a hatás nem lesz szignifikáns. A jelen tanulmányban altípus-specifikus agonisták által indukált folyamatokat vizsgáltunk, ezért a különböző hatásokat szét tudtuk választani.

A káliumcsatornák különböző altípusokra specifikus adenzin-analógokra adott válasza szövetről szövetre eltérő lehet. Bár mind az A_1 , mind az A_2 típusú receptorok megtalálhatók a sertés koszorúérből származó simaizomsejteken, az A_1 adenzin-receptorhoz történő kötődés káliumáramot aktivál, de az A_{2A} receptorok esetében ez nem mondható el [166]. Artériából származó simaizomsejteken csak az A_{2A} -receptor agonista volt képes aktiválni káliumcsatornákat, míg az A_1 -aktivátorok hatástalannak bizonyultak [167].

Szarvasmarha mellékvese zona fasciculata-ból származó sejteken a káliumáramot szelektíven lehetett gátolni A_1 , A_{2A} és A_3 adenzin-receptor agonistákkal, és ezek a gátlások membrán-depolarizációval is társultak [168]. Az általunk talált eredmények alapján a DDT1 MF-2 sejtek egyedülállóak abban a tekintetben, hogy megnövekedett K^+ -konduktanciával és hiperpolarizációval reagálnak az A_1 -receptor aktivációra, ezzel szemben csökkent káliumárammal és depolarizációval válaszolnak az A_2 -receptor ellenes ligand-kezelésre. Ezért ezek a sejtek farmakológiai kutatások hasznos tárgyát képezhetik, mert segítségükkel az A_1 - és A_{2A} -mediált mechanizmusok ugyanazon sejtvonalon tanulmányozhatók.

Újabb adatok szerint a membránpotenciál és az adenilát-cikláz aktivitás között szoros kapcsolat van [169]. Beltran és munkatársai [170] kimutatták, hogy a membránpotenciál közvetlenül modulálja az adenilát-cikláz aktivitást tengeri sün spermában, amelynek szerepe lehet a sperma motilissá válásában is. Izumi és munkatársai [152] szintén találtak összefüggést a membránpotenciál és az adenilát-cikláz aktivitása között. Reddy és munkatársai [171] eredményei szerint a depolarizáció hozzájárul az adenilát-cikláz aktivitás stimulálásához tenyésztett kisgyi neuronokban. Feltételezték, hogy az enzim katalitikus alegységében bekövetkező konformációs változások, melyet a depolarizáció okoz, növelhetik az adenilát ciklázok guanilát nukleotid stimulatórikus fehérjék általi stimulációját. Arra is rámutattak, hogy ez a jelenség Ca^{2+} -független, és nem tulajdonítható az intracelluláris Ca^{2+} általi szabályozásnak. Ez a megállapítás összhangban van azzal az eredményünkkel, hogy a CGS 21680 depolarizációt okozott, illetve hogy az irodalom szerint az A_{2A} agonisták receptorhoz történő kötődése által stimulálja az adenilát-cikláz-t. A CPA-val kapott eredményeink azt a feltételezést támasztják alá, hogy az adenilát-cikláz membránpotenciáltól való függése hiperpolarizált körülményekre ugyanolyan

jellegű, mint ahogy Reddy és munkatársai azt leírták [171] a fiziológias és depolarizált membránpotenciál-tartományra.

Elképzeléseink szerint az adenilát-cikláz A_{2A} - és A_1 -receptor aktivációt követő stimulációja vagy gátlása egy olyan mechanizmus révén valósul meg, melynek részét képezi az első lépések között a transzmembrán-potenciálban bekövetkező ligand-indukált változás, mivel a membrán-polaritásban kiváltott változás az enzim feszültségfüggő konformációs változását idézheti elő. Azt is megfigyeltük, hogy az A_1 -agonisták modulálhatják azt a membránpotenciálbeli változásokat, amelyet A_{2A} -agonisták indukálnak. Ez a kölcsönhatás az A_{2A} és A_1 receptorok között az adenilát cikláz komplex regulációját adhatja, amelyet A_{2A} - és A_1 -specifikus agonista és antagonisták fiziológias ligandok bizonyos kombinációinak megfelelő adenzin-receptorhoz történő kötődése válthat ki. Az expresszált A_1 és A_2 típusú receptorok aránya szövet-specifikus, a jelenlévő agonisták és antagonisták fajtái és koncentrációi szintén szövetről szövetre változhatnak. Ez a változékonyság a lehetséges cAMP-vezérelt specifikus folyamatok változékonyságával együtt magyarázatot szolgáltat arra, hogy az adenzin-receptor-aktiváció következményei miért lehetnek olyan sokfélék a különböző szervekben és szövetekben. Az adenilát-ciklázok szabályozására előbb felvázolt folyamat aztán olyan cAMP-jeleket generál, amelyek számos modulációs eseményhez hozzájárulhatnak.

5.2. A NECA és F-NECA adenzin-analógok által kiváltott funkcionális válasz kontraktilis szöveteken

Az A_1 és A_{2B} adenzin-receptorokat expresszáló, izolált szöveteken elvégzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az elektromosan stimulált pitvari szívizomzatban és tüdőartériában (melyeken A_1 adenzin-receptorok találhatóak), az F-NECA-ra vonatkozó EC_{50} érték szignifikánsan alacsonyabb, mint a NECA esetében mért mennyiség. Ez azt mutatja, hogy az F-NECA

affinitása kisebb mind a myokardiális, mind az érfalban levő A_1 adenosin-receptorokon. A maximális hatás (E_{max}) és Hill-koefficiens (n_H) hasonlóságát azzal magyarázhatjuk, hogy a NECA és az F-NECA hasonló jelátviteli útvonalak közvetítésével hat. A NECA és F-NECA hatását két A_{2B} -adenozin-receptort expresszáló, különböző szöveten is tanulmányoztuk. Ismert, hogy az aorta A_{2B} -receptorokat expresszál [48], illetve tüdőartériában az A_1 -receptorok gátlása után az A_{2B} adenosin-receptorok által közvetített relaxáció válik dominánssá [58]. A NECA-ra kapott dózis-hatás görbéből számított paraméterek (E_{max} , EC_{50} , n_H) nem különböztek az F-NECA esetében mért értékektől, ezért úgy gondoljuk, hogy a NECA és az F-NECA ekvivalens agonisták a vaszkuláris A_{2B} adenosin-receptorokon. Ezt a véleményt megerősítette a 8-PT-vel végzett kísérlet eredménye is, ez az adenosin-receptor antagonistá gyakorlatilag ugyanolyan mértékben tolta jobbra a NECA és az F-NECA dózis-hatás görbéit. Bár a 8-PT egy nonszelektív adenosin-receptor antagonistá, azonban a mintákat $0.3 \mu\text{M}$ DPCPX-ben előinkubáltuk, így a 8-PT által kiváltott moduláció szelektíven az A_{2B} -receptorokon keresztül valósul meg, mivel az A_1 -receptorokat teljesen gátolja a DPCPX.

5.3. A NECA és F-NECA elektrofiziológiai hatása simaizomsejteken

Az elektrofiziológiai méréseink során a DDT1 MF-2 sejteken mérhető teljes-sejt káliumáram változásait vizsgáltuk NECA és F-NECA hatására. A káliumáram farmakológiai analízise alapján elmondhatjuk, hogy a mért konduktanciák tulajdonságai közel esnek a $Kv1.3$ feszültségfüggő káliumcsatornák paramétereire. A két adenosin-származék, a NECA és az F-NECA különböző hatással bír a DDT1 MF-2 simaizomsejtek káliumkonduktanciájára. Ez a kémiai szerkezetük különbözőségének következménye lehet, amely eltéréseket idézhet elő ezeknek a vegyületeknek az A_1 és A_{2B} adenosin-receptorhoz való affinitásában. Mivel mind az A_1 , mind az

A_{2B} receptorok megtalálhatók a DDT1 MF-2 sejtek felszínén [135], és a NECA mindkét receptornak agonistája [172], a NECA vagy F-NECA kötődése által kiváltott funkcionális válasz az A_1 és A_{2B} által mediált hatásoknak az összegeként adódik. A káliumáram adenzin-analógok általi szabályozása függ a cAMP keletkezésétől [46]. Az eredményeink arra engednek következtetni, hogy a receptorhoz történő kötődés által kiváltott, cAMP függő jelátviteli útvonalak stimulálása különböző a NECA és az F-NECA esetében. A két vegyület közötti különbség a pitvari szívizomzatban és a tüdőartériában kiváltott válaszok különbözőségében is megmutatkozik. Az 5 μ M F-NECA csúcsáramot csökkentő hatása is szignifikánsan kisebb, mint az 5 μ M NECA alkalmazásakor mért gátló effektus, amit az affinitás- és szelektivitásbeli különbségekkel magyarázhatunk. Ez lehet a magyarázata a káliumáram-kinetában bekövetkező eltérő változásoknak, különösen az aktivációt tekintve, ahol nem volt effektus az F-NECA alkalmazásakor. Bár az F-NECA által kiváltott elektrofiziológiai tulajdonságokbeli változás kevésbé jelentős, mindkét vegyület csökkenti a káliumáramot. Ezért az F-NECA elektrofiziológiai szempontból valamennyivel kisebb hatású adenzin-analógnaként használható. Ezt figyelembe kell venni az F-NECA-val való PET vizsgálatok során is.

5.4. A spermiumok motilitásának változása gadolinium hatására

A sperma-motilitás kiváltásakor bekövetkező intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedés ismert a zsákállatoknál [152], tengeri halaknál [77,173,174], édesvízi halaknál [91] és emlősöknél [175]. Quill és munkatársai [84] azt találták, hogy feszültségfüggő kationcsatornák (CatSper) specifikusan expresszálódnak olyan spermiumokban, amelyekben előzőleg kalcium-szelektív pórusok voltak. Ezen csatornák mRNS-ét kimutatták egér, patkány és humán spermiumokban. Azonban mind a gerincesek, mind a gerinctelenek spermiumainak intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációja megnő a motilitás aktivációját követően.

