

**EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**IONCSATORNÁK SZEREPE EGYES SEJTFUNKCIÓK  
AKTIVÁCIÓJÁBAN**

***RUBOVSKY BÁLINT***



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

**EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**IONCSATORNÁK SZEREPE EGYES SEJTFUNKCIÓK  
AKTIVÁCIÓJÁBAN**

***RUBOVSKY BÁLINT***

**Témavezető: Dr. Krasznai Zoltán egyetemi docens**

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

## I. BEVEZETÉS

Az élő szervezetben a sejtek közötti kommunikációt extracelluláris szignál-molekulák közvetítik. Ezek közé tartoznak a hormonok, neurotranszmitterek és a növekedési faktorok is. A jelátviteli folyamat során egy ilyen külső kémiai inger vált ki valamilyen sejtválaszt az intracelluláris térben bekövetkező anyagcsereváltozások révén. A receptorokhoz specifikusan kötődő természetes vegyületek a ligandok, azok strukturális analógjai pedig az agonisták vagy antagonisták. Az előbbi a természetes ligandhoz hasonló hatású, az utóbbi pedig nem idéz elő biológiai választ, viszont kompetíció révén gátolni képes az agonisták illetve ligandok hatását. Sok esetben a receptorok indirekt hatását G-proteinek közvetítik, amelyek a sejtmembrán belső rétegében helyezkednek el, és összeköttetést jelentenek a receptorok és azon enzimek között, melyek a másodlagos hírvivők szintézisét katalizálják.

A másodlagos hírvivők közé tartozik a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP). A cAMP szintjét meghatározó adenilát-cikláz enzim regulációját kétféle G-protein szabályozza: A  $G_s$  stimulálja, míg a  $G_i$  gátolja az enzim működését. Az előbbit a kolera-toxin permanensen aktiválja, az utóbbit pedig a pertussis toxin inaktiválja, így mindkét toxin a cAMP-szint növekedéséhez járul hozzá. Használatukkal megállapítható, hogy egy adott stimulus hatására a  $G_i$  vagy a  $G_s$  által mediált jelátviteli útvonal aktiválódott-e. A jelátviteli folyamatok során bekövetkező foszforilációs események befolyásolhatják az ioncsatornák funkcionális tulajdonságait. Az ioncsatornák ilyen módon megvalósuló modulációját sok csatorna-típussal kapcsolatban leírták. A funkcionális változások a csatornák által képviselt áram kinetikai paramétereit (aktiváció, inaktiváció), az aktiváció feszültségfüggését és az áram amplitudóját is érinthetik, illetve ezek kombinációját, komplex működésbeli változást létrehozva.

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

Az adenzin a szervezet minden sejtjében megtalálható vegyület. Meghatározott fiziológiás körülmények között kerül az extracelluláris térbe, megnövekedett oxigénszükséglet/oxigénellátás arány esetén. Az adenzin számos szövetben és sejtben sokféle hatás kifejtésére képes, ezek közé tartozik a koszorúerek tágítása és a perifériás érellenállás csökkentése. Tengerimalac pitvari szívizomzatban csökkenti a kontraktilis erőt, az aortában pedig relaxációt vált ki. A tüdő artériáiban ezzel szemben kontrakciót indukál az adenzin, ami a légzési ritmust befolyásolja.

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

Számos szelektív adenzin-receptor agonista, illetve antagonistá létezik, melyek eltérő affinitással kötődnek az egyes receptor-típusokhoz. Ez lehetőséget ad a receptorok farmakológiai módszerrel történő azonosítására. Viszonylag nagy affinitású  $A_1$ -agonista az N6-ciklopentil-adenzin (CPA),  $A_{2A}$ -agonista a 2-[p-(2-karbonil-etil)-feniletiamino]-5'-N-etilkarboxamidoadenzin (CGS),  $A_{2B}$ -agonista az 5'-N-etil-karboxamidoadenzin (NECA).  $A_1$ -antagonista az 1,3-dipropil-8-ciklopentilxantin (DPCPX). Nonszelektív adenzin-receptor antagonistá a koffein, a teofillin, illetve a 8-fenil-teofillin (8-PT).

Bár az adenzin-receptorok legismertebb jelátviteli útvonala az adenilát-cikláz-aktivitás gátlása vagy aktivációja, az adenzin számos hatása konduktanciabeli változásokkal jár, különösen a  $K^+$  és  $Ca^{2+}$ -csatornák módosításával, amely természetesen a membránpotenciál megváltozását is maga után vonja. Ismert, hogy a membránpotenciál alapvető szerepet játszik a jelátvitelben, azonban a membránpotenciál megváltozásának lehetséges szerepét a sejtek adenzin-receptor-aktivációra történő válaszában még nem vizsgálták részletesen.

