

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A T-sejtek kationcsatornáinak vizsgálata

Vörös Orsolya

Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

A T-sejtek kationcsatornáinak vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
Az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Vörös Orsolya okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudományok doktori iskolája
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr Hajdu Péter Béla, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat (online) időpontja: 2022. április 13. 11:00.

Az értekezés bírálói:

Dr. Matta Csaba, PhD
Dr. Szöllősi András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Mádi András, PhD
Dr. Matta Csaba, PhD
Dr. Szöllősi András, PhD

Az értekezés védésének (online) időpontja: 2022. április 13. 12:30.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a hajdup@med.unideb.hu email címre küldött üzenetében a vitát megelőző munkanap (2022. április 12.) 17 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. BEVEZETÉS

Az adaptív immunválasz egyik fontos lépése a T-sejtek aktivációja, melynek során a T-sejt és az antigén prezentáló sejt (APC) között kialakuló fizikai interakció a T-sejtek polarizációját eredményezi. Ez a sejtfelszíni fehérjék és jelátviteli molekulák felhalmozódáshoz vezet a T-sejt és APC között kialakult kontaktrégióban, ezáltal egy jól szervezett szignalizációs platformot kialakítva, melyet immunológiai szinapszisknak nevezünk. Az APC-vel való találkozáskor, az APC MHC molekuláján keresztüli antigén prezentáció hatására a T-sejt TCR/CD3 komplexe aktiválódik, amely különböző jelátviteli kaszkádokat indít el és eredményezi a T-sejt aktivációt. Ez a PLC (foszfolipáz C) aktiválódásához és IP_3 (inozitol 1,4,5-triszfoszfát) képződéséhez vezet. Az IP_3 az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában lévő IP_3 receptorhoz kötődik, melynek hatására Ca^{2+} áramlik ki a citoszólba az ER-ből. A CRAC csatorna a pórus-formáló Orai1 és az ER-rezidens STIM1 alegységekből épül fel. Az endoplazmatikus retikulumból felszabaduló Ca^{2+} okozta ER-beli raktárürülést a STIM1 érzékeli, konformációváltozáson megy keresztül, multimerizálódik és transzlokálódik a plazmamembránhoz, ahol összekapcsolódva a plazmamembránban elhelyezkedő Orai1-gyel aktiválja azt, mely az extracelluláris térből Ca^{2+} -beáramlást eredményez. A Ca^{2+} beáramláshoz a CRAC csatornák és a feszültség-kapuzott Kv1.3 és Ca^{2+} aktivált KCa3.1 kálium csatornák összehangolt működése szükséges. A kálium csatornák -40 és -50 mV közötti értéken stabilizálják a membránpotenciált, így biztosítják a hajtóerőt a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramláshoz, mely nélkülözhetetlen a Ca^{2+} -közvetített jelátvitelhez és a T-sejtek proliferációjához. Korábban leírták, hogy ezen ioncsatornák (Kv1.3, KCa3.1, CRAC) emelkedett expressziója figyelhető meg aktivált humán T-sejtekben, és szerepet játszanak a Ca^{2+} jel kialakulásában. A kálium csatornák szerepére egyértelmű bizonyíték, hogy az ioncsatornák működésének gátlása megakadályozza a Ca^{2+} jel kialakulását és a sejtek osztódását. A CRAC csatornák esetében az Orai1 alegység nem-vezető mutációja a T-sejtek teljes funkcióvesztéséhez vezet.

1.1 T-sejtek kation ioncsatornáinak jellemzői

Az ioncsatornák pórusformáló fehérjék, amelyek szinte minden sejt típusban megtalálhatóak, és lehetővé teszik különböző ionok gyors átjutását a membránon keresztül (plazma és intracelluláris organellek membránján is) az elektrokémiai gradiens irányában. Több ioncsatornát (például a legtöbb Na^+ , K^+ , Ca^{2+} csatornát) a feszültség, de például bizonyos K^+ és Cl^- csatornákat, a CRAC csatornát, TRP csatornákat, rianodin receptorokat és IP_3 receptorokat (melyek viszonylag feszültség-érzékenyek) másodlagos hírvivők és más intracelluláris és/vagy extracelluláris mediátorok

szabályoznak. A munkánk során a feszültség-függő Kv1.3 és a Ca²⁺ aktiválta CRAC csatorna Orai1 alegységével foglalkoztunk, ezért a továbbiakban ezeket tárgyaljuk részletesen.

1.1.1 A Kv1.3 csatorna jellemzői

A kálium csatornák nélkülözhetetlen szerepet játszanak a membránpotenciál beállításában és az intracelluláris jelátvitel szabályozásában különböző sejtekben. A feszültség-függő kálium csatornák négy alegységből állnak (a hetero- és homomerek egyaránt) a natív sejtekben és heterológ expressziós rendszerekben. Egy Kv csatorna alegység hat darab α -helikális transzmembrán szegmensből épül fel (S1-S6). A csatorna intracellulárisan elhelyezkedő N-terminális régiója tartalmazza a tetramerizációs ún. T1 domént, amely szükséges az egyes alegységek ER-ban történő összeszereléséhez. Ezen kívül a Kv β járulékos alegységek képesek az N-terminushoz kötődni, és lehetővé teszik több jelátviteli molekula (mint például kinázok) kapcsolódását. A Kv csatornák erősen konzervált pórus régióját az S5 és S6 közötti linker hozza létre, mely főként szelektivitási szűrőként funkcionál a K⁺ ionok számára. A negyedik transzmembrán szegmenst, amely számos pozitívan töltött aminosav részt tartalmaz, a Kv csatornák feszültség szenzorának tekintjük. A csatorna C-terminálisához különböző linker ill. adapter fehérjék kapcsolódhatnak, amelyek kihorganyozhatják a fehérjét a citoszkeletonhoz, vagy irányíthatják a csatorna kijutását a plazmamembránba.

1.1.2 Az Orai és STIM jellemzői

A T-sejt aktiváció kulcsfontosságú lépése a Ca²⁺-ionok CRAC csatornákon keresztüli beáramlása. Az ER Ca²⁺ raktárak kiürülését az endoplazmatikus retikulum membránjában elhelyezkedő STIM1 alegység érzékeli. A STIM1 ezután konformációs változásokon megy keresztül, multimerizálódik és transzlokálódik a plazmamembránhoz (PM), ahol aktiválja a PM-rezidens, Orai1 pórusképző domént. Az Orai1 két izoformával rendelkezik: a hosszabb az Orai1 α , amely 301 aminosavból (aa) áll, a rövidebb pedig az Orai1 β , amelyben hiányzik az α izoforma első 70 aminosavja. A vad típusú változatnak tekintett Orai1 α -csatorna hat alegységből áll. Minden alegység négy alfa-helikális transzmembrán domént (TM) tartalmaz, és intracelluláris N- és C-terminálokkal, valamint szelektivitási szűrővel rendelkezik a 106. pozícióban. A STIM1 CRAC aktivációs doménjének (CAD) és az Orai1 N- (73-91aa, α izoforma szerinti számozás) és C-terminális végén (342-448aa) lévő CAD kötő domének kölcsönhatása a csatorna nyitását eredményezi.

A STIM1 685 aminosavból álló, I-es típusú transzmembrán fehérje, amely nyugalmi állapotban az ER-ban helyezkedik el. Az ER Ca²⁺-raktár ürülése a STIM1 átrendeződését eredményezi az ER-ból a plazmamembránhoz közeli pontokba. A citoszolikus C-terminális rész elengedhetetlen a STIM1

oligomerek ER-PM csomópontokhoz történő eljutásához és az azt követő CRAC csatorna nyitásához, ahol a CAD domének segítségével az Orai1 N- és C-terminálisán lévő CAD kötő doménekhez kapcsolódik, ezzel aktiválva a csatornát.

Az Orai1 és a STIM1 különféle funkcióvesztéssel járó mutációi a CRAC csatorna működését (pl. konduktancia csökkenés, megszűnés) és ezzel együtt az immunválasz kialakulását is gátolhatják. A CRAC csatorna funkció módosulása ill. teljes elvesztése immunhiányt, gyakori fertőzéseket, T-sejt aktivációs defektusokat, veleszületett légzőizom elégtelenséget okozhat. Éppen ezért az Orai1 különböző fenotípusaira/mutánsaira irányuló kutatások rendkívül fontosak a CRAC csatornához köthető betegségek mechanizmusának megismerése végett.