A Ca^{2+} szerepe tehát meghatározónak tűnik e folyamatban: Oda és Morisawa [77] még az extracelluláris Ca^{2+} hiányában is 5-szörös emelkedést talált az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációban, amikor hiperozmotikus oldattal kiváltották a sperma motilitást fugu halban. Azt is kimutatták, hogy a fugu spermiuma még fiziológiás oldatban is motilis lett 10-15 s-al azután, hogy Ca^{2+} -ot vittek be a sejtekbe külső Ca^{2+} és A23187 Ca^{2+} ionofór alkalmazásával. Az ő eredményeik szerint tehát az intracelluláris raktárakban tárolt Ca^{2+} a külső ozmolaritás megváltozása nélkül is képes kiváltani a sperma-motilitást.

A mi eredményeink azonban részben ellentmondanak ennek. Méréseink szerint a fugu spermiumai fiziológiás ozmolaritású oldatban mozdulatlanok maradtak különböző koncentrációjú külső Ca^{2+} (1-100 μM) és 10 μM A23187 mellett. A fentiek szerint tehát az intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedése önmagában nem indítja el a sperma-motilitást izotóniás körülmények között ezeknél a halaknál. Ezek az eredmények komoly bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy az intracelluláris Ca^{2+} emelkedése önmagában nem elegendő a spermák mozgásának elindításához, és hogy az ozmolaritás hipertóniás irányba történő eltolódása az elsődleges kiváltó tényező.

Az általunk végzett kísérletekben az intracelluláris Ca^{2+} kivonása a fugu hal spermium-motilitásának teljes gátlásához vezetett. Azonban a fugu spermiumok motilitása kiváltható volt mind Ca^{2+} -mentes mind Ca^{2+} -ot tartalmazó hiperozmotikus oldatokba helyezésükkel. Ez a megfigyelésünk már összhangban van Oda és Morisawa [77] eredményeivel, melyek szerint a fugu sperma motilitását ki lehet váltani extracelluláris Ca^{2+} nélkül is.

A környezet ozmotikus változása a belső raktárakból történő Ca^{2+} felszabadulását eredményezheti, amely másodlagos hírvivőként játszhat szerepet a sperma-motilitás megindításában. Eredményeink szerint a kalmodulin is eleme ennek a jelátviteli útvonalnak, mivel a három kalmodulin-gátlószer dózis és inkubációs idő-függő módon blokkolta a fugu spermájának motilitását. Továbbá azt is megállapíthatjuk, hogy sem a kalcium-, sem a káliumcsatorna-blokkolók

nem befolyásolták a fugu spermájának motilitását. A fenti eredmények arra engednek következtetni, hogy a kalmodulin és a belső raktárakból felszabaduló Ca^{2+} kölcsönhatása játszik központi szerepet a fugu hal spermiumai motilitásának hiperozmotikus kezelés által kiváltott aktivációjában.

A tengeri halakkal ellentétben az édesvízi halak – mint a közönséges ponty – spermiumsejtjei hipotóniás oldatba kerülésük után lesznek motilisak [74]. A ponty spermiumok mozdulatlanok maradnak, amikor Ca^{2+} -mentes hipotóniás oldatba jutnak, és ez azt igazolja, hogy a sejteknek extracelluláris Ca^{2+} -ra van szükségük mozgásuk elindulásához [91]. A hipoozmotikus sokk a sejtmembránt hiperpolarizálja [140], amely megszünteti a Ca^{2+} -csatornák inaktivációját. A kalcium-ionok beáramlása ezeken a csatornákon a raktárakból történő Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulást eredményez és a kalmodulin-rendszeren keresztül elindítja a sperma-motilitást [91].

Krasznai és munkatársai [91] bizonyították, hogy az intracelluláris kalciumban bekövetkező növekedés a környezet hipoozmotikus irányba történő változása nélkül nem váltja ki a ponty spermiumok motilitását. Ez alapján a ponty spermiumok mozgékonyá válása szempontjából a hipoozmotikus sokk az elsődleges tényező és nem a kalcium-szint. Márián és munkatársai [137] kimutatták, hogy a ponty spermium motilitásának hipoozmotikus kiváltása a membránszerkezet átrendezésével jár. Perchec és munkatársai [176] az extracelluláris környezet hatását vizsgálták az ozmolaritás-változás által kiváltott, ponty spermium motilissá válásában szerepet játszó jelátviteli folyamatra.

A fenti eredményekből kiindulva vizsgáltuk meg a gadolinium - egy hatékony feszülés-aktivált csatorna-blokkoló [177,178,179] - hatását a fugu és a ponty spermiumai motilitására és sebességére. A gadolinium dózis- és

inkubációs időfüggő módon csökkentette a fugu spermiumai motilitását, és ez a hatás megfordítható volt (**11. ábra** A és B része). Hasonló hatást lehetett megfigyelni a ponty spermiumok esetében (**12. ábra** A és B része). Ezzel szemben a gadolinium (20 illetve 40 μM koncentrációban) nem változtatta meg szignifikánsan a *Ciona* zsákállatból származó sperma motilitását.

Perchec és munkatársai [176] azt vizsgálták, hogy a ponty spermiumok motilitásában szerepet játszó ozmotikus jelátvitelre milyen hatással van az extracelluláris környezet. Számos vegyület mellett megvizsgálták a gadoliniumnak a ponty spermiumai motilitására vonatkozó hatását is. Az általuk végzett kísérletben a gadolinium nem gátolta a ponty spermiumok aktivációját. A mi eredményeink ellentmondanak ennek a megfigyelésnek. A mi vizsgálataink során a gadolinium dóziszfüggő módon és reverzibilisen gátolta a ponty spermiumok motilitását (**12. ábra**).

A tengeri és az édesvízi halfajok spermiumsejtjeinek motilitását a környezet ozmolaritása szabályozza, ezzel szemben a *Ciona intestinalis* zsákállat szeminálplazmája a tengervízához hasonló ozmolaritású. A tengervízbe kerülő *Ciona*-spermiumok mozdulatlanok maradnak. A motilitást az SAAF váltja ki [79,80], de a spermiumok aktivációjához Ca^{2+} és cAMP is szükséges. A spermiumok intracelluláris Ca^{2+} -szintje megnő, amikor SAAF-al indukálják a motilitást [80].

A spermiumok többféle olyan Ca^{2+} -csatornát is expresszálnak, amelyek a Ca^{2+} -ionok sejtbe történő beáramlását teszik lehetővé [86,87,88,90,92], de eddig egyetlen ilyen ioncsatornát sem hoztak összefüggésbe a spermium-motilitás szabályozásával [180]. Ren és munkatársai [181] egy olyan Ca^{2+} -specifikus kation-csatornáról számoltak be (CatSper), amely mindenféleképpen szükséges a normális spermium-motilitáshoz. A Ca^{2+} általános szerepe és a spermium-motilitás kiváltásában tapasztalható különbségek felvetik a kérdést, hogy

vannak-e olyan ozmolaritás-függő, mechano-szenzitív Ca^{2+} -csatornák, amelyek az ozmoszenzitív tengeri és édesvízi halfajok spermiumsejtjeinek aktivációs mechanizmusaiban részt vesznek.

A spermiumból kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel végzett vizsgálata egyértelműen azt mutatta, hogy a spermiumok motilitásának aktivációja négy fehérje izoelekromos pontjának megváltozásával jár. Így, bár a spermium-motilitás aktivációja legalább négy fehérje izoelekromos pontjának eltolódásával jár, csak a 20 kDa molekulásúlyú fehérje tűnik az aktiváció szempontjából alapvetőnek. Ennek a fehérjének a további vizsgálata nemcsak a sperma aktiváció gadoliniummal való gátlásának mechanizmusára fog fényt deríteni, hanem a mozgás megindulását kiváltó kritikus molekuláris eseményekre is.

Sok jelátviteli folyamat erősen függ a sejtmembrán fizikai állapotától. A gadolinium a sejtmembrán lipid részéhez kötődik [182], és a kettősréteg fizikai tulajdonságainak megváltozása hatással lehet a jelátviteli folyamatra is. A lantanidák nagy affinitású kötődése befolyásolja a foszfolipid kettősrétegek fizikai tulajdonságait is [182]. Ezek a változások érinthetik a transzmembrán fehérjék konformációs változásának a dinamikáját is [183]. A gadolinium aktívan kivonja a Ca^{2+} -ot a felszínről, és egyes zsírsavláncok újrendeződését okozza, valamint fázisszeparációt idéz elő [184]. A transzmembrán fehérjékre nyomást fejthet ki a környező lipidek Gd^{3+} jelenlétében bekövetkező kondenzációja, és ez a nyomás megakadályozhatja a mechanikai feszültség által kiváltott konformációs átmenetet [182]. A GdCl_3 (40 μM) szignifikánsan csökkenti a közönséges ponty spermájának membránfluiditását és a hipotóniás kezelés fluidizáló hatását is ellensúlyozza (**3. táblázat**). Ez a megfigyelés azt az elképzelést támasztja alá, hogy a gadolinium a plazmamembrán strukturális változását idézi elő.

