

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Feszültség-kapuzott kationcsatornák és immunitás:
funkció és a membránbeli lokalizáció fontossága**

Szilágyi Orsolya

Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2013

Feszültség-kapuzott kationcsatornák és immunitás: funkció és a membránbeli lokalizáció fontossága

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

Írta: Szilágyi Orsolya okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány 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. Buzás Edit, az MTA doktora
Dr. Tóth Attila, PhD

A doktori szigorlat időpontja és helye: 2014. január 27. 11:00 óra,
DE ÁOK Élettani Intézet könyvtára

Az értekezés bírálói:

Dr. Antonio Felipe, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Antonio Felipe, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD
Prof. Dr. Buzás Edit, az MTA doktora
Dr. Tóth Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja és helye:
2014. január 27. 13:00 óra, DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A épület”
tanterme

1. BEVEZETÉS

A különböző immunsejtek összehangolt működése a megfelelő immunválasz kialakulásának elengedhetetlen feltétele. E sejtek reaktivitása nagyban függ az őket aktiváló jelátviteli útvonalaktól, amelyek szabályozását részben ioncsatornák látják el. Az ioncsatornák jelentőségét eredetileg ingerelhető sejtekben írták le, ahol az akciós potenciál kialakításában van szerepük. Azonban ma már közismert, hogy az ioncsatornák minden sejt típusban megtalálhatóak és különböző sejtleleti funkciókat befolyásolnak. Ez elsősorban a membránpotenciált szabályozó szerepüknek tulajdonítható, de nem elhanyagolható a különböző adapter fehérjékkel való kölcsönhatásuk sem.

A dendritikus sejtek (DC) a hivatásos antigén prezentáló sejtek (APC) egyik fő típusát alkotják. Antigén stimuláció hatására az éretlen dendritikus sejtek (IDC) érett dendritikus sejtekké (MDC) differenciálódnak, amelyek a feldolgozott antigént a kettes típusú fő hisztokompatibilitási komplexen (MHCII) keresztül T sejteknek mutatják be. Ennek megfelelően elengedhetetlen e differenciációs folyamat szigorú szabályozása, hiszen mind az érés hiánya, mind a szükségtelen bekövetkezése súlyos immunológiai betegségek kialakulásához vezethet. A humán monocita eredetű dendritikus sejtek fő feszültség-kapuzott ioncsatornájaként az Nav1.7 csatornát írták le. Sikerült kimutatnunk, hogy ez a csatorna elsősorban az éretlen dendritikus sejtek azon alpopulációjában fejeződik ki, amely az immunválaszt immunogénebb irányba hajtja. Úgy gondoljuk, hogy az Nav1.7 membránpotenciál szabályozása által megakadályozza az éretlen dendritikus sejtek szükségtelen aktivációját egy adott ingerküszöb elérése alatt.

Az antigén bemutatás folyamatához nélkülözhetetlen a fizikai kontaktus kialakulása az antigén prezentáló és T sejtek között, vagyis az immunológiai szinapszis (IS) létrejötte. Ez a szupramolekuláris komplex mindkét sejt membránjában nagyfokú fehérjeátrendeződést eredményez. Kimutatták, hogy a T sejtek feszültség-kapuzott kálium csatornája, a Kv1.3, is ebbe a szinaptikus területbe transzlokálódik. Azonban az átrendeződés okát mindeztáig nem sikerült kimutatni, mindössze a helyi membránpotenciál szabályozása feltételezett. Eredményeink alapján elmondható, hogy a Kv1.3 csatorna szinapszisbeli átrendeződését a membrán-asszociált guanilát kináz (MAGUK) családba tartozó fehérje, a PSD-95 szabályozza. A PSD-95-öt eredetileg neuronokban írták le, de humán T sejtekben is megtalálható, ahol egyrészt szabályozza a Kv1.3 lokalizációját, másrészt lehetővé teszi a csatorna egyéb fehérjékkel történő kölcsönhatását. Meggyőződésünk, hogy ez a felismerés

segíthet azon kérdés megválaszolásában, hogy mi is a pontos szerepe a Kv1.3 csatornának az immunszinapszisban, illetve általában véve az immunreakciók szabályozásában.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Dendritikus sejtek, T limfociták

A szervezet első számú védelmi vonalát patogénekkal szemben a veleszületett immunitás képezi, amely azonban nem specifikus és csak rövid távú immunitást biztosít. Fontos azonban, hogy a természetes immunitás nélkülözhetetlen az adaptív immunitás kialakításához, amelyben már specifikus sejtek lépnek fel a patogénekkal szemben, illetve amely során immunológiai memória alakul ki. A dendritikus sejteknek kiemelkedő szerepe van ezen két útvonal összekapcsolásában, hiszen képesek különböző antigének felvételére és feldolgozására, migrációra különböző limfoid szervekbe és gyors érésre, aktivációra képesek különböző stimulusok hatására. A CD1a egy egyes típusú membrán fehérje amelyet különböző saját- vagy patogén eredetű feldolgozott lipid stabilizál. A monociták *in vitro* differenciáltatásához CD1a⁻ és CD1a⁺ dendritikus sejtekké granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktorra (GM-CSF), valamint IL-4-re van szükség. A dendritikus sejtek ezen alpopulációja éretlen szöveti dendritikus sejt jellemzőkkel bír, azonban megfelelő stimulus hatására tovább aktiválható. Kimutatták, hogy a CD1a⁻, illetve CD1a⁺ dendritikus sejtek különböző funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek: előbbi tolerogén, míg utóbbi immunogén irányba hajtja a T sejteket. Aktiváció hatására az éretlen dendritikus sejtek drasztikus fenotípusos változásokon mennek keresztül, amely hatására érett dendritikus sejt válik belőlük, majd ezt követően a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol hivatásos antigén prezentáló sejtekként gyulladásos vagy tolerogén irányba hajtják az antigén-specifikus T sejteket.

Az adaptív immunitás legfontosabb feladatai közé tartozik többek között az, hogy különbséget tudjon tenni a saját és idegen antigének között, effektív immunválaszt tudjon kiváltani a patogének ellen és immunológiai memóriát hozzon létre. Mindezekben a különböző T sejt alpopulációk nagyon fontos szerepet játszanak. A thymusban történő szelekciót követően két fő T sejtípust lehet megkülönböztetni a felszínükön kifejezett T sejt receptortól (TCR) függően, amelyek a sejtek körülbelül 90%-án $\alpha\beta$, míg a maradék 10%-án $\gamma\delta$ láncokból épülnek fel. Az $\alpha\beta$ receptort kifejező sejteket származási markereik vagy funkcionális tulajdonságaik alapján lehet tovább csoportosítani. A két legismertebb marker a CD4 illetve a CD8, amelyek két különböző és eltérő funkciókkal bíró T sejt alpopulációra jellemzőek. MHCII molekulákon keresztüli antigénfelismerés hatására a CD4⁺ effektor T helper sejtek számos citokin termelésére képesek. Ezzel szemben a citotoxikus T sejtek CD8

molekulákat fejeznek ki és MHCI molekulákon keresztül ismerik fel a különböző peptid antigéneket. Mindazonáltal a T sejtek funkcionális állapotától függően naív, effektor és memória T limfocitákat különböztethetünk meg egymástól. A dendritikus és a T sejtek sorsa (aktivációja, érése) is nagyban a felszínükön kifejeződő ioncsatornáktól függ. A továbbiakban ezért az ioncsatornák általános jellemzőit írjuk le, külön fókuszálva a szerepükre dendritikus valamint T sejtekben.