1.2 A Kv1 ioncsatornák membránexpressziója

Számos tanulmány jelent meg az ioncsatornák geneziséről, a membránba történő kijutásról és a csatornák összeszerelődéséről. Habár sok membránfehérje rendelkezik egy egyértelműen azonosítható szignálszekvenciával, amely a plazmamembránba való kijutáshoz szükséges, a Kv1 csatornákból hiányzik ez a motívum, és maga az S2 szegmens szolgál a membránba történő expresszió felismerési helyeként. Továbbá leírták, hogy a Kv1 csatornában jelen van több olyan fehérje motívum, amelyek szabályozhatja az ER-beli retenciót, vagy a plazmamembránba történő kijutást. A Kv1.4 csatornák esetében az intracelluláris C-terminus „VXXSL” motívuma (618-622 aminosav) és a pórusrégió segíti elő a magas sejtfelszíni expressziót és szabályozza a membránba jutást. A Kv1.1 csatornából azonban hiányzik a „VXXSL” szekvencia, ehelyett egy „HRET” aminosav motívummal rendelkezik, amely közvetlenül az S6 szegmens után helyezkedik el a csatorna C-terminálisán. A Kv1.1 csatorna HRET szekvenciájában lévő R vagy H aminosav utáni stop kodon inzerció a vezetőképességének elvesztését eredményezi, viszont a sejtfelszíni expressziós szint nem változik meg. Emellett kimutatták, hogy a Shaker K⁺ csatornák (ez a Kv1 homológja a *Drosophila melanogaster*-ben) a C-terminális „HRE” szekvencia nélkül is képesek a plazmamembránban kifejeződni, azonban a „HRE” régió hiánya drasztikus változást eredményezett a steady-state (egyensúlyi) aktivációs kapuzási paraméterekben, szemben a Kv1.1-gyel, mely nemvezetővé vált. A „HRET” szekvenciát megelőző aminosavak eltávolítása a Shaker csatornában (éppen ellenkezőleg, mint a Kv1.1-re leírtakkal) megakadályozta a csatorna membránba történő kifejeződését. A Kv1.3 csatornáról kimutatták, hogy a C-terminálisán lévő két glutamát (E, negatív töltésűek) jelenléte befolyásolja a csatorna sejtmembránba történő kijutását: ezeknek az aminosavaknak a C-terminálissal együtt történő deléciója/eltávolítása vagy izoleucinra történő mutációk hatására a Kv1.3 csatorna nemvezetővé vált és plazmamembránbeli expressziója is drasztikusan lecsökkent.

1.3 Immunológiai szinapszis és T-sejt aktiváció

A T-limfociták *in vivo* aktivációja az antigén prezentáló sejtekkel (APC) való találkozás során valósul meg. A T-sejt és az APC közötti fizikai kölcsönhatás különböző jelátviteli kaszkádok elindulását eredményezi, mely a T-sejt polarizációhoz vezet: a sejt felszíni fehérjék, intracelluláris organellumok és jelátviteli molekulák felhalmozódása a T-sejt-APC között létrejövő immunológiai szinapszisban (IS). A specifikus sejt felszíni fehérjék IS-be történő mozgása szükséges a T-sejt megfelelő aktiválásához. Az IS kialakulása után és megléte során számos membrán (CD43, CD44, CD45) és intracelluláris fehérje ((p56)Lck, SAP97, PSD-95, HS1 stb.) rendeződik be, valamint az F-aktin fokozott polimerizációja figyelhető meg a T-sejtben.

1.4 Ioncsatornák az immunológiai szinapszisban

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a Kv1.3 ioncsatornák feldúsulnak a T-sejt és APC között kialakult immunszinapszisban, valamint a működésük is megváltozik foszforiláció, illetve defoszforiláció révén. Továbbá igazolták, hogy a T-sejtekben is jelen lévő PSD-95 fehérje fontos szerepet játszik a Kv1.3 csatorna szinapszisba történő diffúziójában és a kortaktin (aktin-kötő) fehérje közvetítésével a Kv1.3 csatorna az F-aktin polimerizáció során kihorgonyozódik az aktin citoskeletonhoz. Számos tanulmány foglalkozott az SLE (*szisztémás lupusz eritematózus*) betegség lehetséges kiváltó okaival, ahol többek között azt kapták, hogy az SLE-s T-sejtekben a Kv1.3 csatorna IS-be történő berendeződésének dinamikája eltér az egészséges T-sejtektől, amely bizonyítottan hozzájárul a T-sejt magasabb citoszólikus Ca^{2+} szintjének kialakulásához, mely az SLE-s T-sejtek hiperaktivitását okozhatja. Továbbá a Kv1.3 esetében azt is leírták, hogy a csatorna IS-be történő diffúziójának gátlása antitest-kereszt kötéssel a Ca^{2+} jelátvitel módosulását eredményezte az immunológiai szinapszisban.

Emellett beszámoltak arról, hogy a Ca^{2+} aktiválta CRAC csatorna mindkét alegysége (az Orai1 és a STIM1) felhalmozódik az IS-ben. Kimutatták azt is, hogy az Orai1 képes berendeződni a szinapszisba Jurkat és humán T-sejtekben egyaránt, még akkor is, ha az Orai1 nem vezető mutánsát (E106) expresszálják a sejtekben. Továbbá a CRAC csatornákon keresztüli kalcium beáramlás elősegíti az aktin filamentumok polimerizációját és berendeződését az immunológiai szinapszisban, mely az ER átrendeződéséhez, és ez által az Orai1 és STIM1 IS-be történő diffúziójához vezet.

Mindezek alapján feltételezhető, hogy a T-sejtek ioncsatornáinak (Kv1.3, KCa3.1, Orai1, STIM1) immobilizációja befolyásolhatja a T-sejt aktiváció kimenetelét, valamint az ioncsatornák tartózkodási ideje az IS-ben fontos lehet a fiziológiai fejlődéséhez szükséges Ca^{2+} válasz szempontjából.

1.5 MAGUK fehérjecsalád, SAP97

A DLG1, más néven szinapszis-asszociált fehérje 97 (SAP97), a MAGUK fehérjék családjába tartozó állványfehérje. Széles körben expresszálódik, különösen a test hámsejtjeiben. A többi MAGUK-hoz hasonlóan a SAP97 is három PDZ doménből, egyetlen SH3 és egy GUK doménből áll. Kimutatták, hogy a SAP97 számos partnerrel lép kölcsönhatásba a fehérje-fehérje interakciós doménjein keresztül, beleértve a membrán ioncsatornáit és a citoszólikus fehérjéket.. A SAP97 képes a kálium- és nátrium ioncsatornához kötődni szívsejtekben, és ezáltal szabályozni a szív akciós potenciált, illetve a késleltetett egyenirányító áramokat, valamint a SAP97 fontos szerepet játszik a káliumcsatornák lokalizációjának és kihorganyzásának irányításában idegsejtekben. Továbbá azt is leírták, hogy a SAP97 más adapter fehérjékkal együtt (PSD-95) akkumulálódik az immunológiai szinapszisban, majd 15 perc után csökkent felhalmozódást mutat T-sejtek és CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakult szinapszisban.

2. Célkitűzések

I. A Kv1 csatornák membránexpresszióját és vezetőképességét különböző fehérje motívumok (VXXSL, HRET) képesek szabályozni, amelyek főként a csatornafehérje C-terminálisán találhatók. A feszültség-függő Kv1.3 csatorna fontos szerepet játszik a Ca^{2+} jel szabályozásában a T-sejt aktiváció során. C-terminálisához számos adapter fehérje képes kötődni, valamint megtalálható benne a „HRET” motívum is, így fontos annak megismerése, hogy ezek hiányában (C-terminális, HRET szekvencia) hogyan módosul a csatorna működése és expressziója. Éppen ezért a Kv1.3 csatorna esetében a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. *Hogyan befolyásolja a Kv1.3 csatorna C-terminálisának részleges vagy teljes eltávolítása a csatorna sejtfelszíni expresszióját és/vagy vezetőképességét?*
2. *A Kv1.3 csatorna esetén milyen szerepe van a HRET(E) szekvenciának?*
3. *Helyettesíthető-e a HRET(E) szekvencia más aminosavakkal?*
4. *Milyen hatással lesz ez a szubsztitúció a csatorna expressziójára és/vagy működésére?*

II. Korábban leírták, hogy a T-sejtek aktivációja során az Orai1 csatornák fontos szerepet játszanak a Ca^{2+} jelátvitelben, és a T-sejt és APC között kialakuló immunológia szinapszisban feldúsulnak, azonban ennek kinetikája nem ismert. Más ioncsatornákról (pl.: Kv1.3) ismert, hogy különböző adapter fehérjék kötődése hatással van a csatornák szinapszisban történő felhalmozódására, sejten belüli elhelyezkedésére. Mindezek alapján az Orai1 esetében a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. *A vad típusú Orai1 csatorna milyen IS-beli felhalmozódási kinetikát mutat Jurkat T-sejt és CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakított immunológiai szinapszisban?*
2. *Az β izoformához hasonló, N-terminálisán deletált Orai1 esetén változik-e az IS-beli felhalmozódás dinamikája?*
3. *A különböző, Orai1-hez kötődő intracelluláris fehérjék (STIM1, SAP97) miként befolyásolják a szinapszisba rendeződést?*
4. *Milyen funkcionális következményei vannak a különböző módosításoknak (géncsendesítés, mutáció) az egyedülálló ill, szinapszisban lévő T sejtekben?*

3. Anyagok és módszerek

3.1 Reagensek

A használt oldatokat és a reagenseket a Sigma-Aldrich-től szereztük be, ha ez másképpen nincs jelölve.

3.2 Plazmidok, klónozás

A vad típusú humán Kv1.3 csatornát pEGFP-C1 vektor plazmidba klónoztuk a Bgl II és EcoR I restrikciós helyek segítségével. A „ragadós-vég” ligálásához T4 DNS-ligázt használtunk a standard protokoll szerint. A deléciós (Δ C, NOHRET, HRETE) és inzerciós és/vagy pontmutációs (FLAG, XHRETE, polyA, Atail) mutánsokat úgynevezett „flanking” primer mutagenézissel hoztuk létre. A pont mutánsokat (H399K, A413V), illetve a teljes hosszúságú Kv1.3 csatornát pRc-CMV vektorban expresszáztattuk.

A teljes hosszúságú és mutáns Kv1.3 csatornák kotranszfekciójához mCherry-vel jelölt vad típusú Kv1.3 csatornát két lépésben hoztuk létre: először az EGFP-t kicseréltük mCherry-vel a pEGFP-C1 plazmidban, majd a vad típusú Kv1.3 csatornát EcoR I és Bgl II enzimek segítségével a pmCherry-C1 vektorba klónoztuk.