Az az eredményt alapul véve, hogy a hipoozmotikus kezelés a membránszerkezet átrendeződését eredményezi [137,185], azt vártuk, hogy a

gadolinium gátolja az ozmoregulált spermiumok motilitását, ezzel szemben nem lesz hatással a *Ciona* motilitására. Azt is vártuk, hogy a membránfehérjékben bekövetkező, feszülés-indukált konformációs változások szerepet játszanak a spermium aktivációs folyamataiban. A mechanoszenzitív csatornák nagyon érzékenyen reagálnak az ozmózisnyomás változására, és így módosíthatják olyan membránfehérjéknek az aktivitását [97], amelyek a spermiumok aktivációjában szerepet játszanak [176]. Ezek a fehérjék lehetnek Ca^{2+} -csatornák (mint például a közönséges ponty esetében, ahol az extracelluláris Ca^{2+} jelenléte szükséges ahhoz, hogy a hipoozmotikus kezelés kiváltsa a motilitást), de lehetnek receptorfehérjék is, amelyek a transzmembrán jelátviteli folyamat részeként a belső raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulást idézik elő (mint a fugunál). Más membránkomponensek szabályozása is történhet ilyen módon. Az aktivációt követően vízbeáramlás történik. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a mechanikai feszültség hatására létrejövő aktiváció egyidejűleg az összes membránbeli csatornára hathat, így a víz-csatornákra is.

5.5. Korreláció a toxin-kötődés térbeli gátlása és az MHC-molekulákat tartalmazó lipid raft receptorsűrűsége között

Az MHC I, MHC II és IL-2R α molekulákhoz kötött arany nanogömbök által kifejtett sztérikus gátlás jelensége a [108] –ban leírt energiatranszferes, konfokális fluoreszcens mikroszkópiás és a transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) mérések illetve saját energiatranszferes méréseink alapján értelmezhető. A **6. táblázat** alapján úgy tűnik, hogy a k_{on} -beli relatív változásokat a receptor-sűrűség (amely fordítottan arányos a receptor-receptor távolsággal), a klaszter-méret és a vizsgált receptor minősége határozza meg. A **6. táblázat**ból az is látható, hogy a k_{on} relatív változása az MHC I és MHC II specifikus aranygömb-jelölésének hatására volt a legnagyobb (-42.7 ± 9.8 és -40.0 ± 10.3 %), amelynek magyarázata az lehet, hogy mindkét MHC-

fehérje nagyméretű és sűrű klasztereket alkot, valamint azzal a ténnyel, hogy nagymértékben heteroasszociáltak. Ezen a sejtvonalon korábban végzett konfokális fluoreszcens mikroszkópos és TEM analízisek azt mutatták, hogy az MHC I és MHC II is közelítőleg 700 nm-es átlagos átmérőjű klasztereket alkotnak [108]. A TEM képeken az is látható, hogy kb. 20 aranygömbből álló, közel összefüggő arany-szigetek vannak, mindössze néhány nm-es részecskék közötti távolsággal [108]. A 20 %-os FRET hatékonyság (4. táblázat A része) alapján, az MHC I glikoproteinekre számított kicsiny, 7 nm-es receptor-receptor távolság alapján várható ilyen klaszter-fluktuációk kialakulása. Az egymás melletti nanogömbök közötti rések ezekben a struktúrákban elegendően kicsik ahhoz, hogy effektív módon gátolják a toxin felületi diffúzióját, mielőtt az a célba érne. Emellett, az aranyrészecskék és csatornák molekuláris szintű (<10 nm) proximitása esetén a k_{on} direkt módosítását is várhatjuk. A toxin-kötődés bemosási időállandójának (τ_{on}) ilyen mértékű csökkenése alapján arra következtethetünk, hogy a Kv1.3 csatornák az MHC-molekulákat tartalmazó lipid raftokban vannak, vagy legalábbis többségük a részecskemérettel összemérhető távolságban van a raftoktól (ez 30-50 nm, az aranygömb átmérőjének és a bevonó antitestréteg vastagságának az összege) [186,157].

Kisebb mértékű, mégis szignifikáns, 18 %-os relatív csökkenést mértünk a k_{on} értékében az IL-2R α alegység esetében. Ez annak tulajdonítható, hogy bár az IL-2R α az MHC I és MHC II fehérjekhez hasonló méretű klasztereket alkot, a sűrűségük szignifikánsan kisebb, a nagyobb receptor-receptor távolságnak (8.8 nm az IL-2R α -ra és 7.0 nm az MHC I-re) és az ide vonatkozó konfokális képeknek megfelelően. Az eredmények szerint a Kv1.3 csatorna az IL-2R α alegységekkel is hasonló nagyságrendű, bár némileg kisebb mértékű molekuláris közelségben van.

Mivel a VLA-4 integrin az MHC I és MHC II receptorokhoz nagyon közel helyezkedik el (lásd a 14. ábra D részének energiatranszfer-hatékonyság értékeit), azt várnánk, hogy a VLA-4-hez kötött arany nanorészecskék a toxin

kötődési tulajdonságait is képesek módosítani. A várakozással ellentétben a detektált módosítás nem volt szignifikáns, valószínűleg a receptorok nagyon alacsony expressziós szintje miatt. Bár a VLA-4 integrinek között jelentős energiatranszfert figyeltünk meg, a nagyon alacsony expressziós szintjük (**6. táblázat**) miatt lehetséges, hogy legtöbbjük dimer formájában van jelen, ami csökkenti a toxin-kötődés gátlásának hatékonyságát.

A TrfR esetében sem találtunk szignifikáns változást az asszociáció sebességi állandójában (k_{on}). Bár a TrfR molekulák kiterjedt, sűrű klasztereket alkotnak (7.4 nm-es receptorok közötti távolság, 200 nm-es átlagos klaszterméret, [108]), hatásuk azért lehet elhanyagolható, mert főleg az MHC-ket tartalmazó lipid raftoktól különböző sejtmembrán-beli kompartmentekben helyezkedik el. Azt a tényt, hogy ezen a sejtvonalon a TrfR-ok máshol találhatóak, az általunk mért kis energiatranszfer-hatékonyságok is igazolják, amikor az egyik oldalon a TrfR volt, a másik oldalon pedig az MHC I vagy a VLA-4 integrin (**4. táblázat** E rész), illetve a korábbi konfokális mikroszkópos és TEM megfigyelések is ezt támasztják alá [108]. A TrfR különböző kompartmentalizációs mintázatát több más, főleg limfoid eredetű sejtvonal felszínén is kimutatták [105].

5.6. A Kv1.3 elhelyezkedésének funkcionális következményei

A bemosási idő modulációjának hiánya a TrfR-hoz kötött nanogömbök esetében alátámasztják azt az elképzelést, hogy az MHC és IL-2R α molekulák bemosási-idő növekedései a Kv1.3 csatornák proximitását tükrözik ezekhez a receptorokhoz. Azon véleményünket, hogy a Kv1.3 csatorna raftokhoz történő közelségének funkcionális szerepe van, megerősítik azok a kísérleteink, melyek során a Kv1.3 csatorna gátlását mértük az MHC II-ellenes L243 és az IL-2R α -ellenes anti-Tac antitestek hatására. További vizsgálat tárgyát képezi annak

eldöntése, hogy ezt a hatást az antitest és a csatorna sztérikus kölcsönhatása okozza, vagy indirekt módon, jelátviteli útvonalak (ezeken belül tirozinkinázok) aktivitása.

5.7. Receptor-proximitások detektálása ioncsatornák receptor általi modulációjának térbeli gátlásával

A proximitás-detektálás általunk javasolt elvét, amikor patch-clamp technikával kötődési reakciók lelassulását mérjük, ki lehet terjeszteni bármely olyan receptor-párra, melyek közül az egyik képes ioncsatorna-aktivitást módosítani. Legfontosabb feltételezésünk az, hogy egy csatorna-moduláló receptorhoz történő ligand-kötődést le lehet szorítani azáltal, hogy megfelelő méretű nanorészecskéket kötünk egy másik receptorhoz, mely közel van az előzőhöz. A csatorna oldaláról mérve, a receptorhoz történő ligand-kötődés térbeli gátlása a receptor-indukált csatornaáram-változás kinetikai paramétereiben vagy nagyságában mérhető változást kell, hogy okozzon. Speciális hormon-receptor, pl. TSH [187], IL-2 [123], valamint membránpotenciált változtató antitest-antigén rendszerek említhetők az ilyen típusú kísérletek alanyai között. A receptorok elhelyezkedésének a nagy érzékenységű patch-clamp technikával történő detektálása előnyös lehet akkor, amikor a csatorna-aktív receptorok nagyon alacsony szinten expresszálódnak, és így nehezen vizsgálhatók a hagyományos fluoreszcenciás technikákkal, vagy amikor az immunfluoreszcens jelölés nem lehetséges valamilyen ok (pl. monoklonális antitest hiánya) miatt.

A toxin-kötődési kísérleteink során a csatorna-áram szignifikáns csökkenését figyeltük meg az L243 (53 %) MHC II-ellenes és anti-Tac (48 %) IL-2R α ellenes antitestek kötődése nyomán a Kit 225 K6 T-limfóma sejtvonalon. Bene és munkatársai a sejtmembrán depolarizációját tapasztalták az MHC II-höz történő antitest-kötődés során JY B limfoblaszt sejteken [127],

Pieri és munkatársai pedig az IL-2 receptorhoz történő IL-2 kötődéskor HUT-102B2 T-limfoblaszt sejteken [126]. Ezek a megfigyelések összhangban állnak azon elképzelésünkkel, hogy mindkét receptor ugyanannak a transzmembrán szignalizációs platformnak, az MHC-ket tartalmazó lipid raftnak az eleme ezeken a sejtvonalakon [104,110].

