

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A Kv1.3 K⁺ csatornák kapuzásának és expressziójának jellemzése
T sejtekben**

Tóth Ágnes



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2012

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A Kv1.3 K⁺ csatornák kapuzásának és expressziójának jellemzése
T sejtekben**

Tóth Ágnes

Témavezetők: Prof. Dr. Panyi György és Dr. Krasznai Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2012

A Kv1.3 K⁺ csatornák kapuzásának és expressziójának jellemzése T sejtekben

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Tóth Ágnes okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezetők:

Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora és Dr. Krasznai Zoltán, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Petheő Gábor, Ph.D.
Dr. Szentandrassy Norbert, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja és helye: 2012. december 5. 11:00 óra,
DE OEC Élettani Intézet könyvtára

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora
Dr. Lukács András, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora
Dr. Lukács András, Ph.D.
Dr. Petheő Gábor, Ph.D.
Dr. Szentandrassy Norbert, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja és helye:

2012. december 5. 13:00 óra, DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 A T sejt aktivációs mechanizmusa

A limfociták specifikus antigén hatására bekövetkező klonális proliferációja az immunrendszer működésének egyik meghatározó eseménye. A limfocita proliferáció a T sejt receptor/CD3 komplex (TCR/CD3) aktiválását követően indul be, amikor az antigénprezentáló sejt (APC) fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekuláján keresztül az antigén egy adott peptidrészletét bemutatja a specifikus T limfocita számára, ezáltal egy MHC-peptidfragmentum-TCR/CD3 komplex jön létre. Ez az első szignalizációs lépés számos kináz és a foszfolipáz C- γ (PLC γ) aktivációját vonja maga után. A PLC γ aktivációját követően a szignalizációs útvonal két részre ágazik: a PLC γ foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP₂) 1,2-diacilglicerinné (DAG) és inozitol 1,4,5-triszfoszfáttá (IP₃) hasítja. A DAG molekula a protein kináz C enzimet (PKC) aktiválja, és az aktivátor protein-1 transzkripció faktor sejtmagban való felhalmozódását segíti elő. A jelátvitelben a protein kinázok mellett a T limfocita aktiváció fontos lépése a citoszolikus Ca²⁺ koncentráció kétfázisú megemelkedése. Ezt a folyamatot egyrészt a citoszolban szabadon diffundáló IP₃ molekula az endoplazmatikus retikulum (ER) membránján kifejeződő receptorokhoz való kötődése aktiválja, amely során az aktivált limfocitában a szabad Ca²⁺-koncentráció megnövekszik a nyugvó állapothoz képest, az endoplazmatikus retikulumból Ca²⁺ szabadul fel. Ez a citoszolikus Ca²⁺ komponens azonban nem elegendő a gén expresszió vezérléséhez. A magas intracelluláris Ca²⁺-koncentráció elérésének és fenntartásának forrása az extracelluláris tér. Az endoplazmatikus retikulum kiürülésével aktiválódnak a STIM1 molekulák (Stromal interaction molecule 1), amelyek az ER membránjának azon részére migrálnak, ahol aktiválni tudják a plazmamembránban található Orai1 molekulákat, amelyek a kalcium felszabadulás aktivált Ca²⁺ (CRAC) csatorna pórusát alkotják. A tartós, legtöbb esetben oszcilláló intracelluláris Ca²⁺-koncentráció-emelkedés a kalmodulinon

keresztül aktiválja a kalcineurint. Ez elősegíti az NF-AT (Nuclear factor of activated T-cells) transzkripció faktor magba történő transzlokációját, aminek következtében az interleukin-2 (IL-2) gén aktiválódik, és a többi jelátviteli mechanizmussal szorosan együttműködve beindítja a sejtek proliferációját. Az IL-2 expresszió szükséges a további, immár antigénfüggetlen T sejt aktivációhoz.

1.2 Az immunológiai szinapszis

In vivo körülmények között a T limfocita aktiváció első lépése, hogy az antigén prezentáló sejt MHC fehérjéihez kötődő antigén és a TCR/CD3 kölcsönhatása során kialakul az immunológiai szinapszis (IS), azaz megtörténik az antigén bemutatása. Az IS az antigént prezentáló és az azt felismerő sejt közötti interakciós felszínt jelenti. Az IS kialakulása a két sejt plazmamembrán fehérjéinek átrendeződését és szubcelluláris membrándoménekbe történő szegregációját eredményezi, ezáltal létrehozva az ún. szupramolekuláris aktivációs komplexet (SMAC). Abraham Kupfer definiálta elsőként a T és B sejt-konjugátumok közötti, központi TCR komplexet centrális szupramolekuláris aktivációs klaszterként (cSMAC). Továbbá kiderült, hogy a cSMAC két elkülönülő régióként, egy belsőbb és egy külsőbb cSMAC-ként jellemezhető. Az előbbiben nagy mennyiségű TCR, az utóbbiban a CD28 és PKC- θ membrán- és citoszolikus fehérjék dominálnak az immunológiai szinapszis T sejt felőli oldalán. Az immunológiai szinapszis kialakításában résztvevő két sejt közötti kontaktus stabilizálásában a CD3 receptor által kijelölt cSMAC régió mellett, a perifériális SMAC (pSMAC) is szerepet játszik. A központi szupramolekuláris egységet a leukocita funkcióval asszociált 1-es típusú fehérje (LFA-1) és az intercelluláris adhézión molekula-1 (ICAM-1) kölcsönhatás által kialakult gyűrű, valamint a talin határolja, ez az ún. perifériás szupramolekuláris aktivációs klaszter. Az LFA-1 és az ICAM-1 molekulák kezdetben adhézión molekulákként funkcionálnak, elősegítve a T sejt - APC illetve a TCR - MHC-

peptidfragmentum kapcsolat. Az ICAM-1-hez kötődő LFA-1 a pSMAC hálózatba integrálódik.

Az említett régiók mindegyike molekulák ezreit tartalmazza, amelyek nem-kovalens módon kötődnek egymáshoz ebben a funkcionális hálózatban. A fehérjék térbeli orientációja biztosítja azt, hogy a TCR/CD3 komplex aktiválása hatékony legyen a protein kinázok molekuláris közelségbe kerülése eredményeként. Kupfer később egy ún. disztális szupramolekuláris aktivációs klasztert (dSMAC) is definiált mint a struktúra legkülsőbb régióját, amelyben többek között a CD45 játszik szerepet. A disztális pólus komplexet Burkhardt írta le, amely olyan specifikus negatív regulátorok elkülönítése szempontjából lehet lényeges, mint pl. az SHP-1.

Továbbá nemcsak az adhéziós, de a kostimulációs fehérjék is kritikus szerepet játszanak a TCR mikroklaszterek kialakulásában, például a CD28 vagy a CD2, utóbbi egyben adhéziós funkciókat is betölt.

1.3 A Kv1.3 csatorna jellemzői

1.3.1 A Kv1.3 csatorna biofizikai jellemzői

A Kv1.3 csatorna a K^+ csatornák *Shaker* családjába tartozik. A *Shaker* csatornák négy azonos, megközelítőleg szimmetrikusan elhelyezkedő alegységből felépülő tetramer makromolekulák. Mindegyik alegység kb. 500 aminosavból áll, az alegységek közötti nem-kovalens kötések tartják egyben a tetramer csatornát. Az egyes alegységek hat transzmembrán alfa-helikális szegmensből állnak, melyeket extra- és intracelluláris hurkok kapcsolnak össze. Ezen szegmenseknek és hurkoknak jól meghatározott szerepük van a csatorna működésében. A szegmensek közül az első négy felelős a csatorna nyitásáért – különösen a negyedik az itt található pozitív töltésű aminosavak miatt kitüntetett szerepet játszik az aktiváció során – míg az ötödik és hatodik szegmens közötti extracelluláris hurok alakítja ki a csatorna pórusát. Ebben a szakaszban található az a négy aminosavból álló szekvencia (GYGD), amely felelős a K^+ -

szelektivitásért, továbbá a csatorna pórusát eltömítő gátlószerek is e régió aminosav oldalláncaival lépnek kölcsönhatásba.