Az adenzin érfal-simaizomzatot relaxáló hatása olyan mechanizmusok révén valósul meg, melyek az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szintet csökkentik illetve a kontraktilis apparátus  $Ca^{2+}$ -érzékenységét redukálják. A  $K^+$ -csatornák fontos szerepet játszanak a relaxáció közvetítésében: Megnövekedett aktivitásuk hiperpolarizálja a simaizomsejtet, és így a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$ -csatornákon át kevesebb  $Ca^{2+}$  tud beáramlani a sejtbe, ezáltal csökken a simaizom-kontrakció. Ebben a folyamatban szerepet játszanak a  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$ -csatornák, és az ATP-függő  $K^+$ -csatornák is: A nagy konduktivitású  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$ -csatornák gátlása blokkolja az adenzin által indukált koszorúér-dilatációt, az ATP-függő  $K^+$ -csatornák adenzin hatására történő aktivációja pedig az artéria elernyedését eredményezi. Újabban feszültségfüggő káliumcsatornákra is leírták az érfal-izomtónust befolyásoló funkciót. Ezért új vagy ismert adenzin-származékok hatásának vizsgálata izomsejtek káliumáramaira egy alkalmas módszer lehet a származék funkcionális vizsgálatára.

A pozitron-emissziós tomográfia (PET) segítségével vizsgálható az adenzin-receptorok eloszlása a központi idegrendszerben és a szívizomzatban. Ilyen vizsgálatok elvégzésére az elmúlt évtized során több protokollt is kidolgoztak, különböző ligandok használatával. Ezen technika radioaktívan jelölt ligandok alkalmazását igényli, amelyek nagy aktivitással és szelektivitással rendelkeznek. A  $^{18}F$ -NECA az  $A_2$  adenzin-receptor agonista NECA radioaktívan jelölt származéka, ahol egy pozitron-emittáló fluor-atomot

kötnek az eredeti molekulához. Az F-NECA a  $^{18}\text{F}$ -NECA nem-emittáló változata. A  $^{18}\text{F}$ -NECA már bizonyítottan alkalmas radioligand az adozin-receptorok eloszlásának PET-tel történő megjelenítésére.

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

A *Ciona* zsákállat magplazmájának ozmolaritása hasonló a tengervízéhez, vagyis nincs változás az ozmolaritásban az ívásnál. A spermát aktiváló és vonzó anyag, az SAAF, mely a petéből származik, a felelős a *Ciona* spermájának aktiválásáért, kiváltva a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákon történő beáramlását.

A különböző fajok spermiumsejtjeiben közös, hogy a sejtek viselkedését elsődlegesen a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok határozzák meg. A spermiumok több olyan csatornát expresszálnak, melyek a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok számára átjárhatóak és ezek a csatornák nélkülözhetetlen szerepet játszanak a sperma-motilitás szabályozásában.

A feszülés-aktivált, mechanikailag érzékeny csatornák egyaránt megtalálhatók a növényi és állati sejtekben [93,94]. Ezek a csatornák sokféle mechanikai hatásra adott válaszban szerepet játszanak, így a sejtterfogot szabályozásában, az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció megemelkedésében és a sejtek proliferációjában. A mechanikailag érzékeny csatornák a leggyakrabban kation-szelektívek, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionokat és az egyértékű kationokat egyaránt átengedik. A gadolinium blokkolja a feszülés-aktivált csatornákat, és így több fiziológias folyamatot gátol.

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

Az immunológiai szempontból fontos jelátviteli molekulák sejtfelszíni együttállásaiból adódó szuperstruktúrák létezésére és lehetséges biológiai szerepére a közelmúltban több kísérleti eredmény is felhívta a figyelmet. Ezen molekulák közé tartoznak az I.-es és II.-es osztályba sorolt Fő Hisztokompatibilitási Antigének (MHC I és MHC II), az Interleukin-2 citokin receptor-komplex (IL-2R), és az Intercelluláris Adhéziós Molekula 1 (ICAM-1). Az ilyen molekulák nano- és mikrométeres nagyságrendű homo- és heteroasszociációi figyelemreméltó hasonlóságot mutatnak a vizsgált különböző sejtvonalakon.

A már régóta ismert antigén-prezentáló funkciójukon kívül az MHC I és MHC II molekulákról érdekes módon újabban kimutatták, hogy egyfajta aktív, „nemklasszikus” szerepet töltenek be a transzmembrán szignalizációban: apoptózist indukálhatnak vagy sejteket aktiválhatnak a differenciáltság mértékétől és a sejtvonal típusától függően. Az elmúlt években azt találták, hogy IL-2 receptor szignalizációjához tartozó tirozin és szerin kinázok az MHC által kiváltott útvonalakban is részt vesznek.

Ezekből a megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy a fenti molekulákat receptor-klaszterekbe szervező lipid raftok a jelátvitel funkcionális egységeinek tekinthetők, ennek eredményét pedig a fehérjekomponensek egymáshoz viszonyított aránya és minősége határozza meg.

A lipid raftok összetételén kívül a transzmembrán jelátvitelt egy másik fontos fiziológiai tényező is befolyásolja: a membránpotenciál. A hatékony

jelátvitelhez szükséges potenciál-ablak fenntartásában meghatározó szerepet játszanak a feszültség- és  $\text{Ca}^{2+}$ -függő káliumcsatornák. Ezek az ioncsatornák vélhetően direkt vagy indirekt módon csatoltak az MHC-t és IL-2R-t tartalmazó lipid raftokhoz.

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

## II. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

A Kv1.3 csatornák bizonyos receptorok és kinázok általi modulációjának ismeretében arra is kerestük a választ, hogy az immunválaszban szerepet játszó sejtfelszíni receptorok és a Kv1.3 fizikai közelségben vannak-e. Méréseinket Kit 225 K6 humán T-limfóma sejtvonalon kívántuk elvégezni, a kérdéses receptorok pedig az MHC I, MHC II, az IL-2R $\alpha$  alegység és a VLA-4 integrin, melyek ezeken a sejteken egyazon lipid rafthoz asszociáltak. Negatív kontrollként az előbbtől különböző rafthoz tartozó TrfR-t kívántuk használni.

### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

**Sejtek** A szíriai aranyhőrcsög vas deferens-éből származó simaizom-sejtvonalat (DDT1 MF-2) az European Collection of Animal Cell Cultures-től (Salisbury, UK) szereztük be. A DDT1 MF-2 sejteket 37 °C-on tenyésztettük, 5

% CO<sub>2</sub>-t és 95 % O<sub>2</sub>-t tartalmazó nedves környezetben. A tenyésztési médium a Dulbecco's modified Eagle's medium, melyet kiegészítettünk 2 mM L-glutaminnal és 10 % (v/v) fetal calf serum-mal (FCS). A sejteket mechanikai úton távolítottuk el, ezután mostuk PBS-ben. Az áramlási citometriás mérésekhez 2x10<sup>7</sup>/ml koncentrációban felvett sejtszuszpenziót alkalmaztunk. Az endogén adenzin eltávolítására adenzin-deaminázt (2 E/ml) adtunk a sejtekhez, 10 perccel a mérés megkezdése előtt. A sejtek életképességének vizsgálatára tripánkék jelölést használtunk, mely szerint a sejtek 90 %-a élő volt. A Kit-225 K6 egy humán T-limfóma sejtvonal helper fenotípussal. Osztódásához IL-2 ligand rendszeres adása szükséges. A sejteket RPMI-1640 médiumban tenyésztettük, amely 10 % fetal calf serum-ot, penicillint és streptomycin-t tartalmazott. A sejtekhez 20 egység/ml rekombináns IL-2 ligandot adtunk 48 óránként.

**Elektrofiziológia** A patch-clamp méréseket feszültség-zár üzemmódban, teljes-sejt konfigurációban végeztük, Axopatch-200-A patch-clamp erősítővel, melyet összekötöttünk egy Digidata 1200 számítógépes interfésszel (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). A mintavétel során aluláteresztő szűrést használtunk, a mintavételezési frekvencia felénél. A patch-elektrodák ellenállása 3-4 MOhm volt, amelyet GC150 F-15 boroszilikát üvegapillárisokból gyártottunk (Clark Electromedical Instruments, Reading, UK). A pipettákat KF alapú intracelluláris oldattal töltöttük meg, mely EGTA-t tartalmazott. A sejteket NaCl alapú, Ca<sup>2+</sup>-ot és Mg<sup>2+</sup>-ot tartalmazó extracelluláris oldatban mértük. 1-10 Gohm nagyságrendű nagy kontaktusú ellenállást alakítottunk ki a sejten, a patch-pipetta belsejére irányuló szívás alkalmazásával. Ezt követően teljes-sejt konfigurációt hoztunk létre szívás-impulzusok alkalmazásával. A kísérletek döntő részében a szívárgási áram elhanyagolható volt a sejten mérhető K<sup>+</sup>-áramokhoz képest. A soros ellenállás 3-10 Mohm volt, kompenzációként 80 % korrekciót és 40 % predikciót alkalmaztunk. Minden patch-clamp mérés 20 °C-

on történt. Az árammérési protokollokat legalább 12 perccel a teljes-sejt konfiguráció kialakítása után indítottuk. A patch-clamp kísérletek kezdetéig a sejteket jégen tartottuk, így több órán keresztül változatlanok maradtak az azokon mérhető  $K^+$ -csatornák tulajdonságai. Az adenzin-receptor ligandokat a NR-ben oldottuk, majd folyamatos áramlási rendszerrel juttattuk a sejtekhez, szelepek felhasználásával. A patch-clamp adatok értékelését a pClamp8 programcsomag segítségével végeztük (Axon Instruments, Inc.).

**Áramlási citometria** Az áramlási citometriás membránpotenciál-méréseket a negatívan töltött oxonol festék használatával végeztük, amely a membrán két oldala között a Nernst-egyenletnek megfelelően oszlik meg. A mérésekhez egy módosított, argon-ion lézerrel ellátott FACSTAR áramlási citométert használtunk (Becton Dickinson, Parsippany, NJ, USA). Az oxonol festék fluoreszcenciáját 488 nm-es vonallal gerjesztettük 200-400 mW teljesítménnyel. A kimeneti optika része volt egy 520 nm-es felüláteresztő szűrő a szórt gerjesztő fény kiszűrésére, és egy 540 nm-es sávszűrő. A kis szögben előreszórt fényt az adatgyűjtés során elektronikus kapuzásra használtuk, amely lehetővé tette az elpusztult sejtek kiszűrését az analízisre kerülő sejtek halmazából. A sejteket  $10^6$ /ml koncentrációban, szobahőmérsékleten futtattuk. A fluoreszcencia-hisztogram mérését a festődés egyensúlyának kialakulását követően kezdtük el. A másodjára adott ligand módosító hatásának vizsgálatára a ligandot az egyensúly beállta után adtuk a festett sejtuszuspenzióhoz.