Az MHC I és MHC II nagymértékű molekuláris közelségére alapozva, (7.0 ± 0.1 nm receptorok közötti távolság), figyelembe véve a nagymértékben átfedő molekuláris klaszterekben rendeződésüket [108], és az MHC II csatornamodulációs képességét, az előzőekben megfogalmazott detektálási elvet alkalmaztuk az MHC I-MHC II párra. Bár kísérleteinkben a térbeli gátlás pontos módját nem tudtuk meghatározni, ebben az L243 antitest MHC II-höz történő kötődését megelőző felületi diffúziójának akadályozása ugyanúgy szerepet játszhat, mint az MHC II-n lévő L243-kötő epitóp aranygömb általi direkt árnyékolása. Ez a kísérlet a Pi2 toxinnal végzett kísérleteinkkel analóg, és méréseink egyfajta belső kontrolljaként szolgálhat, azt demonstrálva, hogy egy “elektromosan aktív” (MHC II) és “elektromosan csendes” (MHC I) receptor proximitását ki lehet mutatni a patch-clamp technika segítségével, a “gátolt kötődés” elvének felhasználásával. Mivel az L243 teljes antitest és a Pi2 toxin ekvivalens átmérője ugyanabba a nagyságrendbe esik (az előbbi helyettesítő gömb átmérője 7.1 nm, az utóbbié pedig 2.2 nm), hasonló nagyságú effektusokat vártunk a kétféle kísérletben.

5.8. A Kv1.3 MHC-ket tartalmazó lipid raftokban történő lokalizációjának biológiai szerepe

Figyelembe véve, hogy (1) az IL-2R komplex által közvetített jelátvitel a T-sejtes válasz kiváltásában és az aktiváció indukált sejthalálban jól ismert szerepet játszik [113], (2) a VLA-4 integrinek aktív szerepet játszanak az immunszinapszis létrejöttében az immunfelismerés és a sejtek

helyváltoztatásának folyamatában [188,189,109], és (3) az MHC I és MHC II receptorokról újabban kimutatták, hogy közvetlen szerepet játszanak a pl. apoptózishoz vezető transzmembrán jelátviteli folyamatok elindításában [114,190,115,191,116,192]; valószínűsíthető, hogy a Kv1.3 káliumcsatornák MHC-eket tartalmazó lipid raftok közelében történő elhelyezkedése a membránpotenciál-változás által közvetített szignalizáció gyorsításában játszik szerepet. A gyorsítás a hírvivő molekulák receptorok és csatornák egyes helyei közötti diffúzió idejének rövidülésében jelentkezhet [131,158].

6. Összefoglalás

Kísérleteink nyomán megállapításokat tehettünk egyes, a citoplazma membránban lévő kationcsatornáknak receptorok és extracelluláris ozmolaritás általi szabályozásáról. A méréseket több faj többféle szövettípusán végeztük, a választást minden esetben egy-egy érdeklődést kiváltó, ioncsatornákkal kapcsolatos jelenség megléte indokolta.

A DDT1 MF-2 simaizomsejteken az A_1 adenzin-receptor agonista CPA és az A_{2A} adenzin-receptor agonista CGS 21680 ellentétes irányban változtatta meg a membránpotenciált. Az A_1 antagonistá DPCPX és az A_{2A} antagonistá CSC (xantin-típusú) vagy ZM 241385 (nem xantin-típusú) jelenléte megakadályozta a membránpotenciálváltozást. A CPA megszüntette a CGS 21680 által előidézett hatást. A CPA alkalmazása dóziszfüggő módon növelte sejteken mért kifelé irányuló feszültségfüggő káliumáramot, ezzel szemben a CGS 21680 csökkentette azt (szintén dóziszfüggő módon). Ennek alapján a káliumkonduktanciában bekövetkező változás tehető felelőssé a membránpotenciálbeli változásokért. A CGS 21680 dóziszfüggő áramblokkoló hatásához egy ugyanolyan dóziszfüggést mutató áramkinetikabeli változás is társult: A csatornák inaktivációja leginkább az agonista 100 nM-os koncentrációja mellett gyorsult. A pertussis-toxin alkalmazása nem befolyásolta a CGS 21680 áramblokkoló hatását, jelezve, hogy az A_{2A} -agonista nem G-proteinen keresztül modulálja a káliumcsatornákat.

Elvégeztük a NECA adenzin-receptor agonista és fluorizált, PET mérések során felhasználható származéka, az F-NECA által kiváltott funkcionális válaszok összehasonlítását. Tengerimalac szöveteit vizsgálva, az A_1 adenzin-receptorokat expresszáló, elektromosan stimulált pitvari szívizomzatban mind a NECA, mind az F-NECA koncentrációfüggő módon csökkentette a kontraktilis erőt. A tüdőartéria-csíkokban (ahol A_1 és A_{2B} is jelen van) szintén dóziszfüggő módon fázisos kontrakciót váltott ki mindkét vegyület

(csak A_1 -mediált hatás). Mindemellett az F-NECA hatása kisebb volt ugyanolyan koncentráció mellett, mint a NECA által kiváltott válasz a pitvari szívizomzatban és a tüdőartériában is (az EC_{50} értékekben mutatkozott különbség). Az A_{2B} adenosin-receptorokat expresszáló mellkasi aorta preparátumon a NECA és az F-NECA is dóziszfüggő módon relaxációt indukált. A vegyületeket tekintve nem volt különbség sem a maximális hatás, sem a Hill-koefficiens, sem a félhatásos dózis értékei között. A DPCPX-előkezelt tüdőartériákon a NECA és az F-NECA is gyors relaxációt váltott ki (A_{2B} -receptor-mediált hatás). Itt sem volt különbség a dózis-hatás görbék egyik paramétere között sem.

A DDT1 MF-2 sejteken mért feszültségfüggő káliumáramot mind a NECA mind az F-NECA szignifikánsan csökkentette. A csökkenés mértéke azonban az F-NECA esetében kisebb volt. Az adenosin-analógok a teljes-sejt áram inaktivációját is gyorsították, az F-NECA itt is kisebb hatással bírt. Az áram aktivációs időállandóját csak a NECA-val történő perfúzió csökkentette. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az F-NECA a NECA egy funkcionálisan kevésbé aktív analógja.

Azt is megmutattuk, hogy a gadolinium a fugu hal és a ponty spermiumának motilitását dóziszfüggő módon csökkentette. A gadolinium hatása reverzibilis volt, ebből arra következtethetünk, hogy a mechanikai feszülés-aktivált kationcsatornák fontos szerepet játszanak a tengeri halak spermium-motilitásának kiváltásában. A fugu spermiumából származó bizonyos fehérjék izoelektromos pontja megváltozik, amikor a spermium-motilitás hiperozmotikus környezetben aktiválódik. Az egyik ilyen fehérje izoelektromos pontjának eltolódását teljes mértékben gátolta a gadolinium-kezelés. Ez a fehérje közvetítheti a feszülés-aktivált csatornák hatását. A fluoriméteres anizotrópiaméréseink során azt találtuk, hogy a ponty spermium motilitását kiváltó hipoozmotikus kezelés növeli a membránfluiditást. Amikor a hipoozmotikus kezelést gadolinium jelenlétében alkalmaztuk, a spermium membránjának

fluiditása nem változott, és a gadolinium a motilitást is blokkolta. A feszülés-aktivált kationcsatornák tehát szerepet játszanak olyan fajok spermium-motilitásának megindításában, ahol a spermium eltérő ozmolaritású közegbe kerül a megtermékenyítéskor.

Egy másik kísérletsorozatban ioncsatornák és receptorok távolságát, együttállását vizsgáltuk humán T-limfóma sejtvonalon. A patch-clamp technika segítségével kimutattuk, hogy az MHC I, MHC II glikoprotein, IL-2R α alegység, VLA-4 integrin és transferrin sejtfelszíni receptorokhoz kötött 30 nm átmérőjű arany nanorészecskék különbözőképpen modulálják a Pi2 toxin Kv1.3 csatornához történő kötődését. A moduláció a csúcsáramok exponenciális illesztésével nyert τ_{in} toxin-bemosási (relaxációs) időállandó növekedésében mutatkozott meg a jelöletlen sejtekhez képest. Összevetettük az elektrofiziológiai adatokat az áramlási citometriás energiatranszfer-kísérletek során kapott, a receptor-klaszterekre vonatkozó eredményekkel. Ez alapján elmondhattuk, hogy a moduláció függ a receptor-klaszterek sűrűségétől és méretétől, amivel a Kv1.3 csatornák MHC-molekulákat tartalmazó raftokhoz való közelségét demonstráltuk. További méréseink szerint MHC II-höz történő antitest-kötődés részlegesen blokkolja a csatornaáramot. Ezt a tényt és az MHC I és MHC II már előzetesen igazolt közelségét felhasználva egy olyan kísérletet végeztünk, melynek során MHC I-hez kötött aranygömbök MHC II-höz történő antitest-kötődést leszorító hatását vizsgáltuk. Az MHC II-általi csatornamodulációt ilyen módon sikeresen gátoltuk. Kidolgoztunk tehát egy olyan új módszert, mellyel receptor-csatorna vagy receptor-receptor proximitásokat tudunk detektálni, a koncentráció-ugrást követő, sztérikusan gátolt diffúzió elmélete alapján.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Sperelakis N: Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach, Third Edition, Academic Press (2001)
- [2] Darnell, JE: Molecular cell biology, Scientific American Books (1990)
- [3] Hill CS, Treisman R: Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity: *Cell* **80**, 199-211 (1995)
- [4] Grotzinger J: Molecular mechanisms of cytokine receptor activation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1592**, 215-23 (2002)
- [5] Siddiqi SM, Jacobson KA, Esker JL, Olah ME, Ji XD, Melman N, Tiwari KN, Secrist JA 3rd, Schneller SW, Cristalli G: Search for new purine- and ribose-modified adenosine analogues as selective agonists and antagonists at adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **38**, 1174-88 (1995)
- [6] Barik S: Protein phosphorylation and signal transduction. *Subcell. Biochem.* **26**, 115-64 (1996)
- [7] Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25
- [8] Collins SH, Caron MG, Lefkowitz RJ: From ligand binding to gene expression: new insights into the regulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 37-39 (1992)
- [9] Deckmyn H, VanGreet C, Vermeylen J: Dual regulation of phospholipase C activity by G-proteins. *News Physiol. Sci.* **8**, 61-63 (1993)
- [10] Hrbasova M, Novotny J, Hejnova L, Kolar F, Neckar J, Svoboda P: Altered myocardial Gs protein and adenylyl cyclase signaling in rats exposed to chronic hypoxia and normoxic recovery. *J. Appl. Physiol.* **94**, 2423-32 (2003)
- [11] Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Uozumi H, Kadowaki T, Yazaki Y: Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **274**, 9760-70 (1999)
- [12] Kilts JD, Gerhardt, MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwtnn, DA Kwatra MM: β_2 -adrenergic and several other G-protein-coupled receptors in

human atrial membranes activate both Gs and Gi. *Circulation Res.* **87**, 705–709 (2000)