A *Shaker* csatornákhöz hasonlóan a Kv1.3 csatornák is a membrán depolarizációjára nyílnak ki, mely a négy alegység kooperatív mechanizmusa révén jön létre. A membránpotenciál változásait a csatorna feszültség-szenzora érzékeli, melyet a többszörösen pozitív töltésű S4 hélixek és a nettó negatív töltést hordozó S3 hélixek közösen alkotják. A Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbfeszültsége -50 mV körül van, ami megegyezik a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljával. Az aktivációs küszöb felett a membrán további depolarizációjával a nyitási valószínűség meredeken emelkedik. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése a szigmoid futású Boltzmann-függvénnyel jellemezhető, $+20 - +30$ mV körül éri el a telítési értéket, ekkor a csatornák nyitási valószínűsége 1. A Kv1.3 csatornák egyensúlyi inaktivációja nem teljes a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljánál. Az egyensúlyi aktiváció és az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése egy olyan membránpotenciál-ablakot határoz meg, amelyen belül a Kv1.3 csatornák aktívak. Ez az ablak a limfociták nyugalmi membránpotenciál-értékének megfelelő feszültségeknél van, így a Kv1.3 csatornákon keresztüli K^+ fluxus hozzájárulhat a diffúziós membránpotenciál kialakításához.

A gyors aktivációt követően, depolarizált membrán mellett a *Shaker* K^+ csatornák egy nem-vezető, inaktivált állapotba kerülnek, mely kétféle, az ún. N- és C-típusú mechanizmus révén valósulhat meg. Az N-típusú, gyors inaktiváció néhány ms alatt jön létre, amelyben a fehérje intracelluláris N-terminális oldalán egy több pozitív töltést tartalmazó peptid szakasz blokkolóként viselkedik úgy, hogy a csatorna citoplazma felőli oldalán bekötődik, ezáltal elzárja a pórust. Azonban számos *Shaker* K^+ csatornában, köztük a Kv1.3-ban is hiányzik ez az inaktivációs egység, így inaktivációjukért az ún. lassú, C-típusú mechanizmus a felelős, amely néhány 100 ms, vagy akár több s alatt következik be.

A C-típusú inaktiváció valószínűleg a szelektivitási filter és a csatorna

extracelluláris bejárata környékén összetett mechanizmussal lejátszódó konformáció-változás eredménye. A C-típusú inaktiváció a külső kationokra és a csatornapórus aminosav-összetételére érzékeny. Ezt a folyamatot az extracelluláris K^+ koncentráció megemelkedése gátolja. A C-típusú inaktiváció érzéketlen az intracelluláris tetraetilammóniumra (TEA), ugyanakkor a csatorna extracelluláris oldalán alkalmazott TEA a folyamatot gátolja. Az inaktivációban valószínűleg a feszültség-szenzor is szerepet játszik, azáltal, hogy konformációs átrendeződésen megy keresztül.

A *Shaker* csatornák lassú inaktivációja két egymás utáni folyamatot foglal magában: a csatorna külső pórusának kezdeti beszűkülését, ami megakadályozza az ionok áramlását, és az azt követő sokkal lassabb szelektivitási filterben bekövetkező konformáció-változást, ami stabilizálja a feszültség-szenzort és a pórust, és töltésbefagyasztást eredményez. Az inaktiváció csökkenti a membránpotenciál-kontrollhoz rendelkezésre álló, aktiválható K^+ csatornák számát. Az inaktivált állapotból a Kv1.3 csatornák még -120 mV membránpotenciál mellett is hosszú idő alatt (50 s) térnek vissza nyugalmi (zárt) állapotukba, így az aktivált Kv1.3 csatornák jelentős K^+ fluxust képesek létrehozni, mielőtt a nem-vezető inaktív állapotba kerülnek. A Kv1.3 csatornák e tulajdonságai, valamint a limfociták membránjának rendkívül magas ellenállása (10–20 G Ω) biztosítják azt, hogy a T sejtek membránpotenciálját kevés számú (2-300) ioncsatorna is képes fenntartani.

1.3.2 A Kv1.3 poszt-szintetikus módosítása

A K^+ csatornák aktivitása a gátlószerek mellett szabályozható a csatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek módosításával is. Ez utóbbi történhet fehérje-lipid és fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül, ami magában foglalja az ioncsatornák protein kinázok által történő szabályozását is.

Kimutatták, hogy Jurkat T sejtekben mind a PKA, mind a PKC negatív irányban szabályozza a Kv1.3 csatorna aktivitását, továbbá, hogy a PKC-függő

moduláció az előfeltétele a csatorna PKA általi szabályozásának. Ezzel ellentétben humán T sejtekben a PKA és a PKC általi foszforiláció a csatorna aktivitását pozitív irányban szabályozza azáltal, hogy a csatorna egyensúlyi aktivációs és inaktivációs feszültségfüggését módosítja. A Kv1.3 csatornaaktivitás PKC függő - szerin/treonin-foszforiláció általi -szabályozását későbbi tanulmányok Jurkat sejtekben is alátámasztották, azonban kimutatták, hogy a PKC- és PKA-mediált szabályozás nagyban függ a csatorna természetes környezetét kialakító fehérjétől.

Kimutatták, hogy a receptor tirozin kinázok szuppresszív hatással vannak a Kv1.3 áramra. T sejtekben azonban a jelátvitel nem-receptor tirozin kináz által mediált, amelyek a TCR/CD3 aktiváció következtében dúsulnak fel, így T sejtekben a Kv1.3 ezen kinázok általi szabályozása nagyobb élettani relevanciával bír. Nem-receptor tirozin kinázok (v-s-rc) és Kv1.3 csatornák egyidejű transzfektálása HEK-293 sejtekbe a csatornafehérje tirozin foszforilációjában jelentős növekedést mutatott, amely „cell-attach” patch konfigurációban makroszkópikus áramcsökkenéssel társult. Tirozin foszfatáz inhibitorok alkalmazása (pervanadate) az endogén kinázok általi Kv1.3 foszforilációt növelte, amit ennek megfelelő áramamplitúdó csökkenés követett.

Ezen felül biokémiai és biofizikai kísérletek egész sora utal arra, hogy a már megismert molekulákon kívül a Kv1.3 ioncsatornák is fontos szereplők az IS kialakulása során létrejött jelátviteli komplexben. Ismert a Kv1.3 csatornák p56^{lck} kináz általi szabályozása, a Kv1.3 és p56^{lck} hDlg (SAP97) adapter fehérjéken keresztüli kapcsolata, továbbá a Kv1.3 csatornák járulékos alegységéhez (Kvβ1.2) kapcsolódó egyéb adapter proteineken keresztül (ZIP-1, ZIP-2) a PKC-hez történő asszociáció is ezt a feltételezést támasztja alá. A Kv1.3 csatornák és az immunológiai szinapszis molekulái közötti kapcsolat lehetőségét az a felismerés is támogatta, hogy az említett fehérjék koleszterin- és szfingomielin-gazdag membrán mikrodoménekhez, ún. lipid raftokhoz

asszociálódnak, melyek dinamikusan átrendeződnek a TCR/CD3 komplex aktiválását követően.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a csatornák foszforilációs módosítása szabályozza a Kv1.3 ioncsatornák működését, valamint a csatornák IS-beli feldúsulása befolyásolja az IS-ben a jelátviteli folyamatok hatékonyságát.

1.4 A regulátor T sejtek és az autoimmunitás

A $CD4^+CD25^+$ T sejtek, melyeket „regulátor” (regulatory) T sejteknek (T_{reg}) neveznek, kritikus szerepet játszanak a saját szövetek iránti immuntolerancia fenntartásában, az autoimmun folyamatok visszaszorításában. A T_{reg} sejtek száma és aktivitása fiziológiás körülmények megváltozásához köthető. A T_{reg} sejtek gátolhatják a T sejt immunválaszt sclerosis multiplex (SM), 1-es típusú diabétesz és más autoimmun betegségek esetén. Ugyanakkor a megnövelt csatornaszám és felerősödött csatornafunkció elősegíthetik a tumorok progresszióját is.