2.1.1 Ioncsatornák

Az ioncsatornák transzmembrán, pórusformáló fehérjék, amelyek minden sejt típusban megtalálhatóak. Két jellemzőjük különbözteti meg őket az egyéb szállító molekuláktól: egyrészt a póruson keresztül történő ionáramlás nagyon gyors, másrészt ez a transzport mindig az elektrokémiai gradiens irányában történik. Csoportosításuk a szelektivitásuk (nagyon-, közepesen-, vagy nem szelektívek), illetve kapuzásuk (például feszültség-, ligand kapuzott, mechanoszenzitív) alapján lehetséges. Mivel ez a munka egy feszültség-kapuzott nátrium, illetve egy feszültség-kapuzott kálium csatornával foglalkozik, a továbbiakban ezek jellemzése olvasható.

A feszültség-kapuzott nátrium csatornák (VGSC) egyetlen, körülbelül 260 kDa-os polipeptid láncból állnak (α -alegység), amelyhez több járulékos β -alegység kapcsolódhat. Az utóbbiak a csatornák expressziójához nem szükségesek, azonban módosíthatják azok kinetikáját, feszültség-függését. Az α -alegység négy homológ doménből áll, amelyek mind hat-hat alfa helikális transzmembrán szegmenst (S1-S6) foglalnak magukba. A pozitív aminosavakat tartalmazó feszültség-szenzor az S4-es hélixben található, míg a csatorna pórusát a négy domén S5-S6 szegmense, valamint az őket összekötő hurkok alkotják.

A feszültség-kapuzott kálium csatornák (VGPC) a nátrium csatornákéhoz hasonló szerkezettel bírnak, azonban a négy homológ domént különálló polipeptidláncok alkotják, amelyeket nem-kovalens kötések tartanak össze. Ez esetben is a pozitív töltésű aminosavakat tartalmazó S4-es szegmens alkotja a feszültség-szenzort. A pórust az S5 és S6-os szegmensek közötti extracelluláris hurkok alkotják, amelyben megtalálható a négy aminosavból álló tipikus motívum (GYGD), amely a K^+ szelektivitásért felelős.

2.1.1.1 Dendritikus sejtek ioncsatornáit, az Nav1.7 csatorna

A fent említett ioncsatornákat először ingerelhető sejtekben írták le, ahol az akciós potenciál létrehozásában van szerepük. Azóta számos kutatás kimutatta az ioncsatornák jelenlétét és szerepét egyéb, nem ingerelhető sejtekben is, mint például immunsejtekben. A

dendritikus sejtek számos jelátviteli útvonala az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációtól függ, amelyet különböző ioncsatornák szabályoznak: RyR1 receptorok, P2Y receptorok, L-típusú kalcium csatornák és a kalcium felszabadulás aktivált kalcium csatorna (CRAC). Az eredményes Ca^{2+} válasz fenntartásához szükséges negatív membránpotenciált a feszültség-kapuzott kálium csatornák biztosítják. Az immunsejtek differenciációja során megfigyelhető kálium csatorna expresszió megváltozása arra utal, hogy milyen fontos szerepe van e csatornáknak a különböző sejtfunciókban.

Az Nav1.7 egy feszültség-kapuzott nátrium ioncsatorna, amelyet először neuronokban írtak le, de azóta dendritikus sejtekben is kimutatták. Biofizikai tulajdonságait nagy alapossággal jellemezték. Az egyensúlyi aktivációt (amely megadja a csatornák nyitott illetve zárt állapotban lévő hányadát egy adott membránpotenciál mellett) jellemző félaktivációs feszültség körülbelül -20 mV, vagyis ekkora feszültség mellett a nagyjából a csatornák fele található nyitott állapotban. Az Nav1.7 a nátrium csatornákra tipikusan jellemző gyors, 1-2 ms-os inaktivációs időállandóval jellemezhető, amely a gyors inaktivációs kapunak köszönhető. Farmakológiai kutatások szerint, az Nav1.7 áramok tetrodotoxinra (TTX, $K_d \approx 25$ nM) érzékenyek.

Az Nav1.7 csatornát kimutatták monocita-eredetű éretlen dendritikus sejteken, amelyek in vitro differenciációja során azonban a csatorna expresszió megváltozik és az Nav1.7 csatornák helyét egy feszültség-kapuzott ioncsatorna, a Kv1.3 veszi át. Azonban az Nav1.7 csatorna pontos szerepe immunsejtekben nem tisztázott.

2.1.1.2 T limfociták és ioncsatornáik, a Kv1.3 csatorna

A T sejtek ioncsatornáik a Ca^{2+} jelátvitelt szabályozzák, így jelentősen befolyásolják a sejtek aktivációját, differenciációját. A Ca^{2+} áramok létrehozásáért elsősorban a CRAC csatornák felelősek, míg a negatív membránpotenciál fenntartását két káliumcsatorna biztosítja. Az egyik az intracelluláris Ca^{2+} -aktivált IKCa1 K^+ ioncsatorna, amely érzékeny a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra, nyitására a plazmamembrán repolarizálódik. Ezen kívül egy feszültség-függő K^+ áramot is leírtak ezekben a sejtekben, amelyért a Kv1.3 csatorna felelős.

A Kv1.3 csatorna a K^+ ioncsatornák *Shaker* családjába tartozik. A Shaker típusú csatornák depolarizáló impulzus hatására gyorsan nyitnak, amelyet inaktiváció követ. Aktiváció során az S4-es transzmembrán szegmens az itt található pozitív töltésű aminosavak miatt az extracelluláris tér irányába mozdul, ez által megváltozik a csatorna konformációja. A Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbpotenciálja -40 -50 mV között van. Az egyensúlyi

aktiváció feszültség-függése a Boltzmann egyenlettel jellemezhető, amely +20 - +30 mV között éri el a maximumát, vagyis a csatornák nyitási valószínűsége ennél a feszültségnél körülbelül 1. A Kv1.3 csatorna lassú inaktivációval jellemezhető, amely során záródik a pórusnál található kapu (P-típusú inaktiváció), majd olyan konformációs változások következnek be a csatorna ezen szakaszán, amelyek stabilizálják a csatorna nem-vezető állapotát (C-típusú inaktiváció).

2.2 *In vivo* T sejt aktiváció, az immunológiai szinapszis

Az adaptív immunválasz kialakításához nélkülözhetetlenek a helper T sejtek. A T sejt aktiváció beindításának egyik kulcslépése a hivatásos antigén prezentáló sejtek MHCII molekulái és a T sejtek TCR/CD3 komplexe között létrejövő kölcsönhatás. Ennek hatására aktiválódik egy jelátviteli kaszkád, amely során CRAC csatornákon keresztül Ca^{2+} ionok jutnak be a sejtbe. Ennek következményeképpen kinyitnak a plazmamembránban található IKCa1 és Kv1.3 csatornák, amelyek biztosítják a további kalcium beáramláshoz szükséges hajtóerőt. A fenntartott, oszcilláló emelkedett Ca^{2+} koncentráció a kalmodulinon keresztül aktiválja a foszfatáz kalcineurint. Utóbbi defoszforilálja a citoplazmában található NF-AT transzkripciós faktort, amely így képes bejutni a sejtmagba, ahol az IL-2 gént aktiválja. Ez a jelátviteli kaszkád egyéb útvonalakkal együttműködve indítja be a T sejtek osztódását.

A T sejt aktiváció első lépése tehát az MHCII molekulák interakciója a TCR/CD3 komplexszel, kialakítva az immunológiai szinapszist (IS), amely során megvalósulhat az antigén bemutatás. Az IS kialakulása során mind az antigén prezentáló sejt, mind a T sejt membránjában található fehérjék nagymértékben átrendeződnek és létrehozzák a két sejt határán az úgynevezett szupramolekuláris aktivációs klasztert (SMAC). Ez egy centrális (c-SMAC), illetve egy perifériás (p-SMAC) koncentrikus gyűrűből áll, melyekben különböző fehérjék feldúsulása figyelhető meg. Később egy harmadik, disztális klasztert (d-SMAC) is leírtak.