[13] Vasquez C, Lewis DL: The beta2-adrenergic receptor specifically sequesters Gs but signals through both Gs and Gi/o in rat sympathetic neurons. *Neuroscience* **118**, 603-10 (2003)

[14] Denninger JW, Marletta, MA: Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochem. Biophys. Acta* **1411**, 334-350 (1999)

[15] Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Sienaert I, Bootman MD, Casteels R: Control of the Ca²⁺ release induced by myo-inositol trisphosphate and the implication in signal transduction. *Subcell. Biochem.* **26**, 59-95 (1996)

[16] Davis MA, Carbott DE. Herbimycin A and geldanamycin inhibit okadaic acid-induced apoptosis and p38 activation in NRK-52E renal epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **161**, 59-74 (1999)

[17] Yang EB, Wang DF, Mack P, Cheng LY. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, reduces EGF-induced EGF receptor internalization and degradation in human hepatoma HepG2 cells: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 309-17 (1996)

[18] Stork PJ, Schmitt JM: Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends. Cell. Biol.* **12**, 258-66 (2002)

[19] Hanke S, Nurnberg B, Groll DH, Liebmann C: Cross talk between beta-adrenergic and bradykinin B(2) receptors results in cooperative regulation of cyclic AMP accumulation and mitogen-activated protein kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8452-60 (2001)

[20] Ewald DA, Williams A, Levitan IB: Modulation of single Ca²⁺-dependent K⁺-channel activity by protein phosphorylation. *Nature* **315**, 503-6 (1985)

[21] Reinhart PH, Chung S, Martin BL, Brautigan DL, Levitan IB: Modulation of calcium-activated potassium channels from rat brain by protein kinase A and phosphatase 2A. *J. Neurosci.* **11**, 1627-35 (1991)

[22] Curtis BM, Catterall WA. Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 2528-32 (1985)

- [23] Tilly BC, Winter MC, Ostedgaard LS, O'Riordan C, Smith AE, Welsh MJ: Cyclic AMP-dependent protein kinase activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **267**, 9470-3 (1992)
- [24] Li M, West JW, Lai Y, Scheuer T, Catterall WA: Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* **8**, 1151-9 (1992)
- [25] Winklhofer M, Matthias K, Seifert G, Stocker M, Sewing S, Herget T, Steinhauser C, Saaler-Reinhardt S: Analysis of phosphorylation-dependent modulation of Kv1.1 potassium channels. *Neuropharmacology* **44**, 829-42 (2003)
- [26] Peretz A, Sobko A, Attali B: Tyrosine kinases modulate K⁺ channel gating in mouse Schwann cells. *J. Physiol.* **519**, 373-84 (1999)
- [27] Tiran Z, Peretz A, Attali B, Elson A: Phosphorylation-dependent regulation of Kv2.1 Channel activity at tyrosine 124 by Src and by protein-tyrosine phosphatase epsilon. *J. Biol. Chem.* **278**, 17509-14 (2003)
- [28] Chung I, Schlichter LC: Native Kv1.3 channels are upregulated by protein kinase C. *J. Membr. Biol.* **156**, 73-85 (1997)
- [29] Cai YC, Douglass J.: In vivo and in vitro phosphorylation of the T lymphocyte type n (Kv1.3) potassium channel. *J. Biol. Chem.* **268**, 23720-7 (1993)
- [30] Bowlby MR, Fadool DA, Holmes TC, Levitan IB: Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J. Gen. Physiol.* **110**, 601-10 (1997)
- [31] Fadool DA, Holmes TC, Berman K, Dagan D, Levitan IB: Tyrosine phosphorylation modulates current amplitude and kinetics of a neuronal voltage-gated potassium channel. *J. Neurophysiol.* **78**, 1563-73 (1997)
- [32] Szabo I, Gulbins E, Apfel H, Zhang X, Barth P, Busch AE, Schlottmann K, Pongs O, Lang F: Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* **271**, 20465-9 (1996)
- [33] Breitwieser GE: G protein-mediated ion channel activation. *Hypertension* **17**, 684-92 (1991)

- [34] Pelleg A, Porter RS: The pharmacology of adenosine. *Pharmacotherapy* **10**, 157-74 (1990)
- [35] Belardinelli L, Giles WR, West A: Ionic mechanisms of adenosine actions in pacemaker cells from rabbit heart. *J. Physiol.* **405**, 615-33 (1988)
- [36] Martynyuk AE, Zima A, Seubert CN, Morey TE, Belardinelli L, Dennis DM: Potentiation of the negative dromotropic effect of adenosine by rapid heart rates: possible ionic mechanism. *Basic Res. Cardiol.* **97**, 295-304 (2002)
- [37] Donahue JK, Orias D, Berger RD, Tomaselli GF, Lawrence JH, Calkins H: Comparison of adenosine effects on atrioventricular node reentry and atrioventricular reciprocating tachycardias. *Clin. Cardiol.* **21**, 743-5 (1998)
- [38] Yada T, Richmond KN, Van Bibber R, Kroll K, Feigl EO: Role of adenosine in local metabolic coronary vasodilation. *Am. J. Physiol.* **276**, 1425-33 (1999)
- [39] Brodmann M, Stelzer I I, Friedl I I, Lueger A, Pilger E, Stark G: Comparison of the Effect of Prostaglandin E(1), Prostacycline and Adenosine on Peripheral Vascular Resistance. *Int. J. Angiol.* **10**, 31-33 (2001)
- [40] Brand A, Vissienon Z, Eschke D, Nieber K: Adenosine A(1) and A(3) receptors mediate inhibition of synaptic transmission in rat cortical neurons. *Neuropharmacology* **40**, 85-95 (2001)
- [41] Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M: Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **46**, 143-56 (1994)
- [42] Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C: Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell. Signal.* **14**, 99-108 (2002)
- [43] Asano T, Shinohara H, Morishita R, Norota I, Kato K, Endoh M: The G-protein G(o) in mammalian cardiac muscle: localization and coupling to A1 adenosine receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**, 183-9 (1995)

- [44] Shim JO, Shin CY, Lee TS, Yang SJ, An JY, Song HJ, Kim TH, Huh IH, Sohn UD: Signal transduction mechanism via adenosine A1 receptor in the cat esophageal smooth muscle cells. *Cell. Signal.* **14**, 365-72 (2002)
- [45] McIntire WE, MacCleery G, Garrison JC: The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2A adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 15801-9 (2001)
- [46] Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-92 (1998)
- [47] Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**, 527-52 (2001)
- [48] Hein TW, Wang W, Zoghi B, Muthuchamy M, Kuo L: Functional and molecular characterization of receptor subtypes mediating coronary microvascular dilation to adenosine. Functional and molecular characterization of receptor subtypes mediating coronary microvascular dilation to adenosine. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 271-82 (2001)
- [49] Ford WR, Maddock HL, Buckingham RE, Broadley KJ: Differences between the vasorelaxant activity of adenosine-receptor agonists on guinea-pig isolated aorta precontracted with noradrenaline or phenylephrine. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 1183-90 (1999)
- [50] Shin HK, Shin YW, Hong KW: Role of adenosine A(2B) receptors in vasodilation of rat pial artery and cerebral blood flow autoregulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, 339-44 (2000)
- [51] Nayeem MA, Mustafa SJ: Protein kinase C isoforms and A1 adenosine receptors in porcine coronary smooth muscle cells. *Vascul. Pharmacol.* **39**, 47-54 (2002)
- [52] McCormack DG, Clarke B, Barnes PJ: Characterization of adenosine receptors in human pulmonary arteries. *Am. J. Physiol.* **256**, 41-6 (1989)
- [53] Pelzmann B, Schaffer P, Machler H, Rigler B, Koidl B: Adenosine inhibits the L-type calcium current in human atrial myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **351**, 293-7 (1995)

- [54] Phillis, J W: Adenosine in the control of the cerebral circulation. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1**, 26-54 (1989)
- [55] Coney AM, Marshall JM: Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. *J. Physiol.* **509**, 507-18 (1998)
- [56] Bryan PT, Marshall JM: Cellular mechanisms by which adenosine induces vasodilatation in rat skeletal muscle: significance for systemic hypoxia. *J. Physiol.* **514**, 163-75 (1999)
- [57] Collis MG: Adenosine relaxes the aorta by interacting with an A₂ receptor and an intracellular site. *Eur. J. Pharmacol.* **96**, 61-69 (1983)
- [58] Szentmiklosi AJ, Ujfalusi A, Cseppento A, Nosztray K, Kovacs P, Szabo JZ: Adenosine receptors mediate both contractile and relaxant effects of adenosine in main pulmonary artery of guinea pigs. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **351**, 417-425 (1997)
- [59] Dickenson JM, Hill SJ: Intracellular cross-talk between receptors coupled to phospholipase C via pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins in DDT1-MF2 cells. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 719-724 (1993)
- [60] King BF, Pintor J, Wang S, Zigashin U, Zigashina LE and Burnstock GA: Novel P1 purinoceptor activates an outward K⁺ current in follicular oocytes of *Xenopus laevis*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 93-100 (1996)
- [61] Martynyuk AE, Kane KA, Cobbe SM and Rankin AC: Adenosine increases potassium conductance in isolated rabbit atrioventricular nodal myocytes. *Cardiovas. Res.* **30**, 668-675 (1995)
- [62] Ralevic V and Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-492 (1998)
- [63] Heaps CL, Bowles DK: Gender-specific K(+) -channel contribution to adenosine-induced relaxation in coronary arterioles. *J. Appl. Physiol.* **92**, 550-8 (2002)
- [64] Price, JM, Cabell F, and Hellerman A: Inhibition of cAMP mediated relaxation in rat coronary vessels by block of Ca⁺⁺ activated K⁺ channels. *Life Sci.* **58**, 2225-2232 (1996)
- [65] Shimizu S, Yokoshiki H, Sperelakis N, Paul RJ. Role of voltage-dependent and Ca(2+)-activated K(+) channels on the regulation of isometric force in porcine coronary artery. *J. Vasc. Res.* **37**, 16-25 (2000)