**Kontraktilitás-mérés** *(a) pitvari szívizomzat* A tengerimalacok étterrel történő altatás alatti dekapitálása után a mellkast kinyitottuk és a szívet gyorsan kivágtuk és 30 °C-os, oxigénnel átáramoltatott NaCl alapú Krebs oldatban mostuk. A bal pitvart izoláltuk és 10 ml-es, függőleges szervfürdőbe helyeztük, amelyben 37 °C-os Krebs oldat volt. A pitvart elektromosan ingereltük, 3 Hz-el, a küszöb feszültség kétszeresének alkalmazásával, egy programozható stimulátor segítségével. Az izometrikus összehúzódásokat egy transzducerrel mértük és

poligráffal vettük fel. 10 mN kezdeti, nyugalmi mechanikai feszültséget alkalmaztunk a preparátumokon. A kontraktilis paraméterek stabilizációját követően kumulatív NECA illetve F-NECA dózis-hatás görbéket ( $E/[A]$ ) vettünk fel. *(b) tüdőartéria és aorta* A tengerimalacok mellkasi aortájának és fő tüdőartériájának középső részéből körívben futó szegmenseket preparáltunk. A szöveteket vertikálisan rögzítettük egy 37 °C-os Krebs-oldatot tartalmazó szövetkamrában, 5 % CO<sub>2</sub> mellett. A tüdőartériából és aortából származó ércsíkok mechanikai feszültségét izometrikusan mértük, transzducer alkalmazásával, és a kimenetet feszültségmérő és regisztráló berendezéshez kapcsoltuk. A mintákra 10 mN kezdeti mechanikai feszültséget adtunk, az egyensúly után pedig 1 μM noradrenalinval inkubáltunk, majd mostuk.

Amikor a kontrakció stabillá vált, 10 μM NECA oldatot vezettünk a szervfürdőbe és addig vártunk, míg a maximális hatást el nem értük. A szöveteket ezután többször friss, 1 μM noradrenalint tartalmazó Krebs-oldattal mostuk és vártunk, amíg stabilizálódtak. A tüdőartériákon a NECA és F-NECA hatásának vizsgálatára non-kumulatív méréseket végeztünk, míg a mellkasi aortákon az adеноzin-analógokkal kumulatív mérést folytattunk. A purinvegyületek hatását befolyásoló 8-PT-t a nyugalmi állapot alatt adtuk 30-40 percig, a szövetek ezt követően noradrenalint kaptak, melynek hatására a kontroll tónusnak megfelelő szintre húzódtak össze. A NECA és F-NECA által kiváltott, A<sub>1</sub>-receptor-mediált kontrakciók vizsgálatára szolgáló mérések végén a szöveteket enyhén festettük és megmértük a hosszúságadataikat és a súlyukat. Az adеноzin-analógokra adott válaszokat ezt követően úgy számoltuk ki, hogy meghatároztuk a mechanikai erő növekedését (mN egységekben), és ezt osztottuk a szövet keresztmetszetével (mm<sup>2</sup> egység használatával).

**A membránfluiditás mérése** 1 ml sejtszuszpenzióhoz 10 μl TMA-DPH törzsoldatot adtunk (a TMA-DPH végső koncentrációja: 10<sup>-6</sup> M), és quartz-küvettában inkubáltuk 5 percig 20 μM GdCl<sub>3</sub> mellett vagy anélkül. 2 ml FPS-t (a

sperma immotilis maradt) vagy 2 ml desztillált vizet (kiváltott spermamotilitás) adtunk a küvettákhoz és így mértük az anizotrópiát. A hozzáadott FPS és desztillált víz ugyanolyan koncentrációban tartalmazott TMA-DPH-t vagy  $GdCl_3$ -ot.

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

**Patch-clamp bemosási idő mérések az L243 monoklonáris antitesttel** A stabil teljes-sejt konfiguráció kialakítása után legalább öt depolarizáló impulzust adtunk a sejtre. Az impulzusok -120 mV-os tartófeszültségről indultak és +50 mV feszültséget adtak 20 ms ideig. Az impulzusokat 15 másodpercenként ismételtük. Miután meggyőződünk arról, hogy az áramszint stabil, egyensúlyi értékre állt be, 30  $\mu$ l L243 antitest-oldatot pipettáztunk közvetlenül a sejtre (az oldószer PBS volt). A csúcsáram értékét folyamatosan nyomon tudtuk követni a depolarizáló impulzusok adásával, és az antitest adását követő percekben fokozatos csökkenést figyeltünk meg, amely az alsó egyensúlyt 3- 6 perc alatt érte el. Az antitest-oldat koncentrációja 2.5 mg/ml volt.

## IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

*Adenozin-receptor-mediált jelátviteli folyamatok simaizomsejteken* A DDT1 MF-2 simaizomsejteken az  $A_1$  adenozin-receptor agonista CPA (50 nM) alkalmazása hiperpolarizációt eredményezett. Az  $A_1$ -receptor antagonistá DPCPX (1  $\mu$ M) szignifikánsan csökkentette az agonista által indukált hiperpolarizáló hatást. A sejtek előinkubálása 100  $\mu$ M 4-AP-vel, mely egy feszültségfüggő káliumcsatorna-blokkoló, vagy 1  $\mu$ M DPCPX-el, teljesen megszüntette a CPA membránpotenciálra gyakorolt hatását. A DDT1 MF-2 sejteken elvégzett patch-clamp kísérletek kifelé irányuló, feszültségfüggő áramot mutattak. Ezt az áramot teljes mértékben gátolni tudtuk a feszültségfüggő káliumcsatorna-blokkoló 4-AP (5 mM) vagy TEA (10 mM) perfúziójával. A CPA alkalmazása a (10 nM-10  $\mu$ M)-ig terjedő tartományban fokozatosan növelte ezt az áramot, 1  $\mu$ M koncentrációnál 30 %-os növekedést produkálva. Így a kálium-permeabilitásban bekövetkező változás lehet felelős azért a hiperpolarizációért, amelyet a CPA vált ki.