A vad típusú Orai1 csatornát (Orai1-Full), amelyet Richard Lewis laboratóriumából kaptunk és az N-terminálisán trunkált Orai1 csatornát (Orai1- Δ 72), amelyben az első 72 aminosavat töröltük, az N terminális régiójában mGFP-vel jelöltük meg. Majd a retrovirális transzdukcióhoz használt pBMN-LacZ vektorba klónoztuk Hind III és Not I restrikciós helyek segítségével.

A klónozás prokollja röviden az alábbi volt: a PCR során felszorzosított konstruktokat 1%-os agaróz gélen megfuttattuk, majd kivágtuk és kitisztítottuk fenol-extrakciós módszerrel. Ezután mind az inzertet, mind a vektort a megfelelő restrikciós enzimekkel, majd ismét kitisztítottuk fenol-extrakciós módszerrel. A ligáláshoz T4 DNS-ligázt használtunk a standard protokoll szerint. Az összes konstruktot a Debreceni Egyetem Klinikai Genomikai Központjában szekvenáltattuk.

3.3 Transzformálás

A PCR során elkészült plazmidokat 200 μ l E. coli kompetens sejthez adtuk hozzá, majd 20 percig jégen inkubáltuk. 42°C-on hősokkot alkalmaztunk (50-60 s), majd ismét jégre helyeztük a mintákat. Ezután 800 μ l SOC médiumot adtunk a sejtekhez és 1 órán keresztül rázattuk 200 rpm-en, 37°C-on. Az így kapott-sejteket megfelelő antibiotikum tartalmú (ampicillin vagy kanamicin) agar táptalajra szélesztettük. A petriben lévő sejteket 16 órán keresztül, 37°C-on növesztettük.

3.4 Plazmid preparálás

A transzformálás során kinőtt baktérium telepekből a megfelelő antibiotikum tartalmú LB vagy TB tápoldatba oltottunk le egy-egy telepet, és 16 órán keresztül, 37°C-on, 200rpm-en rázattuk. A plazmid DNS kis mennyiségű tisztításához PureYield Plasmid Miniprep System-et használtunk, a nagyobb mennyiségű plazmid kinyeréséhez pedig PureYield Plasmid Maxiprep System-et alkalmaztunk.

3.5 Sejtek és transzfecció

A Jurkat E6-1 sejteket RPMI médiumban tenyésztettük, amelyhez 10% FBS-t, 2mM L-glutamint, 1 mM Na-piruvátot és 200 egységnyi penicillin/sztreptomicint adtunk.

A HEK-293-T, HEK tsA-201 és CHO sejteket DMEM médiumban növesztettük, amely 10% FBS-t, 2mM L-glutamint, 1 mM Na-piruvátot, és 200 egységnyi penicillin/sztreptomicint tartalmazott. Az összes sejtet 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban tároltuk, és 2-3 naponta passzáltuk.

A Kv1.3 ioncsatorna esetében az expressziós rendszer mérésekre gyakorolt hatásainak (pl.: endogén Kv1.x csatornák/alegységek jelenléte, amely elősegítheti a heteromer csatornák képződését, és kifejeződését a membránban) kizárása érdekében a tézisben bemutatott kísérleteket CHO sejtekben végeztük el, mivel ezek nem mutattak mérhető teljes-sejt áramot +50mV mellett.

A DNS plazmidok tranziens transzfeccióját Lipofectamine 2000TM segítségével végeztük a gyártó által megadott protokoll alapján.

3.6 Virális transzdukcó

A Jurkat sejtek retrovirális transzdukcóájához Nolan laboratórium weboldaláról letöltött protokollt alkalmaztuk (<http://www.stanford.edu/group/nolan/>, letöltés dátuma: 2010.augusztus).

3.7 Retrovirális shRNS-es géncsendesítés

A STIM1 és SAP97 fehérjék leütését Jurkat sejtekben a virális transzdukcóához használt protokoll alapján Mission shRNS plazmidok segítségével végeztük (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD és mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD). A transzdukcó kontrolljaként pLKO.1-puro plazmidot használtunk, ami egy olyan shRNS inzertet tartalmazott, amely nem kapcsolódik egyetlen ismert génhez sem (mGFP-Orai1-Full-PURO). A géncsendesítés hatékonyságát western-blottal ellenőriztük.

3.8 Membrán jelölés

A különböző Orai1 csatornát expresszáló Jurkat sejteket üvegaljú petribe raktuk, majd 62,5 μM Alexa FluorTM 647 NHS észterrel 20 percig jelöltük őket jégen, 1 \times TBS-ben. A konfokális képek elkészítéséhez NIKON Ti2 mikroszkópot, a kiértékeléséhez ImageJ szoftvert használtunk.

3.9 Gél elektroforézis és western blot

A fehérje mintákat SDS gélelektroforézissel méretük alapján elválasztottuk, majd PVDF membránra transzferáltuk. A membránt sovány tejporral blokkoltuk, majd hozzáadtuk az elsődleges antitesteket: egér anti-STIM1, anti-FLAG M2, egér anti-SAP97 és nyúl anti-aktin. Ezután a membránt mostuk tween 20-at tartalmazó TBS-ben, majd hozzáadtuk az anti-egér IgG vagy anti-nyúl IgG HRP-kapcsolt másodlagos antitesteket. Majd a membránokat 3-szor mostuk TBS-ben és 1-szer desztillált vízben, végül ECl reagenst adtunk hozzá és FluorChem Q MultiImage III Western blot képalkotó rendszer segítségével előhívtuk. A kísérletek során 1 $\times 10^6$ -on sejtet használtunk minden egyes minta esetében.

3.10 Coomassie-festés és GST affinitás kromatográfia

A Coomassie-festéshez pGEX-4T-2-Orai1 N-ill. C terminálissal rendelkező GST fúziós fehérjéket valamint a negatív kontrolként használt pGEX-4T-2-GST fehérjéket *Escherichia coli* (BL21) baktériumban termeltettük. A bakteriális lizátumokat 1 mM izopropil-béta-D-tiogalaktoziddal (IPTG) indukáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten, majd centrifugálással összegyűjtöttük, mostuk háromszor 1-szeres PBS-sel. Ezután lízispufferben szonikáltuk, SDS gélen megfuttattuk és 1percig Coomassie-festéssel megfestettük, majd 16 órán keresztül mostuk 12% etanolt és 7% ecetsavat tartalmazó oldatban a fehérje termelődés ellenőrzése végett.

A GST affinitás kromatográfia során a korábban letermelt bakteriális fehérjékből a pGEX-4T-2-GST és GST-Orai1-1-72 bakteriális lizátumokat 1 óráig GST SpinTrap oszlopokra kötöttük ki. A Jurkat sejteket (amelyek az SAP97 fehérjéket tartalmazzák) háromszor mostuk 1xPBS-sel, majd lízispufferben szonikáltuk és hozzáadtuk a GST oszlopokhoz, melyekhez előzőleg felkötöttük a megfelelő GST konstruktot, majd egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C -on. Másnap a GST SpinTrap oszlopokat mostuk és az oszlopokhoz kötődött fehérjéket 10 mM glutationnal eluáltuk. Az eluátumokat SDS-PAGE segítségével választottuk szét, és PVDF membránra vittük át. A fehérjék jelenlétét western-blottal igazoltuk speciális SAP97-elleni antitest segítségével.

3.11 Immunfluoreszcencia

A FLAG epitóppal jelölt EGFP-Kv1.3 plazmidokat expresszáló CHO sejteket poly-L-lizinnel bevont lemezekre cseppentettük és 3-4 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on. Ezután fixáltuk a sejteket 1%-os formaldehid oldatban, majd egér anti-FLAG M2 antitesttel jelöltük. Másodlagos antitestként kecskében termeltetett anti-egér Alexa 647-et adtunk a sejtekhez 1órán keresztül. Végül a lemezeket Fluoromount G-vel fedtük be. A konfokális képeket Zeiss LSM 510 META és Olympus FV-1000 mikroszkópokkal rögzítettük. He-Ne lézert választottuk az Alexa647 és mCherry gerjesztésére, valamint argon lézert az EGFP megjelenítésére. A szeletek vastagságát kb. 1µm-re állítottuk be.

3.12 Immunológiai szinapszis létrehozása

A vad típusú (mGFP-Orai1-Full), az N-terminális levágott (mGFP-Orai1-Δ72) Orai1 csatornákat expresszáló Jurkat sejtekhez, illetve a vad típusú Orai1 csatornát expresszáló, de a STIM1 fehérjét (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD) és SAP97 fehérjét (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD) nem tartalmazó, valamint a kontroll shRNS-t (mGFP-Orai1-Full-PURO) tartalmazó Jurkat sejtekhez CD3-CD28 gyöngyöket adtunk, hogy immunológiai szinapszist hozunk létre, majd 200g-n összecentrifugáltuk 1 percre, 37 °C-on.

Ezután a sejt-gyöngy párokat poly-L-lizinnel bevont lemezekre cseppentettük és 1, 5, 15, 30 illetve 60 percre inkubáltuk 37 °C-on, 5 %-os CO₂ tartalom mellett. Az inkubáció után a lemezeket jégre tettük és acetonnal fixáltuk 1 percre. Ezt követően 1% BSA-t tartalmazó 1× TBS-sel mostuk a sejteket, majd Alexa-546-falloidinnel jelöltük meg, melyet az IS létrejöttének indikátoraként alkalmaztunk. A falloidint 10% BSA-t tartalmazó, 1× TBS-ben adtuk a sejtekhez, és 20 percre szobahőmérsékleten inkubáltuk vele a sejteket. Végül a lemezeket Fluoromount G-vel fedtük be. A konfokális képeket NIKON Ti2 mikroszkóppal rögzítettük. Az mGFP-Orai1-Full-PURO, mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD, mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtek mérését párhuzamosan végeztük.