- [66] Hein, TW, and Kuo L: cAMP-independent dilation of coronary arterioles to adenosine: role of nitric oxide, G proteins, and K_{ATP} channels. *Circ. Res.* **85**, 634-642 (1999)
- [67] Cabell, F, Weiss DS, and Price JM. Inhibition of adenosine-induced coronary vasodilation by block of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **267**, 1455-1460 (1994)
- [68] Kuo, L, and Chancellor JD: Adenosine potentiates flow-induced dilation of coronary arterioles by activating K_{ATP} channels in endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **269**, 541-549 (1995)
- [69] Márián T, Lehel S, Lengyel Z, Balkay L, Horvath G, Mikecz P, Miklovicz T, Fekete I, Szentmiklósi AJ: The [18F]-FNECA serves as a suitable radioligand for PET investigation of purinergic receptor expression. *Orv. Hetil.* **143**, 1319-22 (2002)
- [70] Lehel Sz, Horváth G, Boros I, Mikecz P, Márián T, Szentmiklósi AJ, Trón L: Synthesis of 5-N-(2-[F18]Fluoroethyl)-carboxamidoadenosine: A promising tracer for investigation of adenosine receptor system by PET technique. *J. Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals* **43**, 807-815 (2000)
- [71] Morisawa M: Cell signalling mechanism for sperm motility. *Zool. Sci.* **11**, 647-662 (1994)
- [72] Morisawa M, Suzuki K: Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* **210**, 1145-1147 (1980)
- [73] Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Morisawa S, Yasuda K: Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.* **107**, 95-103 (1983)
- [74] Billard R, Cosson J, Percec G, Linhart O: Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* **129**, 95-112 (1995)
- [75] Hoffman EK, Dunham PB: Membrane mechanism and intracellular signalling in cell volume regulation. *Int. Rev. Cytol.* **161**, 173-262 (1995)
- [76] Percec G, Jeulin C, Cosson J, Andre F, Billard R: Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa: *J. Cell Sci.* **108**, 747-753 (1995)

- [77] Oda A, Morisawa M: Rises of intracellular Ca²⁺ and pH mediate the initiation of sperm motility by hiperosmolality in marine teleosts: Cell Motil. Cytoskeleton **25**, 171-178 (1993)
- [78] Takai H, Morisawa M: Changes in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. J. Cell Sci. **108**, 1175-1181 (1995)
- [79] Yoshida M, Inaba K, Morisawa M: Sperm chemotaxis during the process of fertilization in the ascidians *Ciona savigny* and *Ciona intestinalis*. Dev. Biol. **157**, 497-506 (1993)
- [80] Yoshida M, Inaba K, Ishida K, Morisawa M: Calcium and cyclic AMP mediate sperm activation, but Ca²⁺ alone contributes sperm chemotaxis in the Ascidian *Ciona savigny*. Dev. Growth Differ. **36**, 589-595 (1994)
- [81] Garbers DL, Kopf GS: The regulation of spermatozoa by calcium cyclic nucleotides: Adv. Cyclic Nucleotid Res. **13**, 251-306 (1980)
- [82] Cross NL: Role of cholesterol in sperm capacitation: Biol. Reprod. **59**, 7-11 (1998)
- [83] Visconti PE, Kopf GS: Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitaion: Biol. Reprod. **59**, 1-6 (1998)
- [84] Quill TA, Ren D, Clapham DE, Garbers DL: A voltage gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. **98**, 11527-12531 (2001)
- [85] Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I: Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺-entry into sperm. J. Cell Biol. **142**, 473-484 (1998)
- [86] Serrano CJ, Trevino CL, Felix R, Darszon A: Voltage-dependent Ca²⁺ channel subunit expression and immunolocalization in mouse spermatogenic cells and sperm. FEBS Lett. **462**, 171-176 (1999)
- [87] Westenbroek RE, Babcock DF: Discrete regional distributions suggest diverse functional roles of calcium channel alpha1 subunits in sperm. Dev. Biol. **207**, 457-469 (1999)

- [88] Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM: Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 499-502 (2001)
- [89] Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM: Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 6757-6762 (1999)
- [90] Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF: CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca^{2+} channels in depolarization-evoked entry of Ca^{2+} into mouse sperm. *J. Biol. Chem.* **275**, 21210-21217 (2000)
- [91] Krasznai Z, Márián T, Balkay L, Gáspár R, Tron L, Morisawa M: Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} -channels, leading to Ca^{2+} -influx, and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2052-2057 (2000)
- [92] Jagannathan S, Publicover S, Barratt CL: Voltage operated calcium channels in male germ cells. *Reproduction* **123**, 203-215 (2002)
- [93] Sachs F, Sokabe M: Stretch-activated ion channels and membrane mechanics. *Neurosci. Res.* **12**, 1-4 (1990)
- [94] Yang XC, Sachs F: Mechanically sensitive, nonselective cation channels. *EXS* **66**, 79-92 (1993)
- [95] Chen Y, Simasko SM, Niggel J, Sigurdson WJ, Sach F: Ca^{2+} uptake in GH3 cell during hypotonic swelling: the sensory role of stretch activated ion channels. *Am. J. Physiol.* **270**, 1790-1798 (1996)
- [96] Caldwell RA, Clemo HF, Baumgarten CM: Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am. J. Physiol.* **275**, 619-621 (1998)
- [97] Vandorpe DH, Small DL, Dabrowski AR, Morris CE: FMRF-amide and membrane stretch as activators of the *Aplysa*. *Biophys. J.* **66**, 46-58 (1994)
- [98] Biaggi BA, Enyeart JJ: Gadolinium blocks low- and high threshold calcium currents in pituitary cells: *Am. J. Physiol.* **259**, 515-520 (1990)

- [99] Hongo K, Pascarel O, Cazorla F, Gannier JY, Guennec L, White E: Gadolinium blocks the delayed rectifier potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Exp. J. Physiol.* **82**, 647-656 (1997)
- [100] Yang XC, Sachs F: Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* **243**, 1068-1071 (1989)
- [101] Cook SP, Brokaw CJ, Muller CH, Babcock DF. Sperm chemotaxis: Egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev. Biol.* **165**, 10-19 (1994)
- [102] Yoshida M, Inaba K, Ishida K, Morisawa M: Calcium and cyclic AMP mediate sperm activation, but Ca^{2+} alone contributes sperm chemotaxis in the *Ascidian Ciona savigny*. *Dev. Growth. Differ.* **36**, 589-595 (1994)
- [103] Morisawa M, Okuno M: Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature* **295**, 703-704 (1982)
- [104] Bene, L., M. Balázs, J. Matkó, J. Möst, M.P. Dierich, J. Szöllösi, and S. Damjanovich. Lateral organization of the ICAM-1 molecule at the surface of human lymphoblasts: a possible model for its co-distribution with the IL-2 receptor, class I and class II HLA molecules. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2115-2123 (1994)
- [105] Mátyus, L., L. Bene, H. Heiligen, J. Rausch, and S. Damjanovich. Distinct association of transferrin receptor with HLA class I molecules on HUT-102B and JY cells. *Immunol. Lett.* **44**, 203-208 (1995)
- [106] Damjanovich, S., J. Matkó, L. Mátyus, G.Jr. Szabó, J. Szöllösi, J.C. Pieri, T. Farkas, and R.Jr. Gáspár. Supramolecular receptor structures in the plasma membrane of lymphocytes revealed by flow cytometric energy transfer, scanning force- and transmission electron-microscopic analyses. *Cytometry* **33**, 225-233 (1998)
- [107] Damjanovich, S., L. Bene, J. Matkó, L. Mátyus, Z. Krasznai, G.Jr. Szabó, C. Pieri, R.Jr. Gáspár, and J. Szöllösi. Two-dimensional receptor patterns in the plasma membrane of cells. A critical evaluation of their identification, origin and information content. *Biophys. Chem.* **82**, 99-108 (1999)