Kezdetben a T_{reg} sejteket kizárólag az interleukin-2 receptor α -láncának expressziójával azonosították (CD25), de később a FoxP3 transzkripciós faktor jelenléte bizonyult a T sejtek ezen alcsoportjának legspecifikusabb markerének. Mivel a FoxP3 egy intracelluláris marker, jelölése a sejtmembrán permeabilizációját igényli. Ez számos élettani vizsgálatot tett körülményessé. Újabban azonban kimutatták, hogy a sejtfelszíni CD127, ami a heterodimer IL-7 receptor része, regulátor T sejteken negatív irányban szabályozott, és a $CD25^{magas}CD127^{alacsony/-}$ expressziós szint jól korrelál a FoxP3-mal. A T sejt aktivációja után a CD127 receptor minden humán T sejten negatív irányba szabályozott, de az effektor és memória T sejtek nagy részében újra kifejeződik mindaddig, amíg a $FoxP3^+$ T sejtek $CD127^{alacsony}$ -ak maradnak.

Mivel a T_{reg} sejtek kritikus szerepet játszanak az immunrendszer működésében, tumoros és autoimmun betegségek szabályozásában, így mára egyre inkább előtérbe kerülnek terápiás célpontokként. Nagy jelentőségűek lehetnek azok a kezelések, amelyek a jövőben szelektíven tudnák a T_{reg} sejtek funkcióját stimulálni autoimmun betegségekben vagy gátolni azokat tumoros megbetegedések esetén.

1.5 A Kv1.3 csatornák gátlószerei specifikus immunszuppressziót okozhatnak

Chandy és munkatársai kimutatták, hogy az említett betegségekben szenvedő páciensekben az aktivált, beteg szöveti környezetből izolált effektor memória T sejtekben (T_{EM}) a Kv1.3 expresszió sokkal magasabb, mint a naiv és centrális memória T sejtekben (T_{CM}) (kb. 1500/sejt). Ezzel szemben az IKCa1 csatornák száma sokkal alacsonyabb az aktivált T_{EM} -ben, mint az utóbbi kettőben. Továbbá, a naiv ($CCR7^+CD45RA^+$) és T_{CM} sejtek ($CCR7^+CD45RA^-$) esetén a mitogén indukált proliferáció a Kv1.3 csatornák expressziójának enyhé (kb. 250/sejt \rightarrow 400/sejt) ugyanakkor az IKCa1 csatornák expressziójának jelentős fokozódásával (8-10/sejt \rightarrow 500/sejt) jár együtt.

Azaz a T_{EM} sejtek, valamint a nyugalomban lévő összes említett T sejt membránpotenciálját döntően a Kv1.3 ioncsatornák szabályozzák, míg a naiv és T_{CM} alpopulációban az IKCa1 a domináns. A Kv1.3 nagy affinitású gátlószerei (pl. ShK toxin, IC \sim 100 pM) a T_{EM} sejtek osztódását specifikusan gátolták, ugyanis a Kv1.3-blokkolás mediált proliferáció-gátlás alól a nyugvó (naiv) és T_{CM} sejtek az IKCa1 csatornák fokozott expressziójával mentesülnek. A Kv1.3 csatorna szelektív gátlásával T_{EM} sejtek aktivációja gátolható, immunszuppresszió érhető el.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleti munkám két fő irányvonalat képviselt:

- A. A Kv1.3 ioncsatornák tanulmányozása az immunológiai szinapszisban
- B. Sclerosis multiplexes betegek véréből izolált regulátor T sejtek ioncsatorna-expressziós vizsgálata

Munkám során az alábbi célokat tűztük ki:

A.

1. Az általunk használt D10 egér T_H2 sejtvonal K^+ ionáramainak karakterizálása, biofizikai jellemzése (egyensúlyi és kinetikai paraméterek meghatározása) és farmakológiai vizsgálata specifikus gátlószer alkalmazásával.
2. Egy antigénprezentáló sejt (APC) – T sejt modellrendszer beállítása az immunológiai szinapszis tanulmányozására.
3. Immunfluoreszcens jelölés segítségével a Kv1.3 ioncsatornák vizsgálata az immunológiai szinapszisban.
4. Nyugalomban és szinapszisban lévő D10 sejtek K^+ -áramainak egyensúlyi és kinetikai jellemzőinek összehasonlítása.
5. Protein kináz gátlószer alkalmazásával a csatornák átrendeződését szabályozó tényezők meghatározása, valamint annak vizsgálata, hogy a Kv1.3 csatornák immunológiai szinapszisba rendeződése milyen funkcionális következményekkel jár.

B.

Célunk volt továbbá a regulátor T sejtek (T_{reg}) ioncsatorna-expressziós mintázatának vizsgálata, vagyis annak a meghatározása, hogy ez a speciális T sejt alpopuláció rendelkezik-e speciális ioncsatorna mintázattal, valamint, hogy különbözik-e az egészséges és az autoimmun betegségben szenvedő donorok T_{reg} illetve naiv T-sejtjeinek ioncsatorna mintázata.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Sejtek és az immunológiai szinapszis létrehozása

Az egér D10 T_H2 sejt vonalat, mely a tojásfehérje conalbumin antigénre specifikus, antigénfelismerő sejtként, míg a CH12-LX B sejteket antigénbemutató sejtként használtuk. A CH12-LX sejteket egy éjszakán át 500 µg/ml conalbuminnal kezeltük. A T és B sejteket 1:1 arányban kevertük. A D10 sejtek és egyben a szinapszis azonosítása a PKC-θ GFP fluoreszcens jele alapján történt.

A kétpórusú csatornák feltételes jelenlétének vizsgálatára expressziós rendszerként a HEK-tsA sejteket használtuk.

A humán perifériás limfocitákat 6 sclerosis multiplexes betegből és 9 egészséges önkéntesből izoláltuk.

3.2 Immunhisztokémia és konfokális lézer pásztázó mikroszkópia

A szinapszis kialakítását követően a konjugátumok D10 sejtjeit poli-L lizines fedőlemezekre 3,75% formaldehiddel való fixálás után jelöltük. A sejteket extracelluláris Kv1.3-ellenes elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on, majd Cy3-konjugált másodlagos antitesttel egy órán át. A sejt-konjugátumokról készült felvételeket Olympus FV1000 típusú konfokális mikroszkóppal készítettük. A PKC-θ izoformához konjugált GFP gerjesztése 488 nm-en Argon-ion lézerrel, míg a Cy3 gerjesztése 543 nm-en HeNe lézerrel történt. A fluoreszcens detektálási csatornához a következő szűrőket használtuk: 515/15 BandPass (GFP) és 605/50 BP (Cy3).

3.3 Áramlási citometria

A humán perifériás limfocitákat a következő fluoreszcens festékekkel konjugált antitestekkel jelöltük 30 percig jégen: anti-CD4 – FITC, anti-CD127 – PE és anti-CD25 – APC. Az áramlási citometriás sejtleválasztást FACSVantage SE – DiVa berendezéssel végeztük. A fluorofórok gerjesztése 488 nm-en Argon-

ion lézerrel, 532 nm-en dióda pumpás lézerrel és 633 nm-en HeNe lézerrel történt. A fluoreszcenciás detektálási csatornákhöz a következő szűrőket használtuk: 530/30 BandPass (FITC), 585/42 BP (PE), 650 Long Pass (APC).

3.3.1 CD4⁺ regulátor és naiv T sejtek szeparálása

Az egészséges egyénektől, és a sclerosis multiplexes betegektől származó perifériás limfociták populációit áramlási citometriával választottuk szét elektrofiziológiai méréseinkhez. A sejteket CD4, CD25 és CD127 sejtfelszíni markerek alapján különböztettük meg. A CD4⁺CD25^{magas}CD127^{alacsony} sejteket tekintettük regulátor, míg a CD4⁺CD25^{alacsony}CD127^{magas} sejteket naiv T sejteknek. Mivel a patch-clamp mérések egyedi sejt szinten történnek, a sejtek szétválasztása során nagy hangsúlyt fektettünk a populációk homogenitására, hogy a más fenotípusok általi szennyezéseket minimálisra csökkentsük.