Megfigyelték, hogy citotoxikus T sejtekben a Kv1.3 csatornák is a T sejt és a target sejt közötti régióban, név szerint a citotoxikus immunszinapszisban halmozódnak fel. Ugyanez a polarizált Kv1.3, illetve IKCa1 eloszlás jellemző a T sejtek és antigénprezentáló sejtek között létrejövő szinapszisokra. A Kv1.3 csatornák gátlása nincs hatással felhalmozódásukra, azonban az IS hosszú távú stabilitására hatással lehet. Mindazonáltal az átrendeződés pontos folyamata és funkciója ismeretlen.

2.3 Ioncsatornák és autoimmun betegségek

Az immunszinapszis kialakítása során a Kv1.3 csatornák pontos elhelyezkedése hatással lehet a T sejtek autoreaktivitására. Az IS kialakulását a csatorna mozgásának megakadályozása nem befolyásolja, azonban egy nagyobb amplitúdójú kalcium választ eredményez, amely megváltoztathatja a T sejt aktivációért, proliferációért felelős transzkripciós faktorok szabályozását. Ezen felül szisztémás lupusz eritematózus (SLE) T sejtek túlzott választ mutatnak antigén stimuláció hatására, amely a hosszabban fenntartott megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció következménye lehet. Érdekes módon a nyugvó T sejtek hosszabban tartó Kv1.3 berendeződést mutatnak az IS-ben, míg az előre aktivált T sejteknél más időtendencia figyelhető meg: a csatornák berendeződése a szinapszisba már az első percben maximális, majd folyamatosan csökken körülbelül a harmincadik percig. Ez utóbbi jellemző nyugvó SLE T sejtekre is, amely arra utalhat, a Kv1.3 csatornák idő előtti elvándorlása a szinapszishoz felelős lehet a nem megfelelő Ca^{2+} szabályozásért. Ezt alátámasztva kimutatták azt, hogy a Kv1.3 csatornák jelenléte megakadályozza a túlzott Ca^{2+} jel kialakulását, és hogy az SLE T sejtekben megfigyelhető fenntartott Ca^{2+} jel nagyban korrelál a Kv1.3 csatornák rövidtávú IS-beli lokalizációjával.

2.4 MAGUK fehérjék

A membrán-asszociált guanilát kináz (MAGUK) fehérjék az adapter fehérjék széles körben elterjedt családját alkotják, amelyek nélkülözhetetlenek a neuronális szinapszisok kialakításához. A PSD-95 (post-synaptic density protein 95) és a SAP97 (synapse-associated protein 97) fehérjéket, amelyek a DLG1-4-es alcsaládba tartoznak, alaposan tanulmányozták már idegsejtekben. A PSD-95 elsősorban a poszt-szinaptikus denzitásban fejeződik ki, míg a SAP97 a preszinaptikus axonális régiókban található meg. Mindkét fehérjének két izoformája létezik: az α -izoformák egy rövidebb N-terminális régióval rendelkeznek, amelyek cisztein oldalláncokon reverzibilisen palmitoilálhatóak, és ezáltal lehetővé válik az asszociációjuk lipid kettősrétegekkel. Ezzel szemben a β -izoformák egy N-terminálisan elhelyezkedő L27 doménnel rendelkeznek, amely elősegíti homo- illetve hetero-oligomerizációjukat számos fehérjével. A PSD-95 elsősorban az α -, míg a SAP97 a β -izoformában található meg neuronokban. Mindkét fehérje tartalmaz három N-terminálisan elhelyezkedő egyes típusú PDZ (PSD-95/DLG/ZO1) domént, egy SH3 (src homology 3) domént, valamint egy guanilát kináz-szerű (enzimatikailag inaktív) domént a C-terminális régiójukban.

2.4.1 A feszültség-kapuzott kálium csatornák és a DLG fehérjék

Kimutatták, hogy a DLG fehérjék, így a PSD-95 és a SAP97 is, számos ioncsatornával, például feszültség-kapuzott K^+ csatornákkal lépnek kölcsönhatásba idegsejtekben. A Kv1.4 *Shaker*-típusú ioncsatorna mindkét fentebb említett fehérjével kölcsönhat azok első két PDZ doménjén keresztül, és hatásukra megváltozik a sejten belüli lokalizációja. Később azt is leírták, hogy COS1 sejtekben expresszáva a PSD-95 elsősorban a sejt perifériáján található, míg a SAP97 perinukleáris régiókban fordul elő. Ez a különbség az eltérő izoforma expresszió következménye lehet: a PSD-95, amely nagyrészt α -izoformában van jelen a sejtben, cisztein oldalláncokon palmitoilálható, ezáltal membránokkal képes asszociálódni. Ezzel szemben a SAP97, amelyre a β -izoforma jellemző, nem rendelkezik ezen oldalláncokkal, amely magyarázhatja a perinukleáris megjelenését. Mivel a PSD-95 eredendően is a plazmamembránhoz közel helyezkedik el, feltételezhető, hogy ide horgonyozza a különböző Kv csatornákat, nem pedig az intracelluláris transzportjukat befolyásolja. Ugyanez mondható el a SAP97-ről is azzal a különbséggel, hogy ez az adapter fehérje a csatornák endoplazmatikus retikulumban való megrekedéséért felelős.

A Kv1.3 ioncsatorna is kölcsönhat mind a PSD-95-tel, mind pedig a SAP97-tel, amely fehérjék jelenlétét egér T sejtekben is kimutatták. Azonban azt, hogy a kölcsönhatás a csatorna C-terminális régiójában található PDZ-kötő doménen keresztül valósul-e meg, még nem tárták fel. Mivel a Kv1.3 csatorna N- és C-terminális régiójában is található SH3 domén, nem szabad kizárni a lehetőségét annak, hogy az adapter fehérjékkel történő kölcsönhatása ezeken keresztül jön létre. Mindent összevetve izgalmas kérdésnek bizonyul az, hogy vajon ezeket az adapter fehérjéket humán T sejtek is kifejezik-e, és ha igen, befolyásolhatják-e ioncsatornák (pl. Kv1.3) lokalizációját az immunszinapszisban, a neuronális szinapszisokhoz hasonló módon.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Mint említettük, az feszültség-kapuzott ioncsatornáknak fontos szerepük van a különböző immunsejtek szabályozásában, így összességében az immunválasz kialakításában. Az Nav1.7 csatornákról kimutatták, hogy számos idegi funkciót szabályoznak, azonban jelenlétüket azóta immun-, konkrétan dendritikus sejteken is leírták. Azonban azt, hogy

milyen dendritikus sejt funkciókat befolyásolnak még nem vizsgálták. Ennek megfelelően munkánk első részében az alábbi célkitűzéseink voltak:

Az Nav1.7 csatornák éretlen dendritikus sejteken való kifejeződésének és funkciójának vizsgálata:

- Dendritikus sejt alpopuláció függő az Nav1.7 expresszió?
- Funkcionális ez a csatorna dendritikus sejtekben?
- Milyen dendritikus sejt funkciókra lehet hatással az Nav1.7 ioncsatorna?

A Kv1.3 csatornák szabályozzák a T sejtek membránpotenciálját, antigén prezentáció során az immunológiai szinapszisban dúsulnak fel, azonban az hogy hogyan és miért történik ez az átrendeződés ismeretlen. Számos adapter fehérjéről kimutatták, hogy különböző feszültségkapuzott K^+ csatornák sejten belüli elhelyezkedését befolyásolják, azonban az hogy immunsejtekben is megtalálhatóak-e ezek a fehérjék és ott is hatással vannak-e az ioncsatornák lokalizációjára még tisztázatlan. Ezek alapján munkánk második felében az alábbiakat tűztük ki célul:

Hogyan rendeződnek át a Kv1.3 ioncsatornák az immunológiai szinapszisba:

- Humán T sejtek kifejezik-e a PSD-95 és SAP97 fehérjéket?
- Kölcsönhatnak-e ezek a fehérjék a Kv1.3 ioncsatornával, és ha igen, a csatorna mely régióján keresztül?
- A Kv1.3 csatornán a kötőhely eltávolítása, vagy pedig a PSD-95 vagy SAP97 fehérje csendesítése hatással van-e a csatorna átrendeződésére immunológiai szinapszis kialakulása során?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Reagensek

A kísérletekben használt vegyszereket a Sigma-Aldrich-tól szereztük be (St. Louis, MO, USA), hacsak másképp fel nem lett tüntetve.