3.13 Konfokális mikroszkópia és kiértékelés

A Kv1.3 csatorna vizsgálatok Zeiss LSM 510 META és Olympus FV-1000 mikroszkópok segítségével rögzítettük a képeket. Az Alexa647 gerjesztéséhez He-Ne lézert (633 nm lézervonalat), a GFP gerjesztéséhez argon lézert (488 nm-es vonalat) alkalmaztunk, a szeletek vastagsága körülbelül 1 µm volt.

Az Orai1 esetében az immunológia szinapsziszról készült képeket NIKON Ti2 mikroszkóp segítségével rögzítettük (a szeletek vastagsága körülbelül 1 µm volt). Az mGFP gerjesztéséhez argon lézert 488 nm-es vonalát, az Alexa 546 esetében az 546 nm-es He-Ne lézergerjesztést alkalmaztunk, és az emittált fényt 505-550nm és 550-640nm sávszűrők segítségével detektáltuk.

Az Orai1-csatornák IS-ben való tartózkodási idejének meghatározásához a CD3-CD28 gyöngyökhöz kapcsolódott Jurkat T-sejtek konfokális képeit rögzítettük az 1., az 5., a 15., a 30. és a 60. percben. Az IS-kialakulásának meglétét a T-sejt F-aktin (Alexa-546-falloidin) polarizációja jelezte, CD3-CD28 gyöngy és a Jurkat sejt érintkezésénél.

A konfokális képek kiértékeléséhez az ImageJ szoftvert használtuk: az A546-falloidinnal jelölt F-aktin szinapszisbeli polarizációja alapján (amely kijelöli a szinapszis helyét) azonos nagyságú négyzeteket rajzoltunk ROI-ként a szinapszisban, a szinapszison kívül (beleértve a membránt és az intracelluláris régiókat) és egy sejtmentes területen háttérként. Majd ezeket a meghatározott helyzetű ROI-kat használtuk az mGFP fluoreszcens csatorna esetében az mGFP-Orai1 felhalmozódásának meghatározására. Az akkumulációt a következő egyenlettel határoztuk meg:

$$AA = \frac{\text{Átlagos Orai1 intenzitás IS-ben} - \text{Átlagos háttérintenzitás}}{\text{Átlagos Orai1 intenzitás az IS-en kívül} - \text{Átlagos háttérintenzitás}}$$

ahol egy sejtet akkor tekintettünk Orai1-polarizáltnak, ha az akkumulációs aránya (AA) 1,5-nél magasabb volt.

3.14 Intracelluláris kalcium mérés

Az Orai1-et kifejező, különböző Jurkat sejteket poly-L-lizinnel bevont üvegaljú petrikbe helyeztük szintelen RPMI médiummal együtt, majd 1 μ M Fura-2 acetoxi-metilészterrel megtöltöttük és inkubáltuk 25 percig, 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett. A sejteket 2mM Ca²⁺-ot tartalmazó oldattal mostuk és az inverz fluoreszcens mikroszkóp ~35-37°C-ra fűtött mintatartójába helyeztük. A sejteket 2mM-os Ca²⁺ oldattal, majd 0mM-os Ca²⁺ oldattal perfundáltuk. Ezután 1 μ M thapsigargin-t (TG) tartalmazó 0mM-os Ca²⁺ oldatot adtunk a sejtekhez az endoplazmatikus retikulum (ER) Ca²⁺ raktárainak kiürítésére. A Ca²⁺ visszaadása során, az 1 μ M thapsigargin-t (TG) tartalmazó 2mM-os Ca²⁺ oldattal való perfundálással aktiváltuk a Ca²⁺ beáramlását a SOCE-n keresztül.

A mérésekhez NIKON ECLIPSE Ts2R mikroszkópot használtunk, amelyet VisiChrome High Speed Polychromator-ral kombináltunk. A FURA-2 festék excitációjához és emissziójához 340- és 380 nm gerjesztési szűrőket ill. 510 nm-es emissziós szűrőt használtunk. A képeket PCO Edge 4.2 sCMOS kamerával rögzítettük 10 másodpercenként. A képek kiértékelését VisiView® Imaging szoftver segítségével végeztük, ahol csak az mGFP-t expresszáló sejteket vettük figyelembe.

3.15 Kalcium mérése az immunológiai szinapszisban

A különböző Orai1 csatornát expresszáló Jurkat sejteket poly-L-lizinnel bevont üvegaljú petrikbe helyeztük. Ezután 1 μ M FURA-2 acetoxi-metil-észterrel töltöttük meg, majd 25 percig, 37°C-on inkubáltuk őket fenol-red mentes RPMI médiumban. A sejteket ezután fenol-red mentes RPMI

médiummal mostuk és a fluoreszcens mikroszkópba helyeztük a mérés megkezdésekor. A kalcium mérését a már korábban leírtak szerint, 37 °C-on hajtottuk végre. A szinapszis képzéshez CD3-CD28 gyöngyöket pipettáztunk a sejtekhez majd a gyöngyökkel való kapcsolódástól számított 90 percen keresztül rögzítettük a sejtek kalcium válaszát.

A kalcium jelek kiértékelése során háttérkorrekciót végeztünk minden egyes sejtnél, majd meghatároztuk a kalcium oszcillációk (csúcsok) számát a 90 perces periódus alatt. A mérés során azokat a csúcsokat vettük figyelembe, amelyek nagyobbak voltak a kalcium jel alapvonalának (a gyöngyök hozzáadása előtt) az átlagának és 2-szeres SD-jének (átlag+2xSD) összegénél, valamint a csúcsok előtt és után lévő pontok magassága kisebb volt, mint a csúcs(pont) magassága. Méréseinket 3 különböző napon végeztük. Csak a GFP pozitív, „gyönggyel aktivált” (CD3-CD28 gyöngyhöz kapcsolódott) sejteket vettük figyelembe.

3.16 Elektrofiziológia

A Kv1.3 plazmidokkal transzfektált CHO sejteket normál extracelluláris oldattal mostuk és 35mm átmérőjű petrikbe cseppentettük. A Kv1.3 ionáramokat whole cell (teljes-sejt) és outside-out konfigurációban mértük Axopatch 200B erősítő segítségével. A pipettát 140mM KF-et tartalmazó belső oldattal töltöttük fel. A farmakológiai mérésekhez 100mM TEA-Cl-ot (tetraetil-ammónium) tartalmazó oldatot használtunk. A gating-current (kapuzási áram) és single channel (egyedi-csatorna) mérésekhez használt külső oldat nem tartalmazott Na⁺-ot, mivel néhány CHO sejt befelé folyó Na⁺ áramot expresszált. Az A413V mutáns mérésekor P/5 online protokoll segítségével korrigáltuk a szivárgási áramot (leak), illetve minimalizáltuk a kapacitív tüskét. A sejteken történő oldatcserét a gravitáció által hajtott perfúziós rendszer segítségével valósítottuk meg, folyamatos elszívás mellett.

Az áramsűrűséget a +50mV tesztpotenciálon mért csúcsáram és a teljes-sejt-kapacitás hányadosával definiáltuk (az erősítő kompenzációs áramköréből kiolvasva). A TEA gátlás során megmaradó áramhányadot (RF: remaining fraction) a 100mM TEA-val végzett perfundálás előtti és utáni csúcsáram hányadosaként adtuk meg.

Az áram aktivációs kinetikáját a Hodgkin-Huxley modell segítségével illesztettük meg az áramgörbe emelkedő szakaszára, amelyet 15 ms hosszú +50mV-ra történő depolarizáció idézett elő. Egy adott sejt aktivációs időállandóját a három egymást követő, 15 másodpercenként megismételt depolarizáció során kapott időállandók átlagaként határoztuk meg. P/5 protokollt alkalmaztunk a szivárgási áram minimalizálására.

Az inaktivációs áram kinetikájának meghatározásához egyetlen exponenciális függvényt illesztettünk az áramgörbe csökkenő szakaszára, amelyet 2 másodperc hosszan, -120mV tartási

potenciálról +40mV-ra depolarizáltunk. Egy adott sejt inaktivációs időállandóját úgy határoztuk meg, mint τ_a esetében, azzal az eltéréssel, hogy az impulzusokat 60 másodpercenként adtuk a sejtre.

A steady-state (egyensúlyi) aktiváció feszültségfüggését az alábbiak szerint kaptuk meg. A sejteket -120mV holding (tartó) potenciálon tartottuk, és depolarizáltuk különböző tesztpotenciálokra -70 és +50mV között, 10mV-os lépésekben, 30 másodpercenként. A whole-cell (teljes-sejt) vezetőképességének csúcsát ($G(V)$) az egyes tesztpotenciálokra egy adott V tesztpotenciál csúcsárama (I_p), és a K^+ megfordítási potenciál ($E_r = -85mV$) alapján számítottuk ki $G(V) = I_p / (V - E_r)$. A $G(V)$ értékeket a maximális vezetőképességre normáltuk, és a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk, és az adatpontokra a Boltzmann-függvényt illesztettük: $G_N = 1 / (1 + \exp[-(V - V_{1/2})/k])$, ahol G_N a normált vezetőképesség, V a tesztpotenciál, $V_{1/2}$ a fél-aktivációs feszültség, és k a függvény meredeksége.