3.4 Anyagok

A kísérletekben használt vegyszereket – Tetraetilammónium (TEA), Margatoxin (MgTx), Charybdotoxin (ChTx), anandamid (AEA), ruténium vörös, H89, GF109203X, Damnachantal - Sigma-Aldrich Ltd., Alomone Labs, Merck Ltd., gyármányúak voltak.

3.5 Elektrofiziológia

A patch-clamp méréseket ún. teljes-sejt (whole-cell) vagy outside-out konfigurációban végeztük. Méréseinkhez Axopatch 200B és 200A patch-clamp erősítőket használtunk feszültség-zár üzemmódban. Méréseink során szükség esetén soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk. A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üveg kapillárisokból húztuk két fázisban. A pipetták ellenállása normál extra- és intracelluláris oldat esetén 2-5 MΩ volt.

A külső normál oldat 145 mM NaCl alapú, a belső oldat 140 mM KF alapú volt.

3.6 Az adatok kiértékelése

A teljes-sejt vezetőképességet a $G = I_{\max} / (V - E_{\text{rev}})$ egyenlettel definiáltuk, ahol I_{\max} a V teszt feszültségnél mért áram csúcsértéke, E_{rev} pedig az áram megfordulási potenciálja. A csatornák számát a membránban a teljes-sejt vezetőképességének és az egyedi csatorna vezetőképességnek hányadosaként határoztuk meg.

Az áramsűrűségeket az áramamplitúdó és kapacitás hányadosaként határoztuk meg (pA/pF), majd az adott csoportra vonatkozóan átlagoltuk a számolt értékeket.

A kísérleteink során kapott adatok statisztikai összehasonlítását kétmintás t-próbával (szignifikancia-szint=0,05) vagy Mann-Whitney rank sum teszttel (MWRST) végeztük el. A mérési adatoknál az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtuk meg legalább n=4 esetén.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A Kv1.3 csatorna az immunológiai szinapszisban

4.1.1 A D10 sejt vonal teljes sejt áramának biofizikai és farmakológiai jellemzése

Elektrofiziológiai kísérleteink során a D10 sejt vonalon regisztrált kálium ionáramok biofizikai paramétereinek meghatározásakor az aktivációs és inaktivációs kinetikát, valamint az egyensúlyi aktiváció membránpotenciál függését tanulmányoztuk. Az aktivációs kinetika meghatározásakor rövid, 15 ms-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az áramgörbét Hodgkin és Huxley által kidolgozott modell szerint (HH) illesztettük az $I(t) = I_a \times (1 - \exp(-t/\tau_a))^4 + C$ egyenlettel, ahol I_a az aktiválódó áram amplitúdója, τ_a az aktivációs időállandó, C pedig az áram értéke a depolarizáló impulzus kezdetén (-120 mV-nál). Az aktivációs időállandót egy sejt esetén 3, 15 s-onként bekövetkező depolarizáló impulzus során kialakuló aktivációs időállandó átlagából határoztuk meg ($\tau_a = 1,36 \pm 0,06$ ms, $n = 18$).

Az inaktivációs kinetika meghatározásakor hosszú, 1,5 vagy 2 s hosszúságú 40 mV-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az inaktivációt jellemző időállandót az áramgörbe leszálló ágának egy-exponenciális függvényvel való illesztésével határoztuk meg: $I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_{in}) + C$, ahol I_0 az áramamplitúdó, τ_{in} az inaktivációs időállandó, C pedig a megmaradó teljes sejt áramérték (steady-state value) a depolarizáló pulzus végén. Az inaktivációs időállandót, az aktivációs időállandóhoz hasonlóan, 3, 60 s-onként bekövetkező depolarizáló impulzus során kialakuló inaktivációs időállandó átlaga alapján határoztuk meg ($\tau_{in} = 365 \pm 27$ ms, $n = 17$).

Továbbá, meghatároztuk a normált konduktancia tesztpotenciál függését is. Az adatpontokhoz Boltzmann-függvényt illesztettünk, az illesztés eredményeképpen kapott félaktivációs-feszültség ($V_{1/2} = -26,4 \pm 1,5$ mV) és a meredekség értékeket ($k = 7,6 \pm 0,5$ mV, $n = 12$) használtuk egyensúlyi aktiváció membránpotenciál függésének jellemzésére. Az aktiváció és

inaktiváció kinetikus és steady-state paramétereinek irodalmi adatokkal történő összevetése a Kv1.3 csatornák jelenlétére utalt.

Viszont a kálium csatornák kizárólag biofizikai jellemzők alapján történő azonosítása nem egyértelmű; néhány rágszáló T limfóma sejtvonal Kv3.1 csatornákat is kifejezhet, ami szintén hozzájárulhat a D10 sejtvonal teljes-sejt áramához. Ezért TEA és a MgTX alkalmazásával farmakológiai karakterizálást végeztünk.

10 mM TEA jelenlétében a gátlás mellett C-típusú inaktivációt is megfigyeltünk. 50 pM MgTx a kontroll körülmények között mért teljes-sejt ionáram csúcsértékét megközelítőleg 22 %-ára csökkentette. A dózis-hatás görbékre két-paraméteres Hill egyenletet illesztettünk, amely alapján meghatároztuk a K_d értékeket: 13,4 mM értéket kaptunk a TEA-ra, míg 16,8 pM értéket a peptid toxinra. Ezek alapján egyértelműen eldönthető volt, hogy a D10 sejtek endogén Kv1.3 kálium csatornákat expresszálnak.

4.1.2 A TASK csatornák feltételes jelenlétének vizsgálata a D10 sejtvonalon

Annak érdekében, hogy kizárjuk az TASK-1 és TASK-3 csatornák jelenlétét, illetve a teljes-sejt áram kinetikájára gyakorolt hatását, kísérleteinket a D10 sejtekben feltételesen expresszálódó kétpórusú K^+ csatornáknak vizsgálatára irányítottuk.

A karakterizálás során, mivel a TASK csatornák idő- és feszültségfüggetlenek, feszültség-rámpa protokoll segítségével megmértük a teljes-sejt áramokat D10 sejtekben. KCl-alapú, Ca^{2+} -mentes belső oldatot alkalmaztunk, hogy az IKCa1 csatornák hozzájárulását elhanyagolhatóvá tegyük a vizsgált limfocitákban. A feszültségfüggő Kv1.3 csatornák eliminálására 100 pM MgTX-t alkalmaztunk, valamint a tartófeszültséget 0 mV-ra állítottuk az ún. dupla-rámpa protokoll alkalmazása mellett. A megfordítási potenciált -4mV-nak határoztuk meg, amely sokkal pozitívabb, mint ami a TASK csatornák

jelenlétében várható lett volna (elméleti érték az oldatok összetételének ismeretében -85 mV). Ezen túl, 150 mM K⁺-tartalmú oldat jelenlétében nem tapasztaltunk jelentős jobb oldali eltolódást az áram és feszültség függvényében, a TASK csatornák jelenléte a D10 sejtvonalon kizárható.

4.1.3 A kétpórusú K⁺ csatornák nem érzékenyek Margatoxinra

HEK-tsA sejtekbe mTASK-1 (egér) és hTASK-3 (humán) csatornákat kódoló plazmid DNS-eket transzfektáltunk, melyekre 100 pM MgTX hatástalannak bizonyult feszültség-rámpa protokoll alkalmazása mellett 0 mV tartási feszültségen. Ez a felismerés is azt bizonyítja, hogy a D10 sejtvonal teljes-sejt K⁺ áramait Kv1.3 csatornák adják, és a TASK-1 és TASK-3 csatornák a teljes-sejt áramhoz való hozzájárulása elhanyagolható.