4.2 Dendritikus sejtek és sejtenyésztés

A humán monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálása CD14⁺ monocitákból, valamint fenotípusos jellemzésük és áramlási citometriával történő válogatásuk az Immunológiai Intézetben történt.

A Jurkat és Raji sejteket (ATCC, Németország) RPMI oldatban tenyésztettük, amelyet az alábbiakkal egészítettünk ki: 10% FBS, L-glutamin (2 mM), Penicillin (100 unit/liter) és Streptomycin (100 mg/liter). A HEK-293T (human embryonic kidney-293.T), tsA-201 és CHO (chinese hamster ovary) sejtek (ATCC, Németország) tenyésztése DMEM oldatban történt amely szintén tartalmazta a fentebb felsorolt kiegészítést.

4.3 Reverz transzkripció (RT) és polimeráz láncreakció (PCR)

A totál RNS izolálása körülbelül 5×10^6 Jurkat sejtől történt az RNA isolation kit felhasználásával. A reverz transzkripcióhoz Revert Aid H Minus enzimet és First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Fermentas, Biocenter Kft., Magyarország) használtunk.

A kódoló szekvenciák felsokszorozítása az alábbi forward és reverz primerekkel történt: PSD-95 esetén: 5'-CTAGAAGCCCCAGGATATGAGTTGC és 5'-CTGTCACTCAGGTAGGCA TTGCTGG, SAP97 esetén: 5'-AGATTTCCAGCCTTCCAAGCTCTAC and 5'-GCTGATTTC CAACACCTCCAGCAAT (Bio-Science Kft., Magyarország).

4.4 Plazmidok, klónozás

A PSD-95-öt illetve a SAP97-et tartalmazó plazmidokat J.S. Trimmer biztosította számunkra. A különböző mGFP N-terminális tag-et tartalmazó Kv1.3 csatornákat a retrovírusos pBMN-LacZ vektorba (a Nolan Lab-tól) klónoztuk át.

4.4.1 Transzformálás

A plazmidokat 200 µl jégen felolvasztott kompetens sejthez adtuk hozzá, majd 20 percig inkubáltuk jégen. 50-60 másodpercig hősokkot alkalmaztunk (42°C), majd két percre ismét jégre helyeztük a mintákat. A sejtekhez 800 µl SOC médiumot adtunk és 180 rpm-en, 37°C-on rázattuk 50 percig. A transzformált sejteket megfelelő antibiotikum tartalmú LB táptalajra szélesztettük. A kontroll, konstruktot nem tartalmazó szuszpenziót antibiotikumot tartalmazó illetve nem tartalmazó lemezekre is kiszélesztettük. A lemezeket egy éjszakán keresztül, 37°C-on inkubáltuk.

4.4.2 Plazmid preparálás

A plazmid DNS-t tartalmazó baktérium egy telepét megfelelő antibiotikum tartalmú LB táptalajba oltottuk le és egy éjszakán keresztül, 37°C-on, 180 rpm-en ráztattuk. A plazmid DNS kinyeréséhez a PureYield Plasmid Miniprep System-et (Promega Corporation, USA) használtuk. Nagyobb mennyiségű plazmid tisztításához az előtenyészetet 100x-ra hígítottuk, majd szintén 37°C-on, 180 rpm-en ráztattuk egy éjszakán keresztül, végül pedig a PureYield Plasmid Maxiprep System-et (Promega Corporation, USA) alkalmaztuk.

4.5 Plazmidok és siRNS transzfekciója

A PSD-95 és SAP97 expressziójához tsA-201 sejtekben 2 µg DNS/10 µl Lipofectamine 2000 reagenst (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) kevertünk össze, majd ezt adtuk a 35 mm-es petricsészében tenyésztett, körülbelül 80%-os konfluenciát elért sejtekhez. A sejteket a további kísérletekhez 24 óra múlva használuk.

A három különböző Nav1-7-specifikus, illetve a kontroll siRNS-t (Applied Biosystems) 1 pM-os végkoncentrációban adtuk a harmadik napon a differenciálódó éretlen dendritikus sejtekhez a GenePulser X Cell elektroporátor és 0,4-cm-es küvették (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével. Az Nav1.7 mRNS szintjét két nappal később, Q-PCR-rel vizsgáltuk.

4.6 SDS-PAGE és Western blot

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását 10-12%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. Ezt követően az elválasztott fehérjéket PVDF membránra (Millipore, Billerica, MA) transzferáltuk. A membránokat tejporral blokkoltuk, majd egy órán keresztül egér-anti-PSD-95, egér-anti-SAP97 (Antibodies Incorporated, Davis, CA), vagy nyúl-anti-aktin (Sigma-Aldrich) elsődleges antitestekkel majd HRP-vel konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA). A kötődött antitesteket kemiluminszcenciás módszerrel (Thermo Scientific Inc., Vantaa, Finland) detektáltuk.

4.7 GST pull-down

A GST-taggel fúzionált fehérjéket tartalmazó baktériumokat hideg lízis pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0.1 % Tween 20, 0.2 % 2-mercaptoethanol, Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem, Darmstadt, Germany)) szonikáltuk. A lizátumot centrifugáltuk, majd a felülúszót GST SpinTrap Purification Module (GE Healthcare, Piscataway, NJ)

oszlopokra pipettáztuk és lassú forgatás mellett 4°C-on immobilizáltuk a fehérjéket. A Jurkat sejteket szintén hideg lízis pufferben lizáltuk, majd lecentrifugáltuk és a felülúszót a GST-oszlopon immobilizált fehérjékhez adtuk és egy éjszakán keresztül 4°C-on forgattuk. Másnap a GST fúziós fehérjéket 10 mM glutationnal eluáltuk. Az eluátumokat SDS-PAGE és Western blot módszerekkel vizsgáltuk.

4.8 Virális transzdukció

A CHO és Jurkat sejtek transzdukciós protokollja a Nolan lab weboldaláról származik (<http://www.stanford.edu/group/nolan/>).

4.9 Immunológiai szinapszisok képzése és immunfluoreszcencia

A Jurkat sejt vonal a *Staphylococcus enterotoxin E* (SEE, Toxin Technologies, Sarasota, FL, USA) antigénre specifikus. Antigénbemutató sejt-ként a Raji, humán B limfóma sejt vonalat használtuk, melyet 10 µg/ml SEE-vel előinkubáltuk 30 percen keresztül, majd a két sejt vonalat 1:1 arányban kevertük. A sejt szuszpenziókat 1, 5, 10, 20 illetve 30 percig inkubáltuk 37°C-on, majd jégre helyeztük őket. 2%-os paraformaldehides fixálást követően CD3 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) elsődleges, majd jelölt másodlagos antitesttel (Alexa Fluor 647, GAMIG, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) inkubáltuk a mintákat.