A gating (kapuzási) áramokat egy nem vezető Kv1.3 mutáns (W384F-Kv1.3) alkalmazásával határoztuk meg. Feszültség-lépés protokollt alkalmaztunk -100mV és +20-100mV között, 10mV-os növekedés mellett, ahol mindegyik lépés 50ms-ig tartott. P/5 protokollt alkalmaztunk a szívárgási áram (az impulzusok ellentétesek voltak a tesztpotenciállal) és a kapacitás minimalizálására. A gating charge-ot (kapuzási töltést) a kapuzási áramgörbék alatti terület integrálásával számoltuk ki.

3.17 Áramlási citometria

A különböző Jurkat sejteket Alexa 647 festékkel konjugált anti-humán CD3 vagy CD28 antitestekkel jelöltük 10% FCS-PBS-ben 30 percig, jégen. A sejtek áramlási citometriás méréséhez Novocyte áramlási citométert használtunk, és legalább 200.000 sejtet mértünk le mintánként. Az eredmények kiértékeléséhez NovoExpress szoftvert alkalmaztunk, ahol a kapott "dot-plot" alapján ábrázoltuk az átlag, illetve CV (CV: variációs koefficiens = $SD / \text{átlag} \cdot 100\%$) értékeket CD3 és CD28 esetében a különböző sejtvonalaknál. A kiértékelés során csak az élő, mGFP pozitív sejtek lettek kiválasztva és felhasználva az elemzéshez.

3.18 Statisztikai analízis

Az elektrofiziológiai mérések adatait Student-féle t-próba segítségével hasonlítottuk össze. A p-értéket 0.05-nek választottuk. A statisztikai elemzések végrehajtásához SigmaPlot 10.0 és 14.0 verziókat használtuk.

A szinapszisban polarizált-sejtek arányának összehasonlítására Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk. Az AA értékek és Ca^{2+} csúcsok számának összehasonlításához minden mintánál egyszempontos varianciánalízist (one-way ANOVA), vagy Mann-Whitney próbát (rank sum test) használtunk. A szignifikancia szintet 0.05-nek választottuk. Minden egyes időpont és minden egyes sejtvonal esetén

legalább három napon ($N \geq 3$) gyűjtöttük az adatokat, és a sejtek száma minden nap magasabb volt, mint 9 ($n \geq 9$).

4. EREDMÉNYEK

4.1 A HRET szekvencia szerepe a Kv1.3 csatorna membránexpressziójában és kapuzásában

4.1.1 Stratégiai szempontok a Kv1.3 konstruktok megtervezéséhez

Munkánk során három stratégiát alkalmaztunk CHO sejtekbe transzfektált Kv1.3 alegységek egyedi azonosítására. Először az S6-ban, a 413. pozícióban lévő alanint elmutáltuk valinra (A413V), amelyről kimutatták, hogy drámai módon felgyorsítja az A413V homomerek inaktivációs kinetikáját a vad típusú csatornákhöz képest ($\tau_{\text{inakt.A413V}}=4\text{ms}$, $\tau_{\text{inakt.WT}}=200\text{m}$).

Másodsorban, a 399-es pozícióban a hisztidint (H) helyettesítettük lizinnel (K), amely TEA (tetraetil-ammónium)-rezisztens fenotípust eredményezett (amint azt korábban munkacsoportunkban leírták). A TEA-szenzitív ($K_d \approx 11.4\text{mM}$) és az inszenzitív ($K_d \approx 2000\text{mM}$) Kv1.3 alegységek összeszerelődése módosítja a heterotetramerek TEA iránti affinitását, ezért a heteromultimer képződés könnyen azonosítható 100 mM TEA alkalmazásával.

Harmadszor, az immuncitokémiai kísérletekhez olyan konstruktokat használtunk, amelyeknél az S1 és S2 szegmens között lévő extracelluláris hurokba a FLAG inzertet illesztettünk, amely lehetővé teszi a plazmamembránban elhelyezkedő csatornák jelölését.

Minden konstrukttal esetében a csatornafehérjéket az N-terminálison EGFP-vel fúzionáltuk. A C-terminálison lévő deléciókat egy a „HRET” szekvencia előtt (ΔC -vel jelölt konstrukttal) vagy a „HRET” szekvencia után (NOHRET végződésűvel jelölt) bevezetett stop kodon segítségével hoztuk létre.

4.1.2 A C-terminális régió deléciója nem csökkenti a Kv1.3 csatornák áramát

A A413V- ΔC konstrukció expressziója robusztus teljes-sejt áramot eredményezett, amelynek gyors inaktivációs kinetikája van, amint azt a teljes hosszúságú, homotetramer A413V esetében láthattuk. Az A413V-NOHRET konstrukttal, azonos körülmények között transzfektált CHO sejteken nem detektáltunk feszültség- és időfüggő áramot.

Továbbá western-blot alkalmazásával megvizsgáltuk azt is, hogy a három FLAG-es konstrukttal bármelyikével transzfektált CHO-sejtek megfelelő méretű (85-95 kDa közötti), EGFP-vel jelölt Kv1.3 csatorna alegységet expresszálnak

4.1.3 A farmakológiai mérések: a homomer H399K- Δ C csatornák jelenléte a membránban

Méréseink során a FLAG-H399K-FL mutáns CHO-sejtekbe transzfektálva, a kontroll extracelluláris Ringer oldatban és 100mM TEA (különböző K^+ csatornák általános inhibitora, gyors, nyitott-csatorna blokkoló) jelenlétében sem csökkentette a csatornák áramát. A hisztidin (H) lizinre, (K) történő mutációja egy teljesen TEA-érzékeny csatornához vezetett. Amikor a CHO sejteket FLAG-H399K- Δ C plazmidaival transzfektáltuk, a teljes hosszúságú H399K konstrukthoz hasonló áramgörbéket rögzítettünk és TEA rezisztens áramot kaptunk. A C-terminális HRET-szekvenciát is magába foglaló deléciója (FLAG-H399K-NOHRET) olyan fenotípust eredményezett, amely nem expresszál kifelé irányuló K^+ áramot, ahogyan azt az A413V mutáns esetében már korábban leírtuk.

4.1.4 A NOHRET csatornák kijutnak a sejtmembránba

A FLAG-epitópot tartalmazó teljes hosszúságú (FL), H399K és A413V mutáns Kv1.3 csatornákat sikerült anti-FLAG antitesttel megjelölni CHO sejtekben, amely a csatorna membránban történő kifejeződését bizonyítja. Ugyanezt figyelhettük meg mindkét Kv1.3 pont mutánsnál (A413V, H399K), a Δ C illetve a NOHRET deléciós mutáns esetében is. Habár a C-terminális deletált csatornák intracelluláris retenciója megnövekedett a teljes hosszúságú csatornához képest a Δ C és NOHRET csatornák képesek a sejt membránjában kifejeződni.

4.1.5 A vad típusú és az FLAG-A413V-NOHRET alegységek együttes expressziója tisztán, vad típusú Kv1.3 áramot eredményez

Az mCherry-vel jelölt, vad típusú, teljes hosszúságú Kv1.3 csatornákat transzfektáltuk az EGFP-A413V-NOHRET plazmid mutánsokkal együtt 1: 1 arányban. Azt tapasztaltuk, hogy az A413V-NOHRET és a WT-Kv1.3 csatornákat egyaránt expresszáló CHO sejtek olyan áramokat mutatnak, amelyek hasonlítanak a teljes hosszúságú WT csatornák áramhoz, és nem többféle heteromer áram „keverékeként” jelennek meg, amelyet különféle inaktivációs időállandók jellemeznek. A csak mCherry-WT-Kv1.3 csatornát expresszáló sejtek áramsűrűsége jóval magasabb volt, mint az mCherry-WT-Kv1.3 és az EGFP-A413V-NOHRET együttes transzfekciójakor detektálható áramoké.

Ezen kívül a CHO sejteket FLAG-jelölt A413V-NOHRET (EGFP-konjugált) és WT-Kv1.3 (mCherry konjugált) keverékével transzfektáltuk, és anti-FLAG jelölésnek vetettük alá őket: a mikroszkópos felvételeken egyértelműen látszik, hogy a csatorna képes kijutni a membránba.

4.1.6 A NOHRET csatornák kapuzási árama hiányzik

Annak feltárására, hogy a vezetőképesség vagy az aktivációs kapu sérült-e a HRET eltávolításakor a NOHRET Kv1.3 csatornában, WT-NOHRET Kv1.3 csatornák kapuzási tulajdonságait vizsgáltuk meg CHO sejtekben.

Pozitív kontrollként a Kv1.3-W384F pontmutáns csatornát fejeztük ki CHO-ban, amely a Kv1.3 nem vezető mutánsa (homológ a Shaker csatorna nem vezető W434F mutánsával). A tesztelés során a Kv1.3-W384F-et stabilan expresszáló CHO-sejteket használtuk, amelyeknél rögzítettük a kapuzási áramokat (mind a 11 sejtben). A WT-NOHRET csatornákat expresszáló CHO sejtekben nem tudunk kapuzási áramot ($n = 9$) mérni, vagy csak minimális kapuzási áramot tudunk detektálni egy magasabb feszültségre depolarizálva (+50mV vagy magasabb tesztpotenciálon). Mindez azt jelzi, hogy ha a C terminálist a HRET szekvenciával együtt távolítjuk el a Kv1.3 csatornában, akkor a csatorna feszültség-szenzora nem képes elmozdulni a depolarizáció hatására.