4.1.4 TASK gátlók hatása a Kv1.3 csatornára

Az anandamid (AEA) elfogadott Kv1.2, Kv1.5 és Kv4.3 gátlószer. Megvizsgáltuk ezeknek a gátlók HEK-tsA sejtekbe transzfektált Kv1.3 csatornákra kifejtett gátló hatását; 3 és 30 μM koncentrációban alkalmaztuk az anandamidot, 10 μM koncentrációban a ruténium vöröset (RR). Mindkét anyagot a Kv1.3 csatornák hatékony gátlószerének találtuk, a Kv1.3 csatornák áramamplitúdóit szignifikánsan csökkentették, és a Kv1.3 esetében megbecsült K_d értékek jó egyezést mutattak a kétpórusú csatornákra leírtakkal (AEA: 3 μM, RR: 4 μM). Továbbá, anandamid alkalmazása során az inaktivációs kinetika gyorsulását tapasztaltuk. Azért, hogy minimálisra csökkentsük az endogén Kv1.3 csatornák teljes-sejt áramhoz való hozzájárulását, a csatornákat túlexpresszáltuk a HEK-tsA sejtekben, és outside-out konfigurációt alkalmaztunk az áramok regisztrálása során. Ezek az eredmények azt szemléltetik, hogy mind az anandamid, mind a ruténium vörös, a TASK csatornáknál alkalmazott koncentrációkkal összevethetően, a Kv1.3 csatornák gátlószerei is, ezért a két csatornatípus ezeknek a vegyületeknek az alkalmazásával nem különíthető el.

4.1.5 A Kv1.3 csatornák kapuzása megváltozik az immunológiai szinapszisban

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, milyen következményekkel jár az immunológiai szinapszis létrejöttének folyamata, azaz a csatornafunkció más fehérjék általi módosítása milyen mértékben valószínűsíthető, az APC-hez kapcsolódó D10 sejteknek is megvizsgáltuk a teljes-sejt áramait. Az APC-hez kapcsolódó és egyedülálló D10 sejten kifejeződő Kv1.3 csatornák normált áramgörbéit összehasonlítva mind az aktivációs kinetikában ($\tau_{a,c} = 1,36 \pm 0,06$ ms, $\tau_{a,IS} = 2,36 \pm 0,13$ (n = 7), $p < 0,001$), mind az inaktivációs kinetikában ($\tau_{in,c} = 365 \pm 27$ ms, $\tau_{in,IS} = 263 \pm 29$ (n = 7), $p = 0,037$) bekövetkezett különbségeket szignifikánsnak találtuk, vagyis az IS-ban lévő D10 sejtekben a Kv1.3 csatornák aktivációja jelentősen lelassult, az inaktivációs kinetika pedig jelentős mértékű gyorsulást mutatott.

Feltételeztük, hogy a kinetikában bekövetkező változások az aktiváció egyensúlyi paramétereit is módosíthatják. A tesztfeszültség függvényében ábrázolt normált vezetőképességek a szinapszisban lévő Kv1.3 csatornák egyensúlyi aktivációjának membránpotenciál függése a pozitív feszültségek irányába tolódott el ($V_{1/2,c} = -26,4 \pm 1,5$ mV (n = 12), $V_{1/2,IS} = -20,9 \pm 2$ mV (n = 7), $p < 0,05$). Az IS-ban lévő Kv1.3 csatornák meredekség értéke is nagyobb volt, bár a különbség statisztikailag nem szignifikáns ($k_c = 7,6 \pm 0,5$ mV, $k_{IS} = 9,3 \pm 0,8$ mV, $p = 0,115$). Az inaktivációs kinetikai paraméterek alapján arra következtettünk, hogy valamilyen foszforilációs vagy defoszforilációs folyamat áll a jelenség hátterében.

4.1.6 PK antagonisták gyorsítják a Kv1.3 inaktivációját

Mivel nem ismert, hogy a D10 sejtekben a Kv1.3 csatornához mely protein kináz/foszfataz képes asszociálni, ezért megvizsgáltunk két PK és egy p56^{lck} inhibitor Kv1.3 csatornák áramára gyakorolt hatását, amelyek a következők voltak: a PKA-t gátló H89 ($K_d \approx 50$ nM), a PKC inhibitor

GF109203X (GF, $K_d \approx 14$ nM) valamint a p56^{lck} kináz gátló Damnachantal (DAM, $K_d \approx 17$ és 620 nM). Korábban kimutatták, hogy ezeknek a vegyületeknek közvetlen gátló hatása is van ioncsatornákra, ezért a kísérletekben alkalmazott koncentrációkat úgy állítottuk be, hogy elkerüljük ezen vegyületek blokkoló hatását, ugyanakkor még effektíven inaktiválják a protein kinázokat. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak: H89: 0,1 μ M, GF: 0,5 μ M, DAM: 1 μ M.

30 ms hosszú, +50 mV-os depolarizáló impulzusokkal vizsgáltuk a csatornák aktivációs kinetikáját kontroll és PK antagonistákkal kezelt sejteken, amelyet szintén az n^4 -es HH modellel illesztettünk. Az aktivációs kinetika a PK antagonisták hatására nem változott szignifikánsan ($\tau_{a,c} = 1,36 \pm 0,06$ ms, (n = 18) $\tau_{a,GF} = 1,51 \pm 0,17$ ms (n = 9), $p = 0,3$; $\tau_{a,H89} = 1,56 \pm 0,2$ ms (n = 13) $p = 0,3$; $\tau_{a,DAM} = 1,16 \pm 0,19$ ms (n = 6) $p = 0,22$).

Az inaktivációs kinetika vizsgálata során azonban mind a H89, mind a GF109203X vegyületekkel, mind pedig a Damnachantallal történő kezelés során azt tapasztaltuk, hogy a Kv1.3 csatornák inaktivációja gyorsul, az inaktivációs időállandó szignifikánsan csökkent a kezeltlen kontrollokhoz képest a D10 sejtekben ($\tau_{in,c} = 365 \pm 27$ ms, (n = 17) $\tau_{in,GF} = 252 \pm 32$ ms (n = 9); $\tau_{in,H89} = 254 \pm 20$ ms (n = 12); $\tau_{in,DAM} = 269 \pm 27$ ms (n = 7) $p < 0,05$).

Az aktiváció egyensúlyi és kinetikai jellemzőit is tanulmányoztuk; az egyensúlyi aktiváció paraméterei, feszültségfüggése és meredeksége nem változtak meg szignifikánsan a PK inhibitorokkal történő kezelés hatására ($(V_{1/2,c} = -26,4 \pm 1,5$ mV (n = 12); $(V_{1/2,GF} = -27,6 \pm 1,3$ mV (n = 7); $(V_{1/2,H89} = -24,8 \pm 2,4$ mV (n = 10); $(V_{1/2,DAM} = -27,0 \pm 2,1$ mV (n = 5); $k_c = 7,6 \pm 0,5$ mV; $k_{GF} = 6,6 \pm 0,6$ mV; $k_{H89} = 7,7 \pm 0,6$ mV; $k_{DAM} = 8,6 \pm 1,2$ mV, $p = 0,05$).

Minden kezelésre megbecsültük az áramsűrűségeket (CD) is, a H89 és Damnacanthal esetében szignifikáns csökkenés következett be ($CD_c = 154 \pm 16$ pA/pF, $CD_{H89} = 89,4 \pm 14$ pA/pF, $CD_{DAM} = 85,9 \pm 20$ pA/pF, $p < 0,05$), míg a

GF kezelés, méréseink szerint, nem befolyásolta jelentősen a csatornaaktivitást ($CD_{GF} = 163,1 \pm 25$ pA/pF).

4.2 K^+ csatornamintázat vizsgálata egészséges és sclerosis multiplexes donoroktól izolált $CD4^+$ regulátor és naiv T sejteken

4.2.1 Perifériás limfociták karakterizálása

A feszültségfüggő K^+ csúcsáram mérésekhez, a D10 T_H2 sejtvonálhoz hasonlóan, rövid depolarizáló impulzusokat használtunk. Hosszabb depolarizáló impulzusok során a teljes-sejt áramok inaktiválódtak, amelyet az áramgörbe leszálló ágához illesztett egy-exponenciális függvény alapján meghatározott inaktivációs időállandóval jellemeztünk. Ismert, hogy a feszültségkapuzott csatornák esetében az egyensúlyi aktiváció (G-V görbe) feszültségfüggése jellemző az adott csatornára, így alkalmas annak azonosítására, illetve a különböző élettani körülmények során az ioncsatorna kapuzásában bekövetkező változások észlelésére. Az áram-feszültség függést -70 és $+40$ mV között, 10 mV-os lépésekben növekvő teszt feszültségek mellett regisztrált áramérték alapján határoztuk meg úgy, hogy minden alkalmazott teszt feszültségre kiszámoltuk a normált vezetőképességeket, hogy vezetőképesség-feszültség függvényt (G-V görbét) kapjunk. A mérési pontokat Boltzmann-függvénnyel illesztettük, majd meghatároztuk a félaktivációs feszültséget ($V_{1/2}$) valamint a meredekség értéket (k). Mind a naiv, mind a T_{reg} sejtek esetében az áramok biofizikai tulajdonságai az irodalomban leírt T sejtek membránjában uralkodóan kifejeződő Kv1.3 K^+ -csatornák tulajdonságaival megegyezőek. Méréseink egyik sejt populáció esetében sem utaltak más feszültségkapuzott csatorna jelenlétére. Korábbi adatokkal összhangban sejtenként néhány száz csatorna járult hozzá a mért csúcsáramokhoz.