- [108] Vereb, G., J. Matkó, G. Vámosi, S.M. Ibrahim, E. Magyar, S. Varga, J. Szöllősi, A. Jenei, R.Jr. Gáspár, T.A. Waldmann, and S. Damjanovich. Cholesterol-dependent clustering of IL-2R α and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6013-6018 (2000)
- [109] Bacsó, Z., L. Bene, L. Damjanovich, and S. Damjanovich. IFN- γ rearranges membrane topography of MHC-I and ICAM-1 in colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **290**, 635-640 (2002)
- [110] Matkó, J., A. Bodnár, G. Vereb, L. Bene, G. Vámosi, G. Szentesi, J. Szöllősi, V. Horejší, R. Gáspár Jr., T.A. Waldmann, and S. Damjanovich. GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1199-1208 (2002)
- [111] Simons, K., and D. Toomre. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev. Molec. Cell. Biol.* **1**, 31-39 (2000)
- [112] DiSanto, J.P. Cytokines: shared receptors, distinct functions. *Curr. Biol.* **7**, R424-R426 (1997)
- [113] Nelson, B.H., and D.M. Willerford. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv. Immunol.* **70**, 1-81 (1998)
- [114] Wade, W.F., J. Davoust, J. Salamero, P. André, T.H. Watts, and J.C. Cambier. Structural compartmentalization of MHC class II signaling function. *Immunol. Today* **14**, 539-546 (1993)
- [115] Skov, S., M. Nielsen, S. Bregenholt, N. Ødum, and M.H. Claesson. Activation of Stat-3 is involved in the induction of apoptosis after ligation of Major Histocompatibility Complex class I molecules on human Jurkat T cells. *Blood* **91**, 3566-3573 (1998)
- [116] Huby, R.D.J., R.J. Dearman, and I. Kimber. Intracellular phosphotyrosine induction by Major Histocompatibility Complex Class II requires co-aggregation with membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **274**, 22591-22596 (1999)
- [117] Tsong, T.Y. and R.D. Astumian. Electroconformational coupling and membrane protein function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **50**, 1-20 (1987)

- [118] Chandy, K.G., T.E. DeCoursey, M.D. Cahalan, C. McLaughlin, and S. Gupta. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **160**, 369-385 (1984)
- [119] Mátyus, L., C. Pieri, R. Recchioni, F. Moroni, L. Bene, L. Trón, and S. Damjanovich. Voltage gating of Ca^{2+} -activated potassium channels in human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **171**, 325-329 (1990)
- [120] Damjanovich, S., and C. Pieri. Electro-immunology: membrane potential, ion-channel activities and stimulatory signal transduction in human T lymphocytes from young and elderly. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **621**, 29-39 (1991)
- [121] Damjanovich, S., C. Pieri, and L. Trón. Ion channel activity and transmembrane signalling in lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **605**, 205-210 (1992)
- [122] Damjanovich, S., J. Szöllösi, and L. Trón. Transmembrane signalling in T cells. *Immunol. Today* **13**, A12-A15 (1992)
- [123] Bacsó, Z., J. Matkó, J. Szöllösi, R.Jr. Gáspár, and S. Damjanovich. Changes in membrane potential of target cells promotes cytotoxic activity of effector T lymphocytes. *Immunol. Lett.* **51**, 175-180 (1996)
- [124] Koo, G.C., J.T. Blake, A. Talento, M. Nguyen, S. Lin, A. Sirotna, K. Shah, K. Mulvany, D.Jr. Hora, P. Cunningham, D.L. Wunderler, O.B. McManus, R. Slaughter, R. Bugianesi, J. Felix, M. Garcia, J. Williamson, G. Kaczorowski, N.H. Sigal, M.S. Springer, and W. Feeney. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J. Immunol.* **158**, 5120-5128 (1997)
- [125] Jensen, B.S., N. Ødum, N.K. Jørgensen, P. Christophersen, and S.-P. Olesen. Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 10917-10921 (1999)
- [126] Pieri, C., Z. Bacsó, R. Recchioni, F. Moroni, M. Balázs, R.Jr. Gáspár, and S. Damjanovich. Bretylium differentiates between distinct signal transducing pathways in human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **190**, 654-659 (1992)
- [127] Bene, L., J. Szöllösi, M. Balázs, L. Mátyus, R. Jr. Gáspár, M. Ameloot, R.E. Dale, and S. Damjanovich. Major Histocompatibility Class I Protein Conformation Altered by Transmembrane Potential Changes. *Cytometry* **27**, 353-357 (1997)

- [128] Holmes, T. C., K. Berman, J.E. Swartz, D. Dagan, and I.B. Levitan. Expression of voltage-gated potassium channels decreases cellular protein tyrosine phosphorylation. *J. Neuroscience* **17**, 8964-8974 (1997)
- [129] Martel, J., G. Dupuis, P. Deschênes, M.D. Payet. The sensitivity of the human Kv1.3 (hKv1.3) lymphocyte K⁺ channel to regulation by PKA and PKC is partially lost in HEK 293 host cells. *J. Membrane Biol.* **161**, 183-196 (1998)
- [130] Martens, J.R., R. Navarro-Polanco, E.A. Coppock, A. Nishiyama, L. Parshley, T.D. Grobaski, and M.M. Tamkun. Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **275**, 7443-7446 (2000)
- [131] Haugh, J.M., and D.A. Lauffenburger. Physical modulation of intracellular signaling processes by locational regulation. *Biophys. J.* **72**, 2014-2031 (1997)
- [132] Haugh, J.M. A unified model for signal transduction reactions in cellular membranes. *Biophys. J.* **82**, 591-604 (2002)
- [133] Norris JS, Kohler PO: Androgen receptors in a Syrian hamster ductus deferens tumour cell line. *Nature* **248**, 422-424 (1974)
- [134] Gerwins P, Nordstedt C, Fredholm BB: Characterisation of adenosine A₁ receptors in intact DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **38**, 660-666 (1990)
- [135] Ramkumar V, Barrington WW, Jacobson KA and Stiles GL: Demonstration of both A₁ and A₂ adenosine receptors in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **37**, 149-156 (1990)
- [136] Molleman A, Nelemans A, van den Akker J, Duijn M, den Hertog A: Voltage dependent sodium and potassium, but no calcium conductances in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* **417**, 479-484 (1991)
- [137] Márián T, Krasznai Z, Balkay L, Balázs M, Emri M, Bene L, Trón L: Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. *Histochem. Cytochem.* **41**, 291-297 (1993)
- [138] Molleman A, Nelemans A, den Hertog A: P₂-purinoceptor-mediated membrane currents in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **169**, 167-174 (1989)

- [139] Márián T, Boros I, Lengyel Z, Balkay L, Horváth G, Emri M, Sarkadi É, Szentmiklósi J, Fekete I, Trón L: Preparation and primary evaluation of [¹¹C]CSC as a possible tracer for mapping adenosine A_{2A} receptors by PET. *Appl. Rad. Isot.* **50**, 1-7 (1998)
- [140] Krasznai Z, Márián T, Balkay L, Emri M, Trón L: Flow cytometric determination of absolute membrane potential of cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **28**, 93-99 (1995)
- [141] Miller VM, Vanhoutte PM: Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am. J. Physiol.* **248**, H432-H437 (1985)
- [142] Péter, Jr.M., P. Hajdu, Z. Varga, S. Damjanovich, L.D. Possani, G. Panyi, and R.Jr. Gáspár. Blockage of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **278**, 34-37 (2000)
- [143] Goldstein, S. A. N., and C. Miller. Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys. J.* **65**, 1613-1619 (1993)
- [144] Barnstable, C.J., W.F. Bodmer, G. Brown, G. Galfré, C. Milstein, A.F. Williams, and A. Ziegler. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens - New tools for genetic analysis. *Cell* **14**, 9-20 (1978)
- [145] Tanabe, M., M. Sekimata, S. Ferrone, and M. Takiguchi. Structural and functional analysis of monomorphic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with HLA class I alpha 3 domain. *J. Immunol.* **148**, 3202-3209 (1992)
- [146] Lampson, L.A., and R. Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* **125**, 293-299 (1980)
- [147] Trón, L., J. Szöllösi, S. Damjanovich, S.H. Helliwell, D.J. Arndt-Jovin, and T.M. Jovin. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. *Biophys. J.* **45**, 939-946 (1984)
- [148] Trón, L. Experimental methods to measure fluorescence resonance energy transfer processes. Chapter 1. *In: Mobility and proximity in biological membranes.* Eds: S. Damjanovich, J. Szöllösi, L. Trón, and M. Edidin. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo 1-47 (1994)

- [149] Szöllösi, J., S. Damjanovich, M. Balázs, P. Nagy, L. Trón, M.J. Fulwyler, and F.M. Brodsky. Physical association between MHC class I and class II molecules detected on the cell surface by flow cytometric energy transfer. *J. Immunol.* **143**, 208-213 (1989)
- [150] Matkó, J, and M. Edidin. Energy transfer methods for detecting molecular clusters on cell surfaces. *In: Methods Enzymol.* **278**:444-462. (1997)
- [151] Mátyus, L. Fluorescence resonance energy transfer measurements on cell surfaces. A spectroscopic tool for determining protein interactions. *J. Photochem. Photobiol. B* **12**, 323-337 (1992)
- [152] Izumi H, Márián T, Inaba K, Oka Y, Morisawa M: Membrane hyperpolarization by sperm activating and attracting factor (SAAF) increase cAMP level and activates sperm motility in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Dev. Biol.* **213**, 246-253 (1999)
- [153] Schütz, G.J., J. Hesse, G. Freudenthaler, V.Ph. Pastushenko, H.-G. Knaus, B. Pragl, and H. Schindler. 3D mapping of individual ion channels on living cells. *Single Mol.* **1**, 153-157 (2000)
- [154] Gáspár, Jr.R., L. Bene, S. Damjanovich, C. Muñoz-Garay, E.S. Calderon-Aranda, and L. D. Possani. β -scorpion toxin 2 from *Centruroides noxius* blocks voltage-gated K^+ channels in human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **213**, 419-423 (1995)
- [155] Péter, Jr. M., Z. Varga, G. Panyi, L. Bene, S. Damjanovich, C. Pieri, L.D. Possani, and R. Jr. Gáspár. *Pandinus imperator* Scorpion Venom Blocks Voltage-Gated K^+ Channels in Human Lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **242**, 621-625 (1998)
- [156] Péter, Jr.M., Z. Varga, P. Hajdu, R.Jr. Gáspár, S. Damjanovich, E. Horjales, L.D. Possani, and G. Panyi. Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J. Membrane Biol.* **179**, 13-25 (2001)
- [157] Jürgens, L., A. Nichtl, and U. Werner. Electron density imaging of protein films on gold-particle surfaces with transmission electron microscopy. *Cytometry* **37**, 87-92 (1999)
- [158] Schnitzer, J.E. Analysis of steric partition behavior of molecules in membranes using statistical physics. Application to gel chromatography and electrophoresis. *Biophys. J.* **54**, 1065-1076 (1988)