4.1.7 A HRET(E) szekvencia eltávolítása vagy helyettesítése nem befolyásolja a Kv1.3 működését

Ezen eredményektől motiválva a következő mutációkat hajtottuk végre:

- 1) a HRETE motívumot töröltük, a C-terminális többi része megmaradt (WT-XHRETE);
- 2) A HRETE-et öt alaninnal (WT-polyA) helyettesítettük és a C-terminális többi része megmaradt;
- 3) a HRETE szekvenciát 5 alaninnal helyettesítettük a C terminális többi részét töröltük (WT-Atail).

Miután transzfektáltuk ezeket a mutánsokat és a teljes hosszúságú vad típusú Kv1.3-at CHO sejtekbe, azt kaptuk, hogy a három „HRETE” módosított alegység funkcionális és vezető tetramereket alkotott a CHO sejtmembránban és a kapuzási kinetikában, valamint az egyensúlyi paraméterekben sem találtunk jelentős különbségeket.

Az aktivációs kinetika kissé lassabb volt a WT-XHRETE és a WT-Atail konstrukciónál, összehasonlítva a WT-FL-el ($p < 0,001$ mindkettőnél), de az inaktivációs kinetika nem változott ($p = 0,13$). Az egyensúlyi aktiváció félaktivációs feszültsége ($V_{1/2}$) csak a WT-Atail csatornáknál volt különböző, de a meredekségi tényező minden HRETE-mutánsnál azonosak voltak

Megvizsgáltuk továbbá az egyedi csatorna (single-channel) vezetőképességet mind a négy fenotípus esetében, és megállapítottuk, hogy a HRETE-motívum eltávolítása/helyettesítése a Kv1.3 csatornában nem befolyásolta az egyedi-csatorna vezetőképességet ($p = 0,085$).

Ezen kívül a FLAG epitópot hordozó Kv1.3 csatornák mindegyike detektálható volt a membránban a FLAG-antitesttel történő jelölés során (a dolgozatban ezek az ábrák nincsenek bemutatva). Mindezek az adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a HRETE motívum nem létfontosságú a Kv1.3 működéséhez: a csatorna jelen van a plazmamembránban, és funkcionális a HRET(E) motívum jelenléte nélkül is.

4.2 Az Orai1 IS-beli tartózkodása megváltoztatja a T sejtek Ca^{2+} -válaszát

4.2.1 Az Orai1 immunológiai szinapszisba történő felhalmozódásának kinetikája

Az Orai1 csatorna IS-ben történő felhalmozódási kinetikájának tanulmányozásához, az Orai1-et stabilan expresszáló sejt vonalat hoztunk létre Jurkat E6-1 sejtekben. Először az Orai1 csatornát fúzionáltattuk mGFP-vel, majd retrovirális transzdukcióval Jurkat sejtekben expresszáltattuk az mGFP-Orai1-Full konstrukciót. Immunológiai szinapszist hoztunk létre az anti-CD3 és anti-CD28 antitesttel bevont gyöngyök, mint APC és az mGFP-Orai1-Full-t expresszáló sejtek között, majd meghatároztuk az Orai1-polarizált-sejtek százalékos arányát öt egymást követő időpontban (1, 5, 15, 30 és 60 perc). Az IS-képződés kialakulásának megerősítése érdekében az F-aktin polimerizációját Alexa-546 falloidin festéssel detektáltuk, és bevezettük az akkumulációs arányt (AA) annak eldöntésére, hogy egy T-sejt mutat-e Orai1-polarizációt, és meghatároztuk az IS-ben az Orai1-felhalmozódást mutató sejtek százalékos arányát.

Egy perccel a sejt-gyöngy kölcsönhatás kialakulása után a T-sejtek 20%-a mutatott Orai1-felhalmozódást, és az Orai1-polarizált-sejtek aránya a 15. percben volt a legmagasabb (46 %). A későbbi időpontokban (30. és 60. perc) az Orai1 IS-berendeződést mutató sejtek százaléka fokozatosan csökkent (15perc vs. 60perc: $p=0,033$). Mindezek alapján azt kívántuk tanulmányozni, hogy az Orai1 IS-beli tartózkodását milyen fehérjék szabályozzák Jurkat T-sejtekben.

4.2.2 A STIM1 befolyásolja az Orai1 IS-beli tartózkodási idejét

A STIM1-Orai1 interakció IS-beli berendeződésben beöltött funkciójának megértése érdekében létrehoztunk egy mGFP-Orai1-Full expresszáló sejt vonalat, amelyben csendesítettük a STIM1 gént (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD). A transzdukció kontrolljaként pLKO.1-puro plazmidot alkalmaztunk, ami olyan shRNS-szekvenciát tartalmaz, amely semmilyen ismert gént nem csendesít (mGFP-Orai1-Full-PURO). A STIM1 csendesítés hatékonyságát western blottal ellenőriztük. Továbbá az mGFP-Orai1-Full alegységek membránba kijutását is megvizsgáltuk: az Orai1 alegység jól láthatóan a plazmamebránban lokalizálódott, ugyanis a membránfestés és az mGFP-Orai1-Full fehérjék fluoreszcens jele átfedésben van.

A funkcionális ellenőrzéshez az mGFP-Orai1-Full-PURO és az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD Jurkat sejtek Ca^{2+} jelét a citoszólikus Ca^{2+} változások mérésével jellemeztük, FURA-2 rációmetrikus festék alkalmazásával. A kontroll sejtek (mGFP-Orai1-Full-PURO) az mGFP-Orai1-Full sejtekkel azonos Ca^{2+} választ mutattak, és ahogy az várható volt és korábban publikálták, a STIM1 csendesítése teljesen megszüntette a sejtek Ca^{2+} -válaszát CRAC csatornákon keresztül.

Ezt követően meghatároztuk az az Orai1 csatornák IS-beli felhalmozódásának időfüggését mGFP-Orai1-Full-PURO és az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejt vonalakban. Az mGFP-Orai1-Full-PURO sejtek (kontroll) Orai1 IS-akkumulációjának időbeli lefolyása hasonló volt az mGFP-Orai1-

Full konstrukciót expresszázó sejtekhez, a STIM1 leütés azonban módosította az Orai1 IS-ben történő feldúsulásának kinetikáját: az Orai1 IS-ben való felhalmozódását mutató sejtek frakciója a 60. percig folyamatosan nőtt az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekben ($p = 0,029$).

4.2.3 Az Orai1 N-terminálisának deléciója a STIM1 csendesítéshez hasonló eredményeket mutat

Az Orai1 alegység C-terminusa elengedhetetlen a STIM1-hez történő kapcsolódáshoz és a SOCE aktiválásához, az N-terminális régió pedig tartalmaz egy CAD (CRAC aktivációs domén) kötő domént, amely szükséges a Ca^{2+} permeációjához. Ezek alapján létrehoztunk egy mGFP-Orai1- $\Delta 72$ nevű N-terminális mutáns (az Orai1 β izoformát utánozva és részben megőrizve a STIM1 N-terminális kötődését), ahol az első 72 aminosavat eltávolítottuk, hogy feltárjuk az intracelluláris N-terminális szerepét az IS-be történő berendeződésben.

Az Orai1- $\Delta 72$ csatorna trunkációja nem volt szignifikáns hatással a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramlásra a Jurkat sejtekben, nem befolyásolta nagymértékben a CRAC csatorna vezetőképességét és aktivációját.

Az Orai1- $\Delta 72$ csatornakonstruktok intenzitás-profil elemzése azt mutatja, hogy az Alex647 festés (membránjelölés) és az mGFP jel intenzitási csúcsai ugyanúgy átfednek egymással, mint a vad típusú Orai1-nél. Következésképpen az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ csatornák képesek kijutni a sejtmembránba.

Ezen kívül IS-t hoztunk létre az N-terminálisán trunkált Orai1 csatornákat stabilan expresszázó Jurkat T-sejtek és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között ahol azt kaptuk, hogy az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ képes az IS-ben akkumulálódni, azonban a trunkált Orai1-expresszázó mGFP-polarizált sejtek százaléka fokozatosan emelkedett, és a 60. percben érte el a maximumát 58%-nál ($p = 0,035$ az mGFP-Orai1-Full és az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ összevetve), hasonlóan az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekhez.

4.2.4 A SAP97 szabályozhatja az Orai1 távozását az immunológiai szinapsziszból

A SAP97 szerepének kiderítésére a SAP97 expressziós szintjét leszabályoztuk olyan Jurkat sejtekben, amelyek az mGFP-Orai1-Full csatornát stabilan kifejezik (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD). A transzdukció kontroljaként ismételtén a pLKO.1-puro plazmidot alkalmaztuk, mint azt már korábban is tettük (mGFP-Orai1-Full-PURO). A SAP97 csendesítés hatékonyságát western blottal ellenőriztük.

Továbbá ellenőriztük az mGFP-Orai1-Full alegységek membrán expresszióját, ahol a SAP97-et nem tartalmazó, de az mGFP-Orai1-Full csatornákat expresszázó Jurkat sejtek vonalmenti

intenzitás-profilja egyértelműen bizonyítja, hogy az Orai1 alegység membrán lokalizációját nem befolyásolja az SAP97 leütése.

Az Orai1 csatornák funkcionalitásának teszteléséhez az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben a citoszólikus Ca^{2+} változásokat a rációmetrikus Ca^{2+} indikátor (FURA-2) segítségével határoztuk meg. Az mGFP-Orai1-Full sejtekben a SAP97 shRNS konstrukcióval történő transzdukció nem gyakorolt szignifikáns hatást a Jurkat sejtek CRAC áramára az mGFP-Orai1-Full-PURO sejtekhez képest.