A Kv1.3 csatornák mellett a T sejtek Ca^{2+} -aktivált IKCa1 csatornákat is kifejeznek aktivációs állapotuktól és altípusuktól függően. Mivel ezek a csatornák csak emelkedett Ca^{2+} -koncentráció mellett aktiválódnak, így a belső

oldat Ca^{2+} -tartalmát $1 \mu\text{M}$ -ra állítottuk be, hogy felbecsüljük a csatornák számát a membránban. Feszültségfüggetlen természetüknek köszönhetően a IKCa1 áramok feszültség-rámpákkal jól mérhetők. A feszültség-rámpák során a membránpotenciál lineárisan nő -120 mV -ról $+50 \text{ mV}$ -ig, és az áram a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbénél változik. Nagyobb meredekség több IKCa1 csatorna jelenlétére utal, azonban a K^+ -ra specifikus áramkomponens teljes körű meghatározása a megfordítási potenciál mérését is igényli.

A legtöbb sejt esetében Charybdotoxint (ChTX) is alkalmaztunk, a Kv1.3 és IKCa1 csatornák elkülönítésére, amely mindkét membránfehérje gátlószere alacsony nanomoláris koncentrációkban. Az extracelluláris térben alkalmazott 50 nM ChTX mindkét típusú csatornát gátolta. A megmaradó áramot, az ún. szivárgási áramot a kontroll áramgörbéből vontuk ki, hogy megkapjuk a IKCa1 komponenst. Az áramamplitúdóra és a IKCa1 egyedi csatorna vezetőképességére alapozva (11 pS) becsültük meg a csatornák számát a membránban. Egyik donortípustól származó T_{reg} és naiv sejtpopuláció között sem találtunk szignifikáns különbséget az IKCa1 csatornák számában (egészséges naiv: $12,4 \pm 2,4$, egészséges T_{reg} : $21,2 \pm 8,2$, SM naiv: $8,7 \pm 2,1$, SM T_{reg} : $22,9 \pm 8,5$ csatorna/sejt).

Az alkalmazott feszültségprotokollokkal egyik sejt típus esetén sem találtunk e két K^+ csatornán kívüli más ioncsatornát.

A megvizsgált Kv1.3 csatornák kapuzásának egyensúlyi és kinetikus paramétereit összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget az egészséges donoroktól és a sclerosis multiplexes betegektől T_{reg} és naiv sejtek alpopulációi között sem.

4.2.2 Az egészséges donoroktól és sclerosis mutiplexes betegektől származó naiv és regulátor T sejteinek ioncsatorna expressziós vizsgálata

Mivel nagymértékű eltérések lehetnek a különböző T sejt alpopulációk Kv1.3 expressziós szintjeiben, elsőként a Kv1.3 áramamplitúdókat, vagyis a

Kv1.3 csatornák számát hasonlítottuk össze. Mivel a SM betegek T_{reg} sejtjeit csökkent működésűnek írták le, statisztikai elemzésünkben az egészséges és sclerosis multiplexben szenvedő donorok naiv és T_{reg} sejtjeinek mérési paramétereit terveztük összehasonlítani. Az egészséges egyénektől származó naiv és regulátor T sejtek felületén kifejeződő Kv1.3 csatornák számában nem találtunk különbséget ($p = 0,125$, MWRST), azonban a sclerosis multiplexes betegektől izolált sejtpopulációkban a Kv1.3 csatornák száma szignifikánsan kisebbnek bizonyult a naiv sejtekhez képest ($p = 0,005$, MWRST).

A T sejtek mérete növekszik aktivációjuk során, amelyet nagyobb felületükből adódó megnövekedett membránkapacitással tudunk detektálni. Méréseinkben összehasonlítottuk a membránkapacitás értékeket. Az egészséges donoroktól származó T_{reg} sejtek membránkapacitása szignifikánsan nagyobb volt naiv párjaikhoz képest ($p = 0,009$), azonban ez a különbség nem volt észlelhető SM betegek T_{reg} és naiv sejtjei között ($p = 0,392$).

A membránkapacitásra normált áram (áramsűrűség) nyújt információt a csatornák hozzájárulásának mértékéről a membránpotenciál szabályozásához, mivel adott számú csatorna nagyobb mértékben befolyásolja a membránpotenciált egy kisebb sejt esetében, egy nagyobb méretű sejthez képest, megegyező számú csatornával. Az egészséges populáció sejtjei között szignifikáns különbséget találtunk a T_{reg} és naiv sejteket összehasonlítva ($p = 0,003$, MWRST), míg ez a különbség nem jelent meg a SM betegekből származó sejtek altípusai között, amely a naiv sejtekhez viszonyított jelentősen alacsonyabb csatornaszám következménye regulátor T sejtek esetében.

5 MEGBESZÉLÉS

Elektrofiziológiai méréseink során, a D10 sejtek K^+ áramait biofizikailag és farmakológiailag karakterizálva megállapítottuk, hogy ennek a T_{H2} sejtvonalnak a domináns feszültségfüggő K^+ csatornája a Kv1.3.

Korábbi közlemények tanulmányozták, hogy számos rágcső T sejtvonalon az ún. „n” és „l” típusú áramokért is felelős K^+ csatornák is jelen vannak. Míg az előbbit a Kv1.3-nak, addig az utóbbit a Kv3.1 ioncsatornának tulajdonítják. Nem zárhattuk ki tehát a Kv3.1 csatornák jelenlétét sem. Mindkét csatorna depolarizálással aktiválható, azonban az alapvető biofizikai paramétereik (egyensúlyi aktiváció és inaktiváció) és farmakológiai sajátágaik különbözőek. A TEA és a MgTX dózis-hatás görbéje, valamint az illesztés során számított K_d értékek (TEA: 13,4 mM és MgTX: 16,8 pM) arra utalnak, hogy a Kv1.3 a D10 sejtvonalon meghatározó mértékben jelen lévő feszültségvezérelt K^+ -ioncsatorna. Nem zárhatjuk ki az „n” és „l” típusú csatornák összeszerelődését sem, de 500 pM MgTx jelenlétében (ami kb. harmincszor nagyobb a Kv1.3-ra vonatkozó félhatásos koncentrációnál) a megmaradó áramhányad (3-5%), és a TEA dózis-hatás görbéje azt mutatja, hogy ezek a heteromerek teljes-sejt áramához való hozzájárulása elhanyagolható. Ez a kísérletünk is alátámasztotta a Kv1.3 csatornák kizárólagos jelenlétét.