- [159] Tong, J., and J.L. Anderson. Partitioning and diffusion of proteins and linear polymers in polyacrylamide gels. *Biophys. J.* **70**, 1505-1513 (1996)
- [160] Minton. Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity. *Biophys. J.* **63**, 1090-1100 (1992)
- [161] Han, J., and J. Herzfeld. Macromolecular diffusion in crowded solutions. *Biophys. J.* **65**, 1155-1161 (1993)
- [162] Tomadakis, M.M., and S.V. Sotirchos. Transport properties of random arrays of freely overlapping cylinders with various orientation distributions. *J. Chem. Phys.* **98**, 616-626 (1993)
- [163] Phillips, R.J. A hydrodynamic model for hindered diffusion of proteins and micelles in hydrogels. *Biophys. J.* **79**, 3350-3354 (2000)
- [164] Berg, H.C., and E.M. Purcell. Physics of chemoreception. *Biophys. J.* **20**, 193-219 (1977)
- [165] Axelrod, D., and M.D. Wang. Reduction-of-dimensionality kinetics at reaction-limited cell surface receptors. *Biophys. J.* **66**, 588-600 (1994)
- [166] Dart C, Standen NB: Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J. Physiol. (Lond)* **471**, 767-786 (1993)
- [167] Kleppisch T, Nelson MT: Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A₂ receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 12441-12445 (1995)
- [168] Xu L, Enyeart JJ: Adenosine inhibits a non-inactivating K⁺-current in bovine adrenal cortical cells by activation of multiple P₁ receptors. *J. Physiol. (Lond)* **521**, 81-97 (1999)
- [169] Cooper DMF, Schell MJ, Thorn P, Ivine RF: Regulation of adenylyl cyclase by membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273**, 27703- 27707 (1998)
- [170] Beltran C, Zapatta O, Darszon A: Membrane potential regulates sea urchin sperm adenylyl cyclase. *Biochemistry* **35**, 7591-7598 (1996)
- [171] Reddy R, Smith D, Wayman G, Wu Z, Villacres EC, Storm D: Voltage-sensitive adenylyl cyclase activity in cultured neurons. *J. Biol. Chem.* **46**, 143-153 (1995)

- [172] Stinnakre J, Van Renterghem, C: Cyclic adenosine monophosphate, calcium, acetylcholine, and the current induced by adenosine in the *Xenopus* oocyte. *J. Physiol. (Lond)* **374**, 551-569 (1986)
- [173] Cosson MP, Cosson J, Billard R. Rise of internal Ca^{2+} accompanies the initiation of trout sperm motility. *Cell Motil. Cytoskeleton* **14**, 424-434 (1989)
- [174] Boitano S, Omoto CK. Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca^{2+} . *Cell Motil. Cytoskeleton* **21**, 74-82 (1992)
- [175] Morton B, Harrigan-Lum J, Albagli L, Joss T. The activation of motility in quiescent hamster sperm from epididymis by calcium and cyclic nucleotids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 372-379 (1974)
- [176] Perchee PG, Gatti JL, Cosson J, Jeulin C, Fierville F, Billard R: Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **110**, 315-327 (1997)
- [177] Hamil OP, McBride DW: The pharmacology of mechanogated ion channels. *Pharmacol. Rev.* **48**, 231-252 (1996)
- [178] Nakamura TY, Iwata Y, Sampaolesi M, Hanada H, Saito N, Artman M, Coetzee WA, Shigekawa M: Stretch activated cation channels in skeletal muscle myotubes from sarcoglycan-deficient hamsters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, 690-699 (2001)
- [179] Sukharev S, Betanzos M, Chiang CS, Guy R: The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* **409**, 720-724 (2001)
- [180] Garbers DL: Swimming with sperm. *Nature* **413**, 579-582 (2001)
- [181] Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE: A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603-609 (2001)
- [182] Ermakov YA, Averbakh AZ, Sukharev SI: Lipid and cell membranes in the presence of gadolinium and other ions with high affinity to lipids. 1. Dipole and diffuse components of the boundary potential. *Membr. Cell. Biol.* **11**, 539-554 (2001)

- [183] Cantor RS: Solute modulation of conformational equilibria in intrinsic membrane proteins: apparent “cooperativity” without binding. *Biophys. J.* **77**, 2643-2647 (1999)
- [184] Li X, Zhang Y, Ni J, Chen J, Hwang F: Effect of lanthanide ions on the phase behaviour of dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar liposomes. *J. Inorg. Biochem.* **53**, 139-149 (1994)
- [185] Perchee PG, Cosson MP, Cosson J, Jeulin C, Billard R: Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. *Cell Motil. Cytoskeleton* **35**, 113-120 (1996)
- [186] Murphy, R.M, H. Slayter, P. Schurtenberger, R.A. Chamberlin, C.K. Colton, M.L. Yarmush. Size and structure of antigen-antibody complexes. *Biophys. J.* **54**, 45-56 (1988)
- [187] Kiss, E., Cs. Balázs, L. Bene, S. Damjanovich, and J. Matkó. Effect of TSH and anti-TSH receptor antibodies on the plasma membrane potential of polymorphonuclear granulocytes. *Immunol. Lett.* **55**, 173-177 (1997)
- [188] Levite M., L. Cahalon, A. Peretz, R. Hershkovicz, A. Sobko, A. Ariel, R. Desai, B. Attali, and O. Lider. Extracellular K⁺ and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and β_1 integrins. *J. Exp. Med.* **191**, 1167-1176 (2000)
- [189] Levite. M. Nervous immunity: neurotransmitters, extracellular K⁺ and T-cell function. *Trends in Immunology* **22**, 2-5 (2001)
- [190] Skov, S., P. Klausen, and M.H. Claesson. Ligation of Major Histocompatibility Complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. *J. Cell. Biol.* **139**, 1523-1531 (1997)
- [191] Altomonte, M., C. Pucillo, and M. Maio. The overlooked "nonclassical" functions of Major Histocompatibility Complex (MHC) class II antigens in immune and nonimmune cells. *J. Cell. Physiol.* **179**, 251-256 (1999)
- [192] Drénou, B., V. Blancheteau, D.H. Burgess, R. Fauchet, D.J. Charron, and N.A. Mooney. 1999. A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J. Immunol.* **163**, 4115-4124 (1999)

[193] Hille, B. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc.,
Sunderland, MA

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni a doktori- (Ph.D-) dolgozatom megírásához kapcsolódó munkámhoz nyújtott segítségéért Dr. Krasznai Zoltán témavezetőmnek és a **DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet**ben Dr. Bene Lászlónak a toxin-kötődés gátlásának vizsgálatakor nyújtott segítségéért, Prof. Damjanovich Sándornak a T-limfóma sejteken végzett munka támogatásáért, Prof. Gáspár Rezsőnek a feszültségfüggő káliumcsatornákkal összefüggő mérések támogatásáért.

Szeretném ezúton megköszönni a segítségét továbbá Dr. Somodi Sándornak és Dr. Hajdú Péternek a patch-clamp mérések kivitelezéséhez nyújtott tanácsokért, Bagdány Miklósnak a molekuláris biológiai konzultációkért és általában a **Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet** valamennyi munkatársának.

A **DEOEC Gyógyszertani Intézet**ének munkatársai közül Dr. Szentmiklósi Józsefnek és Cseppentő Ágnesnek szeretném megköszönni segítségüket az adenosin-analógok szöveteken kifejtett hatásának vizsgálatával kapcsolatban.

A **DEOEC PET Centrum**ának munkatársai közül Dr. Márián Teréznek az ¹⁸F-NECA-val kapcsolatos mérésekben folytatott tudományos együttműködésért, Dr. Lehel Szabolcsnak az ¹⁹F-NECA és ¹⁸F-NECA szintézisében játszott szerepéért, Prof. Trón Lajosnak a PET Centrum Radiokémiai Laboratóriumában előállított anyagok használatáért.

A **Misaki Tengerbiológiai Intézet** (Tokió, Japán) munkatársai közül Maasaki Morisawa, Kazuo Inaba és Sachiko Morisawa kutatóknak a spermiumok aktiválódási folyamatai kapcsán nyújtott segítségükért.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

Rubovszky B, Szentmiklósi AJ, Márián T, Cseppentő Á, Gesztelyi R, Székely A, Forizs F, Gáspár R, Trón L and Krasznai Z: Comparative pharmacological studies on the A₂ adenosine receptor agonist 5'-n-ethyl-carboxamidoadenosine and its F¹⁹ isotope labelled derivate. *J. Pharmacol. Sci.* 93, 356-363 (2003)

Márián T, **Rubovszky B**, Szentmiklósi AJ, Trón L, Balkay L, Boros I, Gáspár R, Székely A, Krasznai Z: A₁ and A₂ adenosine receptor activation inversely modulates potassium currents and membrane potential in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 89, 366-372 (2002)

Krasznai Z, Morisawa M, Krasznai ZT, Morisawa S, Inaba K, Bazsáné ZK, **Rubovszky B**, Bodnár B, Borsos A, Márián T: Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker inhibits osmosis-initiated motility of sea- and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55, 232-43 (2003)

Bálint Rubovszky, Péter Hajdú, Zoltán Krasznai, Rezső Gáspár, Thomas A Waldmann, Sándor Damjanovich, László Bene: Detection of channel proximity by nanoparticle assisted hindrance of toxin binding. *Eur. Biophys. J.* (2004) (folyamatban)