Az  $A_{2A}$ -receptor agonista CGS 21680 a 10 nM-tól 3  $\mu$ M-ig terjedő koncentráció-tartományban az  $A_1$ -agonista CPA-val ellentétes hatást fejtett ki a DDT1 MF-2 sejtek membránpotenciáljára és káliumkonduktanciájára vonatkozóan. 1  $\mu$ M  $A_{2A}$  adenozin-receptor antagonistá CSC adása a sejtekhez repolarizációt eredményezett, és a membránpotenciál visszaállt az eredeti érték közelébe. A CPA megszüntette a CGS 21680 által indukált depolarizációt a sejteken. A CPA-nak ez a tulajdonsága feltehetően abból adódik, hogy az  $A_1$ -receptoroknak négyszer nagyobb az expressziós szintje DDT1 MF-2 sejteken az  $A_{2A}$ -receptorokhoz viszonyítva. Amikor a patch-clamp mérések során 10 nM – 10  $\mu$ M CGS 21680-t perfundáltunk a sejtekhez, a teljes-sejt káliumáram azonnali csökkenését tapasztaltuk. A nagyobb koncentrációknál a CGS 21680 az áram inaktivációját is gyorsította, az inaktiváció változása a 100 nM-os

koncentrációnál volt a legkifejezettebb. Annak a demonstrálása céljából, hogy a káliumáram tulajdonságaiban bekövetkezett változások során a receptorok a csatornákra G-protein-független módon fejtik ki hatásukat, a kísérletet a leghatásosabb CGS 21680 koncentrációnál (100 nM) megismételtük pertussis-toxin kezelt sejteken. Nem találtunk szignifikáns különbséget a pertussis-toxin-kezelt (200 µg / ml, 4h-ig inkubált) és a kontroll sejtek között sem a csúcsáram blokkolásában (rendre  $73 \pm 12 \%$ , és  $66.9 \pm 8.8 \%$ , n=5, sem az áram inaktivációs kinetikájának változásában (rendre  $54 \pm 9.7 \%$ , és  $64.8 \pm 12\%$ , n=5).

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

A káliumcsatornák különböző altípusokra specifikus adenzin-analógokra adott válasza szövetről szövetre eltérő lehet. Dart és Standen eredményei szerint bár mind az  $A_1$ , mind az  $A_2$  típusú receptorok megtalálhatók a sertés koszorúérből származó simaizomsejteken, az  $A_1$  adenzin-receptorhoz történő kötődés káliumáramot aktivál, de az  $A_{2A}$  receptorok esetében ez nem mondható el.

Elképzeléseink szerint az adenilát-cikláz  $A_{2A}$ - és  $A_1$ -receptor aktivációt követő stimulációja vagy gátlása egy olyan mechanizmus révén valósul meg, melynek részét képezi az első lépések között a transzmembrán-potenciálban

bekövetkező ligand-indukált változás, mivel a membrán-polaritásban kiváltott változás az enzim feszültségfüggő konformációs változását idézheti elő.

Az általunk talált eredmények alapján a DDT1 MF-2 sejtek egyedülállóak abban a tekintetben, hogy megnövekedett  $K^+$ -konduktanciával és hiperpolarizációval reagálnak az  $A_1$ -receptor aktivációra, ezzel szemben csökkent káliumárammal és depolarizációval válaszolnak az  $A_2$ -receptor ellenes ligand-kezelésre. Ezért ezek a sejtek farmakológiai kutatások hasznos tárgyát képezhetik, mert segítségükkel az  $A_1$ - és  $A_{2A}$ -mediált mechanizmusok ugyanazon sejtvonalon tanulmányozhatók.

**A NECA és F-NECA adenzin-származékok által kiváltott kontraktilitásváltozások vizsgálata szöveteken** Az elektromosan stimulált pitvari szívizomzatban – mely egy adenzin  $A_1$ -receptorokat tartalmazó szövet – A NECA és az F-NECA is koncentrációfüggő módon csökkentette a kontraktilis erőt. A NECA és F-NECA dózis-hatás görbéit felvéve és elemezve azt kaptuk, hogy a maximális hatás ( $E_{max}$ ) és a Hill-koefficiens ( $n_H$ ) nem különbözött szignifikánsan a két vegyületre vonatkozóan, míg az F-NECA látszólagos affinitása ( $EC_{50}$ ) kisebb volt, mint a NECA-é (rendre  $7.50 \pm 0.18$  és  $8.23 \pm 0.12$ ).