Ezt követően meghatároztuk az Orai1 IS-akkumulációs kinetikáját a SAP97 leütött-sejtekben, ahol az Orai1 csatornák felhalmozódása egészen 60. percig magas volt ($p = 0,029$), ami azt jelenti, hogy a berendeződési kinetikája hasonló az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD és mGFP Orai1- $\Delta 72$ expresszáló sejtekhez.

4.2.5 Az Orai1 az IS-beli tartózkodása szabályozza a T sejtek Ca^{2+} - választ

Az Orai1 csatorna hosszantartó IS-beli tartózkodásának funkcionális következményei kiderítéséhez meghatároztuk a CD3-CD28 antitesttel bevont gyönggyökkel IS-ben lévő Jurkat sejtek intracelluláris Ca^{2+} változásait. Eredményeink azt mutatták, hogy az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ (összehasonlítva a kontroll mGFP-Orai1-Full sejtekkel, $p = 0,016$) és az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben (összevetve az mGFP-Orai1-Full-PURO-val, $p < 0,001$) magasabb volt a kalciumtűskék száma a CD3-CD28 gyönggyel történő interakciót követő 60 perces időtartam alatt. 60 perc elteltével az N-terminálisán trunkált Orai1, és az Orai1-Full csatornát expresszáló SAP97 csendesített sejtekben a kalcium tűskék továbbra is jelen voltak, ellentétben a kontroll sejtekkel. Analízisünk az mutatta, hogy a Ca^{2+} oszcillációs csúcsok száma szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll sejtekben (mGFP-Orai1- $\Delta 72$ vs. mGFP-Orai1-Full: $p < 0,001$; mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD vs mGFP-Orai1-Full-PURO: $p = 0,002$) a 60. és a 90. perc között.

Ezen kívül a Ca^{2+} válaszok időbeli megoszlása is különbözött a kontroll és módosított IS-rezidens Orai1-gyet expresszáló sejtek esetében: a módosított (mGFP-Orai1- $\Delta 72$ és mGFP-Orai1-Full-SAP97KD) valamint a kontroll (mGFP-Orai1-Full és mGFP-Orai1-Full-PURO) sejtek „oszcillációs karakterisztikája” is különbséget mutatott. Míg a kontroll sejtek (mGFP-Orai1-Full, mGFP-Orai1-Full-PURO) Ca^{2+} -koncentráció-csúcsa közvetlenül a gyönggyel való találkozás után volt detektálható, amely idő előre haladtával lecsengett, addig az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejteknél számos Ca^{2+} csúcs volt megfigyelhető az IS kialakulását követő 60 percig, sőt a 60. perc után is.

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

5.1 A Kv1.3 csatorna membránbeli expressziója

A Kv-csatornák membránba történő jutását több csoport is tanulmányozta, mivel kulcsfontosságú szereplők a különféle sejtes folyamatok szabályozásában, ideértve az akciós potenciált, vagy akár az immunválaszt is. Annak érdekében, hogy megfelelő következtetéseket tudjunk levonni a membránexpresszióról, kritikus fontosságú egyértelműen bizonyítani, hogy a rögzített áramok a sejtekbe transzfektált ioncsatorna gének következményei, és az expressziós rendszer endogén K^+ csatorna alegységei nem befolyásolják azt. Ehhez kinetikailag vagy farmakológiailag jelölt Kv1.3 alegységeket használtunk olyan tulajdonságokkal, amelyek egyedülálló módon különböztetik meg a transzfektált alegységek által létrehozott homotetramer csatornákat az endogén K^+ csatornáktól, vagy az endogén és transzfektált csatornák alegységei által alkotott heteromultimerektől. Az A413V- ΔC áram expressziója CHO sejtekben, amelyek nem fejeznek ki feszültségfüggő K^+ konduktanciát, alátámasztja, hogy a ΔC -csonkolt mutánsok a plazmamembránba irányulnak anélkül, hogy azok kombinálnának teljes hosszúságú Kv1.x alegységekkel.

A H399K mutánsal végzett kísérlet eredményei szintén alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a „HRET” régió után eső C-terminális eltávolítása nem akadályozza a Kv1.3 sejtmembránba történő kijutását. A H399K- ΔC és a H399K-FL esetében a 100mM TEA általi gátlás elhanyagolható volt, ami igazolja, hogy a H399K- ΔC és a WT Kv1.3 alegységek nem keveredtek az ER-ban. Ezen kívül mind az A413V- ΔC , mind a H399K- ΔC alegységek FLAG epitópjait immuncitokémiával sikerült detektálnunk transzfektált, nem permeabilizált sejtekben, ami további bizonyítékul szolgál a plazmamembránbeli lokalizációjukhoz. Érdekes módon azt is megállapítottuk, hogy az FLAG-epitópot hordozó A413V-NOHRET vagy H399K-NOHRET is membrán jelet mutatott az anti-FLAG jelöléskor, habár a patch-clamp kísérletek azt mutatták, hogy ezeken a deléciós mutánsokon nincs mérhető áram. Tehát a mi Kv1.3 csatornánk a szinte a teljes C-terminális hiányában (amely magában foglalja a HRET szekvenciát) is a képes a plazmamembránban expresszálni (bár a trunkált csatornák esetében a csatornafehérje intracelluláris retenciójának növekedését figyelhettük meg), azonban nem vezet K^+ áramot.

Kimutattuk, hogy a WT Kv1.3 nem tudta helyreállítani az A413V-NOHRET alegységek vezetőképességét CHO sejtekben, ugyanis a kétféle alegység ko-transzfekciója tiszta homotetramer WT áramokat eredményezett. A fluoreszcens mikroszkópos mérések eredményei egyértelműen kimutatták mindkét alegység jelenlétét a plazmamembránban, ezért ezek értelmezése szerint a WT Kv1.3 és az A413V-NOHRET alegységek vagy nem képeznek heterotetramereket, vagy az A413V-NOHRET alegységek jelenléte a heterotetramerben a csatorna fenotípusát domináns negatív módon

befolyásolja, azaz nem-vezetővé teszi. Az a tény, hogy azok a sejtek, amelyek a WT-Kv1.3-mal voltak csak transzfektálva sokkal nagyobb áramsűrűséget mutattak, mint a mindkét alegységet (WT és A413V-NOHRET) expresszáló sejtekben volt mérhető, alátámasztja a nem-vezető heteromerek képződést a sejtmembránban. Mivel a Kv1.3 csatorna tetramerizációját az N-terminális tetramerizációs domén, és nem a C-terminus irányítja, szintén alátámasztja a hipotézisünket, miszerint az A413V-NOHRET alegységek domináns-negatív hatással rendelkeznek a heterotetramerek képződése során.

A HRET(E) szekvencia a C-terminális azon részén helyezkedik el, amely az aktivációs kapuhoz közel van, vagy annak része is lehet. Tehát az ezen régióban történő mutáció nagymértékben megváltoztathatja a csatornák aktivációs kapuzását, vagy a feszültség-szenzor mozgásának csatolását az aktivációs kapuhoz, vagy akár mindkettőt is, miközben a feszültség-szenzor mozgása nem módosul. Ennek a feltételezésnek a teszteléséhez meghatároztuk a WT-NOHRET csatornák kapuzási áramát. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy ezen csatornát expresszáló sejtek többsége nem mutatott olyan kapuzási áramokat, amelyek hasonlítanak a nem-vezető W384F mutáns kapuzási áramához. Mivel a mikroszkópos kísérletek megerősítik a NOHRET konstruktok felületi expresszióját, ez az eredmény arra utal, hogy a feszültség-szenzor mozgása sérült a NOHRET Kv1.3-ban, amelyből hiányzik a teljes C-terminális, beleértve a HRET szekvenciát is. Ennek a „reverz csatolásnak” az eredete (vagyis a feszültségérzékelő mozgásának elmaradása az aktivációs kapu régiójának módosítása miatt) ismeretlen, de úgy tűnik, hogy nem specifikus a HRET szekvenciára. Amikor csak a HRETE szekvenciát (WT-XHRETE) vágtuk ki, vagy alaninnal helyettesítettük (WT-polyA), és a karboxil-vég többi részét épen hagytuk, vagy a HRETE-t öt alaninra cseréltük a WT-Atail konstruktnban (és a C-terminus többi részét eltávolítottuk) a Kv1.3 vezetőképessége helyreállt. Tehát úgy tűnik, hogy egy peptidlánc hiánya a C-terminálison, az aktivációs kapunál a csatornákat nem vezetőképes csatornákká teszi, de bármilyen aminosav szekvencia motívum pótolhatja a HRETE szekvenciát, legalábbis a Kv1.3-ban.

5.2 Ca²⁺-válasz Orai1 IS-lokalizáció függése T sejtekben

Másodsorban, munkánk során az Orai1 csatorna IS-be történő felhalmozódási kinetikáját és molekuláris hátterét tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy az Orai1 csatornák felhalmozódása az IS kialakulása után 15 perccel érte el maximumát, majd az Orai1 polarizációt mutató sejtek frakciója a 60. percig csökkent. Ezzel ellentétben, az N-terminális deléciókat tartalmazó mGFP-Orai1- Δ 72 Orai1 natív Jurkat sejtekben, valamint az mGFP-Orai1-Full csatornát kifejező, de a STIM1 ill. a SAP97 fehérjét nem expresszáló T-sejtekben magas volt az Orai1-polarizált-sejtek frakciója a CD3-CD28 gyöngyökkel alkotott szinapszisban még a 60. percnél is. Az Orai1 N-terminális régió (mGFP-Orai1-

$\Delta 72$) levágása és a SAP97 leütése az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben nem volt szignifikáns hatással a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} válaszra. A STIM1 leütése azonban megszüntette a Ca^{2+} -választ Jurkat sejtekben. Az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ és mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben a CD3-CD28 gyöngy által kiváltott Ca^{2+} -jel különbözött a (megfelelő) kontroll sejtektől, mivel ezeknél a 60. perc után is Ca^{2+} oszcillációkat láthattunk.