4.10 Konfokális mikroszkópia és kiértékelés

A konfokális felvételeket Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal készítettük. A Kv1.3 IS-beli feldúsulásának kvantifikálásához (a T és B sejt érintkezési területén belüli CD3 polarizáció alapján) az alábbi tényezőt vezettük be (akkumulációs ráta, AR):

$$AR = \frac{\frac{(I_{IS} - I_{BG}) \cdot AREA_{IS}}{(I_{outside} - I_{BG}) \cdot AREA_{outside} - (I_{inside} - I_{BG}) \cdot AREA_{inside}}}{\frac{AREA_{IS}}{AREA_{outside} - AREA_{inside}}}$$

,ahol I_{IS} , $I_{outside}$, I_{inside} és I_{BG} az mGFP átlagos fluoreszcencia intenzitása a szinapszisban, a sejten kívül, a sejten belül, illetve egy sejt-mentes területen detektált háttérintenzitás. Az $AREA_i$ a fentebb említett szekciók területét jelenti. Az adatok kiértékeléséhez a MacBiophotonics ImageJ szoftvert használtuk.

4.11 Elektrofiziológia

A patch-clamp méréseket ún. teljes-sejt vagy outside-out konfigurációban, feszültség- vagy áram-zár üzemmódban végeztük. Méréseinkhez Multiclamp 700B és Axopatch-200A erősítőket használtunk. A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üvegkapillárisokból (Clark Biomedical Instruments, Pangbourne, UK) húztuk öt fázisban. A pipetták ellenállása 2-5 MΩ között volt az extra- és intracelluláris oldatban.

4.12 Statisztikai analízis

A kísérleteink során kapott adatok statisztikai összehasonlítását kétmintás t-próbával és ANOVA analízissel (szignifikancia-szint $p = 0,05$) végeztük el. A korreláció analízishez χ^2 próbát alkalmaztunk Yates korrekcióval.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1 Az Nav1.7 csatorna szabályozza a monocita eredetű éretlen dendritikus sejt alpopuláció membránpotenciálját és citokintermelését

5.1.1 Az Nav1.7 elsősorban a monocita eredetű éretlen dendritikus sejtek CD1a⁺ alpopulációjában fejeződik ki

Korábban munkacsoportunk már kimutatta, hogy a monocita eredetű éretlen dendritikus sejtek Nav1.7 csatornákat fejeznek ki, amely expresszió azonban a sejtek érett dendritikus sejtekké való differenciációja során lecsökken. Mivel a CD1a⁻ és CD1a⁺ IDC-ket korábban már eltérő funkcionális aktivitással jellemezték, összehasonlítottuk e két alpopuláció Nav1.7 expresszióját. A CD1a⁺ éretlen dendritikus sejtekben egy befelé irányuló, gyorsan aktiválódó és inaktiválódó Na⁺ áramot detektáltunk. Ugyanezen áram előfordulása CD1a⁻ IDC-k esetén szignifikánsan ritkábbnak bizonyult (χ^2 teszt Yates korrekcióval: CD1a⁺ (n=25) és CD1a⁻ (n=19), p=0,021). Ezen kívül jelentős különbséget találtunk a sejtek Na⁺ áram denzitásában (current density, CD): szignifikánsan magasabb volt a CD1a⁺ alpopulációban (CD_{CD1a⁺} = -83 ± 7,6 pA/pF, CD_{CD1a⁻} = -43 ± 13,4 pA/pF (n=9, p=0,015). Ellenben a két dendritikus sejt alpopuláció membránkapacitásában nem tapasztaltunk különbséget (CD1a⁺: 11,9 ± 1,5 pF és CD1a⁻: 13,5 ± 1,5 pF, n=9, p=0,457). Ezen felül az éretlen CD1a⁺ dendritikus sejtek relatív Nav1.7 mRNS tartalma is magasabb volt a CD1a⁻ alpopulációhoz képest, azonban ez az expressziós szint a sejtek érésével drámaian lecsökkent. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy az Nav1.7 csatornák szerepe szorosan összefügg a dendritikus sejtek éretlen állapotával, elsősorban a CD1a⁺ alpopulációban.

5.1.2 Az intracelluláris Ca²⁺-szint emelkedés leszabályozza az Nav1.7 expresszióját

A Ca²⁺ jelátvitel fontosságát a dendritikus sejtek aktivációjában számos kutatás támasztja alá, ezért megvizsgáltuk azt, hogy a hosszan tartó, megemelkedett intracelluláris Ca²⁺-szint önmagában képes-e csökkenteni az Nav1.7 expresszióját. Azt találtuk, hogy az ionomycin vagy thapsigargin által kiváltott megemelkedett intracelluláris Ca²⁺ koncentráció hatékonyan akadályozza az Nav1.7 gén kifejeződését, amely gátló hatás összemérhető a gyulladásos citokinkoktól által kiváltott gátlással. A citokin koktél által kiváltott Nav1.7 mRNS expresszió gátlására nem volt hatással az extracellulárisan alkalmazott 5 mM EGTA, azonban részben vagy teljesen megakadályozta az ionomycin vagy thapsigargin által okozott Nav1.7 expresszió csökkenést. 24 órával a thapsigargin kezelést követően megvizsgáltuk a

CD1a⁺ IDC-k csatornaexpresszióját elektrofiziológiával is. A vártak megfelelően az Nav1.7-et kifejező sejtek száma szignifikánsan lecsökkent a kezelés hatására, amely azonban EGTA alkalmazásával részben visszafordítható volt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az Nav1.7 expresszió csökkenésének a beindításában szerepe van a megemelkedett intracelluláris Ca²⁺ koncentrációnak.

5.1.3 A CD1a⁺ IDC-k membránpotenciálját az Nav1.7 csatorna szabályozza

A feszültség-kapuzott Na⁺ csatornák pontos szerepe immunsejtekben még ismeretlen, de valószínűsíthető hogy nagyban hozzájárulnak a sejtek nyugalmi membránpotenciáljának a beállításához. Ezért megvizsgáltuk mind az éretlen, mind az érett CD1a⁺ és CD1a⁻ dendritikus sejtek membránpotenciálját. Méréseink alapján a CD1a⁺ IDC-k nyugalmi membránpotenciálja szignifikánsan depolarizáltabb ($-8,7 \pm 1,5$ mV, n=14) a CD1a⁻ éretlen, vagy bármelyik érett dendritikus sejtéhez képest (-40 és -60 mV között, átlag: $-47 \pm 6,2$ mV, n=7). Feltételeztük, hogy a tapasztalt különbséget az eltérő Na⁺ csatorna expresszió okozhatja a különböző sejtípusokon, ezért meghatároztuk az éretlen dendritikus sejtek membránpotenciáljának extracelluláris Na⁺-ra való érzékenységet. Az extracellulárisan, tranziensen alkalmazott Na⁺-mentes oldat hiperpolarizálta a CD1a⁺ IDC-k membránpotenciálját a CD1a⁺ és CD1a⁻ érett, valamint a CD1a⁻ éretlen dendritikus sejteken mért értékekre. Ezzel szemben ugyanez az oldat nem volt hatással a CD1a⁻ IDC-k membránpotenciáljára.

A továbbiakban géncsendesítéssel vizsgáltuk az Nav1.7 membránpotenciálra való hatását. Nav1.7 specifikus siRNS-sel történő transzfekció hatására 13%-ra csökkent a csatornát kifejező CD1a⁺ IDC-k száma, míg a kontroll siRNS mellett a CD1a⁺ sejtek 96%-a továbbra is expresszálta az Nav1.7-et. Patch-clamp méréseink alapján az Nav1.7 specifikus siRNS-sel transzfektált CD1a⁺ IDC-k membránpotenciálja szignifikánsan negatívabb volt ($-22,3$ mV $\pm$ $1,5$ mV, n=8), mint a nem transzfektált CD1a⁺ IDC-ké (p<0,001). Mindemelett a Na⁺-mentes oldat alkalmazása mellett nem tapasztaltunk változást az Nav1.7 csendesített sejtek membránpotenciáljában, csakúgy, mint a korábban említett csatornát nem kifejező CD1a⁻ IDC-k esetében sem.