1  $\mu$ M noradrenalinral előkezelt és így összehúzott, tengerimalac tüdőartériából származó izolált csíkokon a NECA és F-NECA is koncentrációfüggő módon fázisos kontrakciót idézett elő (gyorsan kialakuló kezdeti kontrakció, mely az irodalom szerint  $A_1$ -mediált). A két vegyület által okozott fázisos kontrakció dózis-hatás görbéjéből azt kaptuk, hogy az F-NECA görbéjére vonatkozó  $E_{max}$  és Hill-koefficiens értékei nem különböznek a NECA esetében kapott értékektől. A görbékből számított  $EC_{50}$  értékek azonban itt is szignifikánsan eltérőnek adódtak (F-NECA:  $6.20 \pm 0.01$ , NECA:  $6.58 \pm 0.05$ )

Fenti eredményeink szerint az F-NECA affinitása kisebb mind a myokardiális, mind az érfalban levő  $A_1$  adenzin-receptorokon. A maximális

hatás ( $E_{\max}$ ) és Hill-koefficiens ( $n_H$ ) hasonlóságát azzal magyarázhatjuk, hogy a NECA és az F-NECA hasonló jelátviteli útvonalak közvetítésével hat.

Az 1  $\mu\text{M}$  noradrenalinral előkezelt tengerimalac aorta preparátumban – mely egy  $A_{2B}$  adenzin-receptort expresszáló szövet – a NECA és az F-NECA is dózisfüggő módon relaxációt váltott ki. Erre vonatkozó dózis-hatás görbéket is felvettünk. A két vegyület hatása között nem találtunk szignifikáns különbséget sem a görbékől számított maximális hatás ( $E_{\max}$ ), sem a Hill-koefficiens ( $n_H$ ), sem a látszólagos affinitást jellemző  $EC_{50}$  értékében.

A következő kísérletsorozatban tengerimalac tüdőartériából származó – mely mind  $A_1$ , mind  $A_{2B}$  adenzin-receptorokat expresszál – mintákat használtunk, ahol az  $A_1$  adenzin-receptorokat 0.3  $\mu\text{M}$  DPCPX-el gátoltuk, amely egy specifikus  $A_1$  adenzin-receptor antagonistá. Ilyen módon az  $A_{2B}$  adenzin-receptorok által indukált gyors relaxációt megbízhatóan tudtuk tanulmányozni. A relaxáció jellemzése céljából a tüdőartériákon dózis-hatás görbéket vettünk fel a NECA, illetve F-NECA vonatkozásában. Egyik vegyület hatása között sem találtunk különbséget sem az  $E_{\max}$  sem a Hill-koefficiens sem az  $EC_{50}$  értékeknél, ezért úgy gondoljuk, hogy a NECA és az F-NECA ekvivalens agonisták a vaszkuláris  $A_{2B}$  adenzin-receptorokon. Annak vizsgálata céljából, hogy a NECA és F-NECA valóban adenzin-receptorokon keresztül hat, 1  $\mu\text{M}$  8-PT (nonszelektív adenzin-receptor-antagonista) jelenlétében is felvettünk dózis-hatás görbéket. A 8-PT a NECA és F-NECA dózis-hatás görbét egyaránt jobbra tolta, és az általuk kiváltott maximális relaxáció ( $E_{\max}$ ) szintén csökkent. A 8-PT hatásának további vizsgálata céljából a NECA-ra és F-NECA-ra vonatkozó  $E(A)$  görbék  $EC_{25}$  értékeit határoztuk meg a 8-PT hiányában és jelenlétében, majd ezekből koncentráció-hányadosokat számoltunk ( $EC_{25}$  8-PT után /  $EC_{25}$  8-PT előtt). A NECA-ra és F-NECA-ra számított koncentráció-hányadosok rendre a következők voltak:  $3.83 \pm 0.69$  és  $4.94 \pm 0.54$ . A NECA és F-NECA ekvivalenciáját az  $A_{2B}$  receptorokon tehát a 8-PT-vel végzett mérés is megerősíti.

A DDT1 MF-2 simaizomsejteken mért teljes-sejt áramnak két komponense van: egy befelé irányuló, feszültségfüggő  $\text{Na}^+$ -áram és egy kifelé irányuló, feszültségfüggő  $\text{K}^+$ -áram. Mivel a nátriumáram hamarabb inaktiválódott, mint ahogy a káliumáram aktiválódott, ezért lehetővé vált a káliumáram nátriumáramtól független mérése. A feszültségfüggő, kifelé irányuló káliumkonduktancia farmakológiai analízisét is elvégeztük, nem-peptid (TEA) és peptid (ChTx, MgTx) típusú gátlószerek alkalmazásával. A félhatásos dózis ( $\text{EC}_{50}$ ) értékei a gátlószerekre a következők voltak: TEA: 2.1 mM, MgTx: 43 pM, ChTx: 910 pM, mely a Kv1.3 csatornák tulajdonságainak felel meg. A DDT1 MF-2 sejteken a NECA- illetve F-NECA-kezelés szignifikáns mértékben csökkentette a teljes-sejt káliumáramot. 5  $\mu\text{M}$  NECA hatására a  $-120$  mV-ról  $+40$  mV-ra történő depolarizáció következtében kialakuló áram csúcserőssége az eredeti érték  $61.2 \pm 8.3$  %-ra csökkent ( $n=3$ ), míg  $80.6 \pm 4.7$  %-ra esett, amikor az F-NECA-t használtuk.