Mivel ki szeretnénk zárni a kétpórusú K^+ csatornák jelenlétét is, illetve a teljes-sejt áram kinetikájára gyakorolt hatásukat, méréseket kezdtünk a TASK-1 és TASK-3 csatornák D10 sejtvonalon való expressziójára vonatkozóan. A széles körben elfogadott Kv1.3 csatornaspecifikus gátlószer, a Margatoxin a Kv1.3 csatornák több, mint 85%-át gátolja 100 pM-os koncentrációban, míg ugyanez a koncentráció nem eredményezett változást a HEK-tsA sejtekben kifejezett TASK-1 és TASK-3 csatornák esetében. Meuth és munkatársai anandamid és ruténium vörös gátlószereket alkalmaztak a Kv1.3 és TASK áramok elválasztására limfocitákban. Az anandamid alkalmazása során a teljes-sejt áram kinetikájában változást tapasztaltak, ami ahhoz vezethet, hogy a TASK csatornák

szelektív blokkolásával a D10 sejtvonal teljes-sejt áram kinetikája is változik. A szakirodalomban eddig nem tanulmányozták ezen molekulák Kv1.3 csatornákra gyakorolt hatását, sőt, a ruténium vörös hatását egyáltalán nem vizsgálták feszültségkapuzott K^+ csatornákra. Ezért megvizsgáltuk TASK csatornák specifikus gátlószereinek HEK-tsA sejtekbe transzfektált Kv1.3 csatornára kifejtett gátlóhatását. A 3 μ M koncentrációban alkalmazott anandamid valamint a 10 μ M ruténium vörös a Kv1.3 csatornák áramamplitúdóit is szignifikánsan csökkentette (a Kv1.3 esetében megbecsült K_d értékek jó egyezést mutatnak a kétpórusú csatornákra leírtakkal), tehát ezek a gátlószerek valójában nem specifikusak, és így a Kv1.3 és a TASK csatornák árama általuk nem különíthető el egyértelműen limfocitákban.

Továbbá, mivel a TASK csatornák idő és feszültségfüggetlenek, ezért feszültség-rámpa protokoll segítségével megmértük a teljes-sejt áramokat D10 sejtekben. A feszültségfüggő Kv1.3 csatornák eliminálására 100 pM Margatoxint alkalmaztunk, valamint a tartófeszültséget 0 mV-ra állítottuk, mivel a Kv1.3 csatornák ezen feszültségnél inaktiválódnak. A megfordítási potenciált -4 mV-nak határoztuk meg, amely sokkal pozitívabb, mint ami a TASK csatornák jelenlétében várható lett volna (elméleti érték az oldatok összetételének ismeretében -85 mV). Ezek alapján megállapítottuk, hogy a TASK csatornák a D10 sejtek membránjában nem játszanak szerepet a teljes-sejt K^+ áram kinetikai paramétereinek módosításában, mivel azokat a D10 sejtek nem, vagy csak nagyon kis mértékben fejezik ki felszínükön.

További tanulmányaink során azt feltételeztük, hogy a D10, T_H2 sejtvonalon dominánsan expresszálandó Kv1.3 csatornák immunszinapszis kialakulása során bekövetkező átrendeződése hatással lehet a csatornák aktivációs és inaktivációs kapuzására. Mind az egyensúlyi, mind az aktiváció és inaktiváció kinetikus paramétereit megvizsgáltuk, majd az adatokat összehasonlítottuk a T sejtek nyugalmi állapotában mért paramétereivel. A következő eredményeket kaptuk: immunológiai szinapszisban való részvétel

során (1) a Kv1.3 csatornák inaktivációs időállandója lecsökken, (2) az aktivációs kinetika lassul, valamint (3) a félaktivációs feszültség szignifikánsan változik (bár a meredekség nem szignifikánsan). A kinetikában bekövetkező változások miatt azt feltételeztük, hogy ennek a jelenségnek a háttérében foszforiláció vagy defoszforiláció áll. Ezt modellezve, protein kináz gátlószerekkel annak a lehetőségét is megvizsgáltuk, hogy a gyorsabb inaktiváció a csatornafehérje foszforilációjának tulajdonítható-e.

Ezen felül, számos korábbi tanulmány vizsgálta a T sejt és az antigénprezentáló sejt között létrejövő immunológiai szinapszisban felhalmozódó citoszolikus és membránfehérjéket, beleértve a Kv1.3 ioncsatornát is. Alátámasztották azt a feltételezést, hogy a D10 és a CH12-LX sejtek között létrejövő immunszinapszis során a sejtek közötti kontaktrégióba való Kv1.3-szegregálódás funkcionális következményekkel járhat, ami valószínűleg a tirozin, szerin vagy treonin aminosav oldalláncok protein kinázok vagy foszfatázok általi módosításainak tulajdoníthatók. Humán perifériás T sejteken végzett PKC és PKA aktivációs kísérletek növekedést mutattak a Kv1.3 teljes-sejt konduktanciában. Továbbá, a PKC működésének pozitív szabályozása a T sejteken jelen lévő Kv1.3 csatornák inaktivációs sebességének csökkenését, míg a PKA aktiváció Kv1.5 csatornák lassúbb inaktivációját eredményezi a Kv β 1.3 járulékos alegységet is expresszáló HEK-tsA sejtvonalon. Míg a PKC aktivációja az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggését is módosítja, addig a PKA csak az egyensúlyi inaktivációt befolyásolja, oly módon, hogy az ún. ablak-áram – amely az ioncsatornák nyugalmi potenciálja körüli nyitási valószínűségét adja meg – szignifikánsan nő. Ugyanakkor olyan tanulmányok is megjelentek, amelyek Jurkat T vagy HEK-tsA sejtekben heterogéneen jelen lévő Kv1.3 csatornák teljes vagy részleges gátlását tárgyalják PKA vagy PKC stimuláció által. Receptor és nem-receptor tirozin kinázok aktiválása a Kv1.3 áramot csökkenti, bár a Fas-receptor aktiválása a Kv1.3 aktivációját növeli. Ezek az ellentmondások a PK izoformák különböző

expressziós mintázatainak jelenlétének vagy specifikus kapcsoló fehérjék hiányának tulajdoníthatók különböző sejtvonalakban. Mindezek alapján, és a PKA, p56^{lck} antagonistákkal végzett kísérleteknek megfelelően feltételezzük, hogy a Kv1.3 ioncsatorna immunológiai szinapszisba való rendeződésekor defoszforilálódik. Ezt a lehetőséget az immunológiai szinapszisban résztvevő D10 sejtek gyorsabb inaktivációs kinetikája és kisebb áramsűrűsége támasztja alá. Azt gondoljuk, hogy a Kv1.3 szinapszisba vándorlása a defoszforiláció előfeltétele. A szinapszisban bekövetkező csatornamódosítás molekuláris mechanizmusa jelenleg nem tisztázott, bár nagy valószínűséggel bizonyos protein foszfatázok magyarázhatják a Kv1.3 áramban bekövetkező változásokat.

A lassúbb aktivációs kinetika és az egyensúlyi aktiváció depolarizáló feszültségek felé való eltolódása a Kv1.3 csatorna mikrokörnyezetében bekövetkező változásokat valószínűsíti, miközben az a szinapszisba szegregál. Ezt a feltevést erősítik a PK antagonistákkal végzett kísérleteink: a PK inhibitorok csak az inaktivációs kinetikát módosítják, az aktiváció sem egyensúlyi, sem kinetikai paramétereinek változásában nem játszanak szerepet. Laboratóriumunk egyik korábbi közleményében Kv1.3 csatornák egy hasonló jelenséget figyelhetünk meg T sejtekben: a membránviszkozitás növelésével, amelyet a membrán koleszterinszintjének növelésével értek el, az aktivációs sebesség csökkent és az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése eltolódott.

Elmondhatjuk, hogy a Kv1.3 csatorna immunszinapszisba való vándorlása a csatorna kapuzási paramétereinek megváltozásával jár. A PK inhibitorok használata nem magyarázza egyértelműen a foszforiláció szerepét a csatorna módosításában. Feltételezzük, hogy a jelenséghez a csatornák nagyobb merevségű, rigidebb membrándoménokba való diffúziója is hozzájárulhat.

A T sejtek nagy populációjának kis csoportját képező regulátor T sejtek tanulmányozása során csatornamintázatbeli különbségeket kerestünk, amely lehetőséget nyújthat a T sejtek e fontos alcsoportjának szelektív manipulálására.