A membránpotenciál méréseink során egy magas K⁺-tartalmú extracelluláris oldat lehetséges hatását is megvizsgáltuk a különböző dendritikus sejt alpopulációk membránpotenciáljára. Az oldat tranziens alkalmazása során az IDC-k membránpotenciálja ~ 0 mV-ra depolarizálódott. Ez, és a CD1a⁻ IDC-k relatív negatív membránpotenciálja arra utalt, hogy K⁺ csatornák fejeződnek ki a membránban. Mivel a mukacsoportunk korábban már kimutatta, hogy az éretlen dendritikus sejtek nem rendelkeznek feszültség-kapuzott K⁺

csatornákkal, ezért feltételeztük valamilyen nem-feszültség-kapuzott K^+ csatorna jelenlétét. $CD1a^-$ IDC-kben rögzített áramgörbék alapján az $IKCa1$, vagyis a Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna expresszióját feltételeztük. Meghatároztuk az $IKCa1$ csatornák sejtenkénti számát mindkét IDC alpopulációban, de nem találtunk közöttük szignifikáns eltérést ($p=0,269$). Vagyis megállapíthatjuk, hogy a $CD1a^+$ IDC-k depolarizált nyugalmi membránpotenciálja nem az $IKCa1$ csatornák hiányával magyarázható.

5.1.4 Az Nav1.7 hatással van a $CD1a^+$ IDC-k citokin szekréciójára

Az irodalom alapján a monocita eredetű érett dendritikus sejtek gyulladásos természete a $CD1a^+$ alpopulációnak tulajdonítható. Mivel az Nav1.7 elsősorban ezekben a sejtekben fejeződik ki, azt feltételeztük, hogy a szerepe a dendritikus sejtek éretlen állapotának fenntartása lehet. Az Nav1.7-nek köszönhető megemelkedett nyugalmi membránpotenciál miatt a $CD1a^+$ IDC-k nagyobb ingert igényelnek az aktivációhoz, mint a $CD1a^-$ IDC-k. Ezen elméletünk tesztelésére TTX-et alkalmaztunk az Nav1.7 csatornák gátlásához. Eredményeink alapján a csatorna gátlása nem változtatta meg a sejtek életképességét és internalizációs kapacitását, illetve a az éretlenből érett dendritikus sejtté való differenciációra sem volt hatással. Ellenben a CD83 expresszió enyhén megnövekedett amikor TTX gátlás mellett a sejteket optimális és szuboptimális gyulladásos citokin koktéllal kezeltük, igaz ez a növekedés statisztikailag nem volt szignifikáns. Hasonló, ellenben szignifikáns növekedést tapasztaltunk a $TNF-\alpha$ ($n=5$; $p=0,015$), illetve az IL-10 ($n=5$; $p=0,036$) termelésében TTX gátlás melletti citokin koktél által kiváltott aktiváció esetében.

5.2 A Kv1.3 csatorna kölcsönhatása más fehérjékkel az immunológiai szinapszisban

5.2.1 A Jurkat sejtek PSD-95-öt és SAP97-et fejeznek ki

Mint ahogy azt korábban már említettük, a PSD-95 és a SAP97 két adapter fehérje, amelyek idegsejtekben különböző Kv csatornák elhelyezkedését szabályozzák. Ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy humán T sejtekben hatással vannak-e a Kv1.3 csatorna immunszinapszison belüli lokalizációjára, ennek érdekében azonban először ki kellett mutatnunk, hogy ezek a sejtek is kifejezik mindkét fehérjét. Mind cDNS, mind fehérje szinten sikerült detektálnunk a PSD-95-öt és a SAP97-et, vagyis megállapíthatjuk, hogy a Jurkat sejtek valóban expresszálják mindkét fehérjét.

5.2.2 A PSD-95 és a SAP97 is kölcsön hat a Kv1.3 csatorna C-terminális régiójával

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a Kv1.3 csatorna kölcsön hat-e a PSD-95-tel és/vagy SAP97-tel, és amennyiben igen, a csatorna mely régióján keresztül. A Kv1.3 lehetséges kötőhelyei a csatorna N-, illetve C-terminálisán is megtalálhatóak (PDZ és SH3 domének), ezért olyan GST-vel fuzionált bakteriális konstruktokat hoztunk létre, amelyek vagy az első 184 (GST-Kv1.3-N-term.) vagy az utolsó 94 aminosavát (GST-Kv1.3-C-term) tartalmazták a Kv1.3 csatornának. A GST pull-down kísérleteink alapján egyértelműen elmondható, hogy a Kv1.3 mindkét adapter fehérjével kölcsönhat, azonban ez az interakció csak az ioncsatorna C-terminális régióján keresztül valósul meg.

5.2.3 mGFP-vel konjugált Kv1.3 konstruktok over-expressziója és a PSD-95 vagy SAP97 csendesítése Jurkat sejtekben

Mivel a további kísérleteinkben a Kv1.3 csatorna lokalizációját konfokális mikroszkópiával kívántuk vizsgálni különböző körülmények között, ezért létre kellett hoznunk olyan Kv1.3 konstruktokat, amelyek egy fluoreszcens fehérjével vannak konjugálva. Ehhez a monomerekus zöld fluoreszcens fehérjét (mGFP) választottuk, és ezt csatoltuk nem csak a vad típusú (mGFP-Kv1.3-WT), hanem a C-terminálison trunkált, mutáns Kv1.3 csatornához (mGFP-Kv1.3-ΔC) is, amely nem rendelkezik az adapter fehérjét kötni képes régióval. A különböző Kv1.3 konstruktokat retrovirális transzdukció segítségével juttattuk be a Jurkat sejtekbe. A PSD-95 és a SAP97 szerepének további tanulmányozása érdekében pedig egyenként csendesítettük mindkét fehérje expresszióját Jurkat sejtekben, specifikus shRNS alkalmazásával.

5.2.4 Az mGFP-vel jelölt vad típusú és C-terminálisan trunkált Kv1.3 csatornák biofizikai karakterizálása

Mielőtt a fentebb említett konstruktokat használhattuk volna, fontos volt megvizsgálnunk azt, hogy az mGFP hozzáadása a csatornához és/vagy a Kv1.3 C-terminális trunkálása nem változtatja-e meg a csatorna biofizikai paramétereit. Ehhez patch-clamp technikát alkalmaztunk outside-out patch konfigurációban, és összehasonlítottuk az mGFP-Kv1.3-WT és mGFP-Kv1.3-ΔC csatornák kapuzási paramétereit CHO sejtekben.

Méréseink alapján a két csatorna áramgörbéi között nem tapasztaltunk különbséget. Az aktivációs időállandó statisztikailag nem különbözött az mGFP-Kv1.3-WT és az mGFP-

Kv1.3- Δ C konstruktok esetében (τ_a : $0,54 \pm 0,04$ ms az mGFP-Kv1.3-WT (n=10) és $0,56 \pm 0,02$ ms az mGFP-Kv1.3- Δ C konstruktt esetén (n=9), $p = 0,698$).

A két konstruktt inaktivációs kinetikája is egyezést mutatott, ami arra utal, hogy a csatorna C-terminálisának az eltávolítása nincs hatással az inaktivációra sem. Az inaktivációs időállandók között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (τ_{in} : 271 ± 31 ms az mGFP-Kv1.3-WT (n=7) és 240 ± 23 ms (n=6) az mGFP-Kv1.3- Δ C konstruktt esetén, $p=0,158$).