A NECA-val és F-NECA-val történő perfúziós kezelés szignifikánsan gyorsította a membránáram inaktivációját is. Ennek megfelelően az exponenciális illesztésből számolt inaktivációs időállandó az eredeti érték  $55.1 \pm 18.0$  %-ára csökkent 5  $\mu\text{M}$  NECA hatására, míg 5  $\mu\text{M}$  F-NECA-nak kisebb hatása volt, az időállandót a kontroll  $80.1 \pm 15.3$  %-ára csökkentve. A két származék különbözőképpen befolyásolta az áram aktivációs időállandóját is: míg 5  $\mu\text{M}$  NECA  $73.9 \pm 10.0$  %-ra történő csökkenést váltott ki, 5  $\mu\text{M}$  F-NECA nem eredményezett szignifikáns változást, az eredeti szint  $104.6 \pm 1.8$  %-ára állítva az időkonstanst.

A NECA és F-NECA eltérő hatása a kémiai szerkezetük különbözőségének következménye lehet, amely eltéréseket idézhet elő ezeknek a vegyületeknek az  $\text{A}_1$  és  $\text{A}_{2\text{B}}$  adozin-receptorhoz való affinitásában. Mivel mind az  $\text{A}_1$ , mind az  $\text{A}_{2\text{B}}$  receptorok megtalálhatók a DDT1 MF-2 sejtek felszínén (Ramkumar és munkatársai), és a NECA mindkét receptornak agonistája (Stinnakre és Renterghem), a NECA vagy F-NECA kötődése által

kiváltott funkcionális válasz az  $A_1$  és  $A_{2B}$  által mediált hatásoknak az összegeként adódik.

**Mechanikai feszülés-aktivált csatornák szerepének vizsgálata spermiumok aktivációs folyamataiban** A *Takifugu niphobles* (fugu hal) spermiumok immotilisak voltak az eredeti környezetüknek megfelelő SLS illetve NoCaSLS oldatokban. A motilitás kiváltásához a tengervíznek megfelelő ASW- vagy  $Ca^{2+}$ -mentes NoCaASW-oldatot használtunk. Amikor ASW-be helyeztük, a fugu halak spermiumsejtjei  $90.6 \pm 2.0$  % motilitást mutattak,  $163.2 \pm 5.35$   $\mu\text{m/s}$  sebességgel. Amikor a spermiumokat NoCaASW-ben vettük fel, nem volt szignifikáns különbség az ASW-hez képest sem a motilis hányadban ( $87.6 \pm 3.1$  %), sem a sebességben ( $149.7 \pm 7.3$   $\mu\text{m/s}$ ), ez azt jelzi, hogy extracelluláris  $Ca^{2+}$  nem szükséges a motilitás kiváltásához.

Ez a megfigyelésünk összhangban van Oda és Morisawa eredményeivel, melyek szerint a fugu sperma motilitását ki lehet váltani extracelluláris  $Ca^{2+}$  nélkül is.

Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  kivonása a spermiumokból 10  $\mu\text{M}$  A231186 kalcium-ionofór-t tartalmazó NoCaSLS oldattal történő inkubálással azt eredményezte, hogy a NoCaASW adását követően nem kezdtek el mozogni a sejtek. 100  $\mu\text{M}$   $Ca^{2+}$  adását követően a sejtek ismét motilissá váltak, és a sebességértékeik megközelítették a kontroll értékeit. Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a fugu spermiumsejtjének motilissá válásához intracelluláris kalcium megléte szükséges.

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

szerint tehát az intracelluláris raktárakban tárolt  $\text{Ca}^{2+}$  a külső ozmolaritás megváltozása nélkül is képes kiváltani a sperma-motilitást.

A mi eredményeink azonban részben ellentmondanak ennek, ugyanis a méréseink szerint a fugu spermiumai fiziológias ozmolaritású oldatban mozdulatlanok maradtak különböző koncentrációjú külső  $\text{Ca}^{2+}$  (1-100  $\mu\text{M}$ ) és 10  $\mu\text{M}$  A23187 mellett. Itt az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint beállításához kiegyenlítettük az extra- és intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációkat 10  $\mu\text{M}$  A23186 alkalmazásával, és különböző  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú külső oldatot használtunk. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növekedése nem váltotta ki a spermiumok motilitását, ha a sejtek izotóniás SLS-ben voltak. Amikor azonban ugyanolyan  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú ASW-ben vettük fel a sejteket, akkor megindult azok motilitása. Ezek az eredmények komoly bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedése önmagában nem elegendő a spermák mozgásának elindításához, és hogy az ozmolaritás hipertóniás irányba történő eltolódása az elsődleges kiváltó tényező.

A kalmodulin szerepének vizsgálatához a W-7 kalmodulin-antagonistát használtuk. 100  $\mu\text{M}$  W-7 alkalmazása 10 perc alatt a kontroll értékének  $8 \pm 3$  %-ra csökkentette a motilitást. A szintén kalmodulin-antagonista TFP (200  $\mu\text{M}$ ) a motilitást a kontroll  $3 \pm 1$  %-ra csökkentette.

Több különböző ioncsatorna-gátlószer hatását is megvizsgáltuk a fugu spermiumsejtenek motilitására. A 21 káliumcsatorna-blokkolót tartalmazó Econokit EK-300 (Alomone Labs) gátlószerei közül csak a Penitrem A (10  $\mu\text{M}$ , 15 perc inkubálás) csökkentette a motilitást ( $43 \pm 12$ ). Az EK-400 kalciumcsatorna-blokkolók sem fejtettek ki hatást a sejtek mozgására, mint ahogy a 25  $\mu\text{M}$  koncentrációban adott klorid-csatorna gátló chlorotoxin sem.