Az általunk vizsgált négy sejtcsoport membránfelületén kifejeződő Kv1.3 és IKCa1 csatornák száma összevethető a korábbi közleményekben leírt nyugvó T sejtek adataival, azonban statisztikai elemzéseink azt mutatták, hogy az SM betegetől származó T_{reg} sejtek kevesebb Kv1.3 csatornát fejeznek ki, összehasonlítva a naiv sejtekkel, és ez a különbség nem mutatható ki egészséges T_{reg} és naiv sejtek között. T sejtek populációinak mitogén stimulálása egy általános növekedéshez vezet a sejtméretben, ami egyidejűleg egy megnövekedett Kv1.3 és IKCa1 expresszióval is jár. Az általunk vizsgált sejtek nem voltak stimulálva, de az eredmények azt mutatták, hogy az egészséges T_{reg} sejtek membránfelülete sokkal nagyobb a naiv sejtek felületéhez képest, amellett, hogy a csatornák számában nem tapasztaltunk különbséget, ami a naiv sejtek esetében szignifikánsan nagyobb Kv1.3 csatornasűrűséget eredményezett (pA/pF). Ez összhangban áll azzal az elképzeléssel, hogy T_{reg} sejtek csak részben vagy nem megfelelően aktiválódnak, és antigén stimuláció hatására anergikusak. A megnövekedett membránfelület egyfajta indikátor lehet bizonyos aktivációs útvonalak beindulására, de a megszokott K^+ -csatornaszám növekedésének hiánya hozzájárulhat a T sejt proliferációhoz vezető aktivációs folyamat leállításához.

Egészséges naiv és regulátor T sejteket összehasonlítva a Kv1.3 és a IKCa1 csatornák számában nem találtunk különbséget. A K^+ -csatornák kritikus szereppel bírnak a T sejt aktivációban, ami a Ca^{2+} ionok beáramlása során a membránpotenciál stabilizálása. Ha a sejt méretének növekedését nem kíséri a K^+ csatornák számának növekedése, az elégtelen membránpotenciál szabályozást eredményez, ami nem megfelelő Ca^{2+} jelátvitelhez, és csökkent proliferációs hajlamhoz vezet.

Egészséges donoroktól származó sejtekkel ellentétben SM betegekben izolált T_{reg} sejtek kevesebb Kv1.3 csatornát fejeznek ki, mint a naiv sejtek, továbbá membránfelületük sem nagyobb. A kisebb csatornaszám és sejtméret alapján arra következtetünk, hogy a jelátviteli útvonal során a fehérjeszintézist a

betegség olyan módon érinti kedvezőtlenül, hogy akadályozza a T_{reg} sejtek differenciálódását. Ez a megfigyelés összhangban állhat az SM betegek T_{reg} sejteinek csökkent szuppressziós képességével, de ez a kapcsolat további vizsgálatokat igényel.

Szignifikáns különbséget találtunk csatornaszámban, sejtméretben, és csatornasűrűségben, ami a sejtek aktivációs állapotával vagy azzal a képességükkel áll összefüggésben, hogy mitogén stimulusok aktiválják őket. A T_{reg} populáció aktivációja során az ioncsatorna-expresszióban és sejtméretben bekövetkező változások további vizsgálatai érdekesek lehetnek az aktivált állapot természetének átfogóbb megismerése szempontjából, valamint nagy jelentőségű lehet annak a lehetőségnek a tanulmányozása is, hogy ezen T sejt alpopuláció hogyan válhat terápiás célponttá, azaz hogyan manipulálható szelektíven farmakológiailag, különböző inhibitorok segítségével a sejtmembránjukon jelen lévő ioncsatornáikon keresztül.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Patch-clamp technikával, feszültség-zár üzemmódban elvégeztük a D10 sejtek biofizikai és farmakológiai karakterizálását, melynek során a kétpórusú TASK K^+ csatornák jelenlétét kizárva kimutattuk, hogy ezen egér T_H2 sejtvonal domináns feszültségfüggő K^+ csatornája a Kv1.3.

A CH12-LX antigénprezentáló sejteket felhasználva beállítottunk egy modellrendszert az immunológiai szinapszis tanulmányozására. Az endogén Kv1.3 csatornákat extracelluláris epitóp ellen termeltetett antitesttel, indirekt módszerrel jelöltük meg, majd meghatároztuk a Kv1.3 csatornák sejtfelszíni eloszlását az immunológiai szinapszis kialakulását követően. Konfokális mikroszkópos felvételeink kimutatták, hogy a T sejtek Kv1.3 ioncsatornái a két sejt közötti kontaktrégióba rendeződnek.

Összehasonlítottuk az egyedülálló és a szinapszisban lévő T sejtek Kv1.3 áramait, megállapítottuk hogy az aktivációs kinetika lelassult, ezzel szemben az áram inaktivációja felgyorsult a szinapszisban lévő sejtekben az egyedülálló sejtekhez képest, de a Kv1.3 csatornák egyensúlyi aktivációjának membránpotenciál-függését jellemző normált konduktancia–tesztpotenciál összefüggés nem változott szignifikáns mértékben.

A D10 sejteket PKA, PKC és $p56^{lck}$ gátlószerekkel kezeltük. Az aktivációs kinetikát jellemző időállandó és a normált konduktancia feszültségfüggését jellemző paraméterek nem különböztek jelentősen a kezelt és a kezeletlen sejtek között, azonban az inaktivációs időállandókban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kezelések hatására, azaz az áram inaktivációja felgyorsult, amely feltételezéseink szerint a csatorna szinapszisbeli defoszforilációjával hozható összefüggésbe.

Továbbá szintén teljes-sejt konfigurációban megvizsgáltuk az egészséges és sclerosis multiplexes donoroktól származó naiv és regulátor T sejtek ioncsatorna expressziós mintázatát. Megmértük az egyes sejteken található Kv1.3 és IKCa1

csatornák számát, valamint megvizsgáltuk a kapuzására vonatkozó paramétereket is, majd statisztikai összehasonlítást végeztünk a különböző populációk között. Megállapítottuk, hogy az egészséges donorok naiv és T_{reg} sejtjei azonos számú Kv1.3 csatornát fejeznek ki, ugyanakkor a T_{reg} sejtek membránkapacitása nagyobbak bizonyult, mint a naiv sejteké, és így csatornadenzitásuk alacsonyabbnak adódott. Ezzel szemben, a sclerosis multiplexes betegek T_{reg} sejtjei kevesebb Kv1.3 csatornával rendelkeztek, mint a naiv sejtek, és membránfelszínük sem volt nagyobb a naiv sejtekénél.

Tárgyszavak:

Immunológiai szinapszis, Kv1.3 csatorna, TASK csatorna, foszforiláció, protein kináz, regulátor T sejt, autoimmunitás, sejtkapacitás, csatornasűrűség

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 sz. projekt nyújtott támogatást. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.



SZÉCHENYI TERV

Iktatószám: DEENKÉTK/286/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Tóth Ágnes

Neptun kód: C86PNG

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Hajdú, P., Szilágyi, O., **Tóth, Á.**, Krasznai, Z., Pocsai, K., Panyi, G.: Answer to the "comment on functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse" by Stefan Bittner et al. [Immunol. Lett. 125 (Aug 15 (2)) (2009) 156-157].
Immunol. Lett. 129 (1), 47-49, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.12.026>
IF:2.511
2. **Tóth, Á.**, Szilágyi, O., Krasznai, Z., Panyi, G., Hajdú, P.: Functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse.
Immunol. Lett. 125 (1), 15-21, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.05.004>
IF:2.906
3. Varga, Z., Csépany, T., Papp, F., Fábrián, Á., Gogolák, P., **Tóth, Á.**, Panyi, G.: Potassium channel expression in human CD4(+) regulatory and naive T cells from healthy subjects and multiple sclerosis patients.
Immunol. Lett. 124 (2), 95-101, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.04.008>
IF:2.906



További Közlemények

4. Krasznai, Z.T., **Tóth, Á.**, Mikecz, P., Fodor, Z., Szabó, G., Galuska, L., Hernádi, Z., Goda, K.: Pgp inhibition by UIC2 antibody can be followed in vitro by using tumor-diagnostic radiotracers, ^{99m}Tc-MIBI and ¹⁸FDG.

Eur. J. Pharm. Sci. 41 (5), 665-669, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.009>

IF:3.291

5. Mikecz, P., Márián, T., Miklovicz, T., Galuska, L., Krasznai, Z., **Tóth, Á.**, Goda, K., Trón, L., Hernádi, Z., Krasznai, Z.T.: Daunorubicin and doxorubicin inhibit the [(11)C]choline accumulation in cancer cells.

Appl. Radiat. Isot. 67 (10), 1806-1811, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.07.007>

IF:1.094

Összesített impakt faktor: 12.708

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 8.323

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.09.28