Végül a Kv1.3 csatorna konstruktok egyensúlyi aktivációjának feszültség-függését vizsgáltuk. A normált konduktancia-teszt potenciál görbéknél tapasztalt enyhe balra irányuló eltolódás a trunkált mutáns esetén nem bizonyult szignifikánsnak (meredekség: $14,2 \pm 1$ mV az mGFP-Kv1.3-WT (n=7), illetve $13,5 \pm 1$ mV az mGFP-Kv1.3- Δ C konstruktt esetében (n=5), $p=0,458$; míg a $V_{1/2} -19,5 \pm 1,2$ mV az mGFP-Kv1.3-WT (n=7) és $-25,4 \pm 5,4$ mV az mGFP-Kv1.3- Δ C konstruktt esetén (n=5), $p=0,282$). Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy mivel nincs szignifikáns különbség a két csatorna biofizikai paramétereiben, ezért a szinapszis képzés során tapasztalt esetleges csatorna-eloszlásbeli különbségeknek más magyarázata kell hogy legyen.

5.2.5 Immunológiai szinapszisok formálása Jurkat és Raji sejtek között

Annak érdekében, hogy feltárjuk a PSD-95 vagy SAP97 fehérjék lehetséges szerepét a Kv1.3 átrendeződésében, immunológiai szinapszist hoztunk létre a különböző csatorna konstruktokat kifejező Jurkat, valamint Raji B sejtek között. A sejteket különböző időpillanatokban fixáltunk (1, 5, 10, 20, és 30 perc) a szinapszis képzést követően annak érdekében, hogy a csatorna átrendeződésének a kinetikáját is meg tudjuk vizsgálni. Mivel köztudott, hogy a CD3 molekulák az immunológiai szinapszisban dúsulnak fel, ezért a szinapszisképzés pozitív kontrolljaként minden esetben anti-CD3 immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk. A mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

5.2.6 A Kv1.3 C-terminálisának delécioja illetve a PSD-95 fehérje csendesítése meggátolja a Kv1.3 csatorna feldúsulását az immunológiai szinapszisban

A szinapszisképzés hatására bekövetkező Kv1.3 átrendeződés kvantifikálása érdekében bevezettük az akkumulációs hányadost (AR), amely arányos az IS-ben található Kv1.3 töblettel az egyedülálló sejtekben megfigyelhető egyenletes csatorna eloszláshoz képest. Az álpozitív eredmények kizárása érdekében (a nem teljesen homogén Kv1.3 eloszlás

miatt), csak abban az esetben fogadtunk el egy sejtet Kv1.3 pozitívnak, ha az AR 1,5-nél nagyobbak adódott.

Legalább 50 sejtet vizsgáltunk minden időpillanatban, mindegyik sejtvonalon esetében. Eredményeink alapján az mGFP-vel konjugált vad típusú csatornák nagy arányban akkumulálódnak az immunszinapszisban: az AR a sejtek körülbelül 30%-ában magasabb volt mint 1,5 már az első percben, és a Kv1.3 polarizált sejtek száma fokozatosan csökkent a 30-ik percig. Ezzel szemben a C-terminálisan trunkált csatornák eltérő kinetikát mutattak: a sejteknek kevesebb mint 10%-a mutatott Kv1.3 feldúsulást bármely időpillanatban és nem tapasztaltunk időfüggést.

A Kv1.3 teljes C-terminálisának az eltávolítása bármely intracelluláris adapter fehérje kölcsönhatását megakadályozhatja. Ezért hogy megtudjuk, hogy a tapasztalt kinetikai változás a PSD-95 vagy a SAP97 kötődés hiánya miatt alakul-e ki, megvizsgáltuk a PSD-95, illetve a SAP97 csendesített sejteket is. Eredményeink alapján a PSD-95 csendesített sejtek a C-terminálisan trunkált csatornát kifejező sejtekhez hasonlóak: a Kv1.3 polarizált sejtek aránya itt is alacsony volt és nem mutatott időfüggést. Ezzel szemben a SAP97 csendesítése, vagy egy nem specifikus shRNS bejuttatása a sejtekbe nem volt hatással a Kv1.3 feldúsulásra. Mindez alátámasztja azon hipotézisünket, hogy a PSD-95 lehet az az adapter fehérje amely befolyásolja a Kv1.3 csatorna elrendeződését a T sejtek membránjában immunológiai szinapszis létrejötte közben.

5.2.7 A különböző mGFP-csatolt Kv1.3 csatornák azonos mértékben fejeződnek ki a Jurkat sejtvonalakban

Mint ahogyan azt már bemutattuk, az mGFP-Kv1.3- Δ C csatorna biofizikai paraméterei megegyeznek a vad típusú csatornával. Mindazonáltal a Kv1.3 IS-beli feldúsulásának kvantitatív vizsgálatát az ioncsatornák kifejeződésének a mértéke is befolyásolhatja a három különböző sejtvonalon: Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT, Jurkat-mGFP-Kv1.3- Δ C és Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT-KD-PSD95. Ezért a patch-clamp technika segítségével meghatároztuk az ezekeben a sejtekben regisztrált Kv1.3 áramok amplitúdóját és áramsűrűségét. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget sem az áramok amplitúdója (Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT: 4702 ± 540 pA for (n=10), Jurkat-mGFP-Kv1.3- Δ C: 3618 ± 444 pA (n=12) és Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT-KD-PSD-95: 4297 ± 800 pA (n=12), p=0,631), sem pedig az áramsűrűségek között (Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT: 1284 ± 329 pA/pF (n=10), Jurkat-mGFP-Kv1.3- Δ C: 1109 ± 314 pA/pF (n=12) és Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT-KD-PSD-95: 960 ± 229 pA/pF(n=12), p=0,541). Így kizárható annak a lehetősége, hogy a három sejtvonalon

tapasztalt eltérő Kv1.3 kinetika az immunszinapszisban, a sejtvonalak különböző csatornaszáma miatt alakulna ki.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során sikerült kimutatnunk, hogy a monocita eredetű CD1a⁺ éretlen dendritikus sejtek feszültség-kapuzott Nav1.7 ioncsatornákat fejeznek ki. Eredményeink alapján elmondható, hogy ez a feszültség-kapuzott nátrium csatorna szabályozza e sejtek membránpotenciálját, mely így befolyással lehet a dendritikus sejt aktivációs-küszöbérték beállítására. Az Nav1.7 csatorna gátlása tetrodotoxinnal a CD1a⁺ éretlen dendritikus sejtek nagyobb mértékű citokintermelését eredményezi szuboptimális citokin-koktél stimuláció hatására, amely a csatorna funkcionális szerepére utal a dendritikus sejt differenciációja során. Mindezek a tények alátámasztják hipotézisünket, miszerint az Nav1.7 csatornák a CD1a⁺ éretlen dendritikus sejtek membránját depolarizált állapotban tartják (kb. -10 mV), így biztosítva, hogy a sejtek csak az adott küszöbérték feletti stimulus hatására aktiválódnak. A dendritikus sejtek érése a veleszületett és az adaptív immunválaszra is hatással van, így ezen eredmények egy új szabályozó mechanizmust fednek fel, amely által a dendritikus sejtek működése szabályozódik.

Ezen kívül megvizsgáltuk a feszültség-kapuzott kálium csatorna, a Kv1.3 asszociációját két adapter fehérjével humán T sejtekben. Kimutattuk, hogy a Kv1.3 kölcsönhat mind a PSD-95, mind pedig a SAP97 fehérjével, és ez az interakció a csatorna C-terminális régióján keresztül valósul meg. Abban az esetben, ha eltávolítjuk a csatorna ezen szakaszát, vagy ha csendesítjük a sejtekben a PSD-95 fehérjét, jelentősen lecsökken a Kv1.3 polarizációt mutató azon T sejtek száma, melyek immunológiai szinapszisban vannak egy antigén prezentáló sejtrel. Ezzel szemben a SAP97 csendesítése ugyanezen sejtekben nincs hatással a Kv1.3 ioncsatorna immunszinapszisbeli lokalizációjára. Mindezekből arra következtethetünk, hogy a PSD-95 fehérjének jelentős szerepe van a Kv1.3 csatorna ezen szupramolekuláris klaszterben való feldúsulásában. Mindazonáltal a Kv1.3 funkciója a szinapszisban továbbra sem tisztázott, de úgy gondoljuk hogy ezen eredmények segíthetnek a továbbiakban ezen kérdés megválaszolásában.