A STIM1 fehérje szinapszisban (és az Orai1 elhelyezkedésében) betöltött funkciójának megértése érdekében az Orai1-Full csatornákat expresszáló Jurkat T-sejtekben leütöttük a STIM1-et (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD). A várakozásoknak megfelelően a STIM1 leütés teljesen megszüntette a sejtek Ca^{2+} -válaszát a CRAC csatornákon keresztül. Az mGFP-Orai1-Full csatornát kifejező STIM1 leütött Jurkat sejtekben az Orai1 IS-beli felhalmozódását vizsgálva azt kaptuk, hogy az Orai1 képes STIM1 nélkül is akkumulálódni a szinapszisban, ahogyan ezt Quintana és munkatársai is kimutatták már korábban (a túl-expresszált Orai1 akkumulálódott az IS-ben az exogén STIM1 ko-expressziója nélkül is). Az Orai1 berendeződés kinetikája az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekben különbözött az mGFP-Orai1-Full sejtektől: az Orai1 polarizált T-sejtek százalékos aránya az IS kialakulása után a 60. percben mutatott maximális értéket, jelezve az Orai1 csatornák elnyújtott berendeződését a Jurkat sejtek és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakult szinapszisban. Ezek a megállapítások, melyek azt sugallják, hogy az Orai1 IS-be történő felhalmozódásához nem szükséges az Orai1-en keresztüli kalcium fluxus, valamint az Orai1 a STIM1 hiányában is képes eljutni a szinapszisba összhangban vannak Lioudyno és társai munkájával, ahol leírták, hogy a nem-funkcionális CRAC csatorna nem befolyásolja a szinapszis kialakulását, valamint az Orai1, a STIM1, a TCR, a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} nélkül is képes berendeződni az immunológiai szinapszis kontakt zónájába.

Ezen kívül az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ mutáns alkalmazásával kimutattuk, hogy az N-terminális eltávolítása drámai hatást gyakorol az Orai1 IS-akkumulációjára, ami valószínűleg befolyásolja a T-sejt aktiválódását. Ez alapján feltételezzük, hogy a béta izoforma képes lehet a T-sejt aktivációt befolyásolni az NFAT transzlokáció megváltoztatásán keresztül.

Az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD és mGFP-Orai1- $\Delta 72$ sejtekben az Orai1 alegységek hasonló akkumulációs kinetikájából adódóan teszteltük azt a hipotézist, miszerint a SAP97 (vagy hDlg1), amelyről kimutatták, hogy bemegy az IS-be és 15 perccel a szinapszis képződése után elhagyja az IS-t, szerepet játszik-e az Orai1 IS-ből történő kivándorlásában. A SAP97 csendesítése során megfigyelhettük (csakúgy, mint az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ és az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD Jurkat sejtekben) az mGFP-Orai1-Full fehérjék folyamatos (tartós) berendeződését az IS-be egészen a 60. percig: ennél a pontnál megállapíthatjuk, hogy a SAP97 és a STIM1 kulcsfontosságú szerepet tölthetnek be az Orai1 szinapszisban való tartózkodásának szabályozásában.

Fentebb említettük, hogy az mGFP-Orai1- Δ 72 és mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtvonalak esetében az Orai1 IS-beli felhalmozódását mutató sejtek aránya a 60. percnél nagyobb volt, mint 15 percnél. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a Ca^{2+} -válasz időbeli eloszlása különbözött az mGFP-Orai1- Δ 72, mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben a kontroll (mGFP-Orai1-Full és mGFP-Orai1-Full-PURO) sejtekhez képest. Bár az első 15. és 30. percben nem találtunk különbséget a különböző sejtvonalak Ca^{2+} -válaszában, azonban a 60. percnél vagy azon túl szignifikáns különbség volt a kontroll és „kezelt” sejtek (mGFP-Orai1-Full vs. mGFP-Orai1- Δ 72, mGFP-Orai1-Full-PURO vs. mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD) között .

Tehát vagy a SAP97 fehérje, vagy az N-terminális rész nélkül az Orai1 csatorna továbbra is működőképes marad, és képes az immunológiai szinapszisba bejutni és felhalmozódni. Ezen túlmenően ezek a módosítások, amelyek hosszabb tartózkodási időt eredményeznek, megváltoztatják a Ca^{2+} jel időbeli eloszlását, és magasabb és nagyobb számú kalcium oszcillációhoz vezetnek. A T-sejt és az APC között kialakult IS akár több óráig is fennmaradhat (amint azt a Mark Davis Immunology Review leírja): ekkor a sejtek közti összekapcsolódás időtartama alatt különféle citokinek és egyéb faktorok szekréciója megy végbe, amelyet szintén a citoszólikus Ca^{2+} koncentráció szabályoz. Az Orai1 IS-ben való bennmaradása tartós kalcium-oszcillációkat idézhet elő a T-sejtekben, és ezáltal patológiás jelátviteli útvonalakat indukálhat.

Végezetül úgy véljük, hogy a SAP97, amely elősegítheti a fehérjék közötti kölcsönhatásokat, és szerepet játszhat az ioncsatornák endocitózisában, része lehet egy molekuláris komplexnek: az Orai1, a STIM1 és a SAP97 kölcsönható partnerek segítségével hagyja el a szinapszis kontaktzónáját.. Ez a feltételezés összhangban van a Jurkat sejtekben lévő N-terminálisán csonka Orai1 (mGFP-Orai1- Δ 72) és a STIM1- és SAP97-hiányos mGFP-Orai1-Full sejtek hasonló Orai1 felhalmozódási kinetikájával, valamint az mGFP-Orai1- Δ 72 és az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtek hasonló Ca^{2+} mintázatával CD3-CD28 bead hatására létrejött immunológiai szinapszisban.

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A tézis első felében bebizonyítottuk, hogy a plazma membránba irányuló Kv1.3 csatorna kijutása akkor is megmarad, ha a teljes C-terminust, beleértve a HRET szekvenciát is töröltük. Ez a megállapítás kiemeli, hogy a membránban történő kifejeződés motívumai nem feltétlenül univerzálisak, és fontosságukat minden egyes csatorna/expressziós rendszer esetében meg kell vizsgálni. Hasonló következtetés vonható le a HRET szekvencia szerepéről a csatorna vezetőképességének szabályozásában: a Kv1.3 esetén még a HRETE szekvencia alanin szubsztitúciója is helyreállította a csatorna funkcióját. Ezen és más közelmúltbeli tanulmányok alapján a Kv1.3 C-terminálisán lévő aminosavak, amelyek közel vannak az aktivációs kapuhoz, fontos szerepet töltenek be az ionvezetés fenntartásához, míg a távoli C-terminális aminosavak a más fehérjékkel való kölcsönhatást szabályozzák, vagy koleszterin-érzékenységet kölcsönöznek a Kv1.3 csatornának.

A második részben megmutathattuk, hogy a CRAC csatornák Orai1 alegységének egyedülálló akkumulációs kinetikája van az IS-ben. A SAP97 és STIM1 fehérjék leütése, valamint a SAP97 feltételezett kötőhelyének törlése az Orai1 N-terminálisán azt mutatta, hogy az SAP97-STIM1 együttes játéka elengedhetetlen az Orai1 szinapszisba rendeződésének szabályozásában. Az Orai1 visszatartása az IS-ben módosítja a Jurkat T-sejtek Ca^{2+} válaszát, ami hozzájárulhat a T-sejtek hiperaktivitásához. Feltételezzük, hogy a két Orai1 izoforma (alfa és béta) létezése szerepet játszhat a T-sejtek Ca^{2+} -függő aktivációjának szabályozásában, azonban ennek tisztázásához további kísérletekre van szükség. Úgy gondoljuk, hogy az Orai1 IS-átrendeződésének molekuláris hátterének megismerése megkönnyítheti az autoimmun betegségek mechanizmusának megértését.



Nyilvántartási szám: DEENK/537/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vörös Orsolya
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056721

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Vörös, O.**, Panyi, G., Hajdu, P.: Immune Synapse Residency of Orai1 Alters Ca²⁺ Response of T Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (21), 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222111514>
IF: 5.923 (2020)
2. **Vörös, O.**, Szilágyi, O., Balajthy, A., Somodi, S., Panyi, G., Hajdu, P.: The C-terminal HRET sequence of Kv1.3 regulates gating rather than targeting of Kv1.3 to the plasma membrane.
Sci Rep. 8 (1), 1-14, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24159-8>
IF: 4.011





További közlemények

3. Szemán-Nagy, G., Benkő, I., Király, G., **Vörös, O.**, Tánczos, B., Sztrik, A., Takács, T., Pócsi, I., Prokisch, J., Bánfalvi, G.: Cellular and nephrotoxicity of selenium species.
J. Trace Elem. Med. Biol. 30, 160-170, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.12.011>
IF: 2.55

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,484

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,934**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.12.21.