Összefoglalásképp elmondhatjuk, hogy munkánk során két különböző feszültség-kapuzott ioncsatornát vizsgáltunk két különböző típusú immunsejtben, amelyek azonban elengedhetetlenek a megfelelő immunválasz kialakításához. Ezen csatornák pontos funkciójának és szabályozásának ismerete segíthet különböző immunbetegségek okának és lehetséges gyógymódjának megismerésében.

7. A PHD ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/383/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Szilágyi Orsolya

Neptun kód: YDIWEL

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

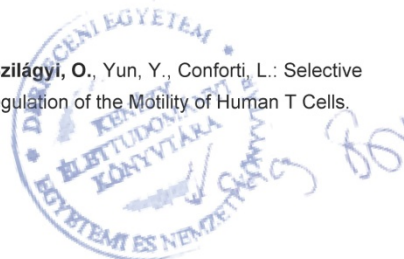
Mtmt azonosító: 10034484

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szilágyi, O.**, Boratkó, A., Panyi, G., Hajdú, P.: The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse.
PLoS Arch. 465 (9), 1341-1353, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1256-6>
IF:4.866 (2012)
2. Kis-Tóth, K., Hajdú, P., Bácskai, I., **Szilágyi, O.**, Papp, F., Szántó, A., Posta, E., Gogolák, P., Panyi, G., Rajnavölgyi, É.: Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Maintains the Membrane Potential and Regulates the Activation and Chemokine-Induced Migration of a Monocyte-Derived Dendritic Cell Subset.
J. Immunol. 187 (3), 1273-1280, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003345>
IF:5.788

További Közlemények

3. Chimote, A.A., Hajdú, P., Kucher, V., Boiko, N., Kuras, Z., **Szilágyi, O.**, Yun, Y., Conforti, L.: Selective Inhibition of KCa3.1 Channels Mediates Adenosine Regulation of the Motility of Human T Cells.
J. Immunol. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1300702>
IF:5.52 (2012)



4. Izsépi, E., Himer, L., **Szilágyi, O.**, Hajdú, P., Panyi, G., László, G., Matkó, J.: Membrane microdomain organization, calcium signal, and NFAT activation as an important axis in polarized Th cell function.
Cytometry A. 83 (2), 185-196, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22234>
IF:3.711 (2012)
5. Somodi, S., Balajthy, A., **Szilágyi, O.**, Pethő, Z., Harangi, M., Paragh, G., Panyi, G., Hajdú, P.: Analysis of the K⁺ current in human CD4⁺ T lymphocytes in hypercholesterolemic state.
Cell. Immunol. 281 (1), 20-26, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.004>
IF:1.743 (2012)
6. 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
7. 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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27.045

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10.654

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, 2013.11.28



8. KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

Előadások:

Szilágyi Orsolya, Boratkó Anita, Panyi György, Hajdu Péter. A PSD-95 a Kv1.3 ioncsatorna immunológiai szinapszisban való feldúsulásában (Ernst Jenő Díj), Veszprém, 2013, A Magyar Biofizikai Társaság XXIV. Kongresszusa

Orsolya Szilágyi, Anita Boratkó, György Panyi, Péter Hajdu. The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse, Mátraháza, 2013, Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies (IMPULSE)

Poszterek:

Szilágyi Orsolya, Tóth Ágnes, Bartók Ádám, Krasznai Zoltán, Panyi György, Hajdú Péter: Fluoreszcens fehérjével konjugált Kv1.3 csatornák komparatív vizsgálata, Sümeg, 2008, Membrane Transport Conference

Szilágyi Orsolya, Papp Ferenc, Herceg Mónika, Gáspár Rezső, Batista C. V. F., Zamudio F. Z., Varga Zoltán, Possani L. D. Pharmacological and biophysical studies of a toxin from the scorpion *Tytilus stigmurus*, Leuven, Belgium, 2008, IST Conference

Ágnes Tóth, **Orsolya Szilágyi**, Ákos Fábán, Zoltán Krasznai, György Panyi, Péter Hajdú. Functional Consequences of Kv1.3 Ion Channel Rearrangement Into The Immunological Synapse, Strbske Pleso, Slovakia, 2008, 8th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference,

Ádám Bartók, Ferenc Papp, Mónika Herceg, **Orsolya Szilágyi**, Rezső Gáspár. Pharmacological and biophysical studies of a toxin from the scorpion *Tytilus stigmurus*, Sümeg, 2008, Membrán Transzport Konferencia

Orsolya Szilágyi, Mónika Herceg, Gerrardo Corzo, Ferenc Papp, Zoltán Varga, Omar Barraza, Pavel G. Espino, Ricardo C. Rodríguez de la Vega, Rezső Gáspár, György Panyi, Lourival D. Possani. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the soluble venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*, Boston, USA, 2009, Biophysical Society 53rd Annual Meeting,

Szilágyi Orsolya, Tóth Ágnes, Krasznai Zoltán, Panyi György, Hajdú Péter. Kv1.3 csatornák immunológiai szinapszisba történő átrendeződésének funkcionális következményei, Pécs, 2009, A Magyar Biofizikai Társaság XXIII. Kongresszusa

Papp Ferenc, **Szilágyi Orsolya**, Herceg Mónika, Corzo Gerrardo, Varga Zoltán, Barraza Omar, Pavel G. Espino, Ricardo C. Rodríguez de la Vega, Gáspár Rezső, Lourival D. Possani, Panyi György. A *Centruroides suffusus* skorpió venomjából izolált toxin kálium-csatornát gátol, Pécs, 2009, A Magyar Biofizikai Társaság XXIII. Kongresszusa

Peter Hajdu, Katalin Kis-Toth, Ferenc Papp, Attila Szanto, Edit Posta, Ildiko Bacskai, Peter Gogolak, **Orsolya Szilágyi**, Eva Rajnavolgyi, Gyorgy Panyi. Voltage-gated Sodium Channel Nav1.7 Maintains The Membrane Potential And Regulates Chemokine-induced Migration Of A Subpopulation Of Monocyte-derived Dendritic Cells (poszter) Baltimore, USA, 2011, Biophysical Society 55th Annual Meeting

Orsolya Szilágyi, György Panyi, Anita Boratkó, Péter Hajdú. The possible role of PSD-95/SAP90 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse , Visegrád, 2011, Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies (IMPULSE)

Orsolya Szilágyi, György Panyi, Anita Boratkó, Péter Hajdú. The possible role of PSD-95/SAP90 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse, San Diego, USA, 2012, Biophysical Society 56th Annual Meeting

Orsolya Szilágyi, György Panyi, Anita Boratkó, Péter Hajdú. The possible role of PSD-95/SAP90 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse, Sümeg, 2012, Domján Brigitta, Papp Ferenc, Szántó G. Tibor, Bartók Ádám, **Szilágyi Orsolya**, Bacsó Zsolt, Panyi György, Krasznai Zoltán. RF expozíció akut hatásai Nav1.5 ioncsatornák működésére, Sümeg, 2012, Membrán Transzport Konferencia

Orsolya Szilágyi, Anita Boratkó, György Panyi, Péter Hajdu. The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse, Saint Petersburg, Russia, 2013, FEBS Congress

KULCSSZAVAK

ioncsatorna, patch-clamp, dendritikus sejt, T sejt, Nav1.7, Kv1.3, immunológiai szinapszis, MAGUK fehérjék

A kísérletes munka kivitelezéséhez a TÁMOP-4.2.2.A-11/1-KONV/2012-0025 nyújtott segítséget. A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



SZÉCHENYI TERV