Mivel a kalmodulin-gátlószerek blokkolták a fugu spermájának motilitását, továbbá sem a sejtmembránban lévő kalciumcsatornákat, sem a káliumcsatornákat blokkoló szerek nem befolyásolták a fugu spermájának

motilitását, arra következtethetünk, hogy a kalmodulin és a belső raktárakból felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  kölcsönhatása játszik központi szerepet a fugu hal spermiumai motilitásának hiperozmotikus kezelés által kiváltott aktivációjában.

A feszülés-aktivált ioncsatorna-blokkoló gadolinium megváltoztatta a (tengeri) fugu hal és az (édesvízi) ponty spermiumsejtjeinek motilitását is: A fugu hal motilitását a kontroll  $92 \pm 3$  %-os értékéhez képest az 5, 10 és 20  $\mu\text{M}$  koncentrációban alkalmazott gadolinium rendre  $17 \pm 9$ ,  $11 \pm 4$  és  $6 \pm 3$  %-ra csökkentette. A gadolinium a ponty-sperma motilitást is dóziszfüggő módon csökkentette. A motilitás a kontroll érték negyedrézére csökkent, miután a spermiumokat 1 percig inkubáltuk 20  $\mu\text{M}$  gadoliniumot tartalmazó FPS-ben, és 3 %-ára esett vissza, amikor 40  $\mu\text{M}$ -os gadolinium-koncentrációt alkalmaztunk. A *Ciona* zsákállat spermiumsejtjeinek SAAF-fel vagy valinomycinnel kiváltott motilitását azonban nem befolyásolta szignifikánsan a gadolinium-kezelés (20 vagy 40  $\mu\text{M}$ ).

A nyugalomban levő, motilis illetve gadolinium-kezelt (40  $\mu\text{M}$   $\text{GdCl}_3$ ) ponty-sperma-minták membránfluiditását is megmértük. A TMA-DPH-val jelölt, nyugalomban levő spermiumok fluoreszcencia anizotrópia-értéke  $0.242 \pm 0.02$ -nek adódott. A hypoozmotikus kezelés –amely a sperma-motilitást is indukálja– megnövelte a membránfluiditást (mért anizotrópia-érték:  $0.182 \pm 0.02$ ). A gadolinium-kezelés mind a nyugvó, mind a hypoozmotikus kezelésnek kitett sejtek membránját rigidizálta.

A gadolinium a sejtmembrán lipid részéhez kötődik (Ermakov és munkatársai), és a kettősréteg fizikai tulajdonságainak megváltozása hatással lehet a jelátviteli folyamatra is. A lantanidák nagy affinitású kötődése befolyásolja a foszfolipid kettősrétegek fizikai tulajdonságait is. Ezek a változások érinthetik a transzmembrán fehérjék konformációs változásának a dinamikáját is (Cantor). A gadolinium aktívan kivonja a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot a felszínről, és egyes zsírsavláncok újrarendeződését okozza, valamint fázisszeparációt idéz elő

(Li és munkatársai). A transzmembrán fehérjékre nyomást fejthet ki a környező lipidek  $Gd^{3+}$  jelenlétében bekövetkező kondenzációja, és ez a nyomás megakadályozhatja a mechanikai feszültség által kiváltott konformációs átmenetet. A  $GdCl_3$  (40  $\mu M$ ) szignifikánsan csökkenti a közönséges ponty spermájának membránfluiditását és a hipotóniás kezelés fluidizáló hatását is ellensúlyozza. Ez a megfigyelés azt az elképzelést támasztja alá, hogy a gadolinium a plazmamembrán strukturális változását idézi elő.

**A sztérikusan gátolt toxin-kötődés elmélete** A sejtfelszíni fehérjék (receptorok, ioncsatornák) együttálásának vizsgálatára kidolgoztunk egy olyan módszert, amely a gátolt felületi diffúzió jelenségét tárgyaló korábbi elméleti biofizikai cikkekre támaszkodik. Modellünkben toxin ioncsatornához történő kötődésének módosulását vizsgáltuk közelségben lévő gömbrészecskék hatására. Eredményeink szerint a toxin-diffúzió laterális komponensének aranygömbök általi késleltetésével fehérje-proximitás detektálható, ami kvantitatív megközelítésben azt jelenti, hogy a patch-clamp mérések során kapott  $k_{on}$ -ban változást mérünk.

**A kérdéses receptorok sejtfelszíni eloszlásának vizsgálata** A késleltetés mértékét a homoasszociáció foka is befolyásolja. Az általunk használt Kit 225 K6 humán T-limfóma sejtvonalon az MHC I, MHC II, IL-2R $\alpha$ , VLA-4 és TrfR intermolekuláris távolsága áramási citometriás energiatranszfer hatékonyságból számítva rendre  $7.0 \pm 0.1$ ,  $7.8 \pm 0.2$ ,  $8.8 \pm 0.2$ ,  $8.1 \pm 0.2$  és  $7.5 \pm 0.1$  nm volt. A mérések alapján a relatív expresszós szinteket is meghatároztuk: a legnagyobb expressziójú MHC I értékét alapul véve (100 %), amely  $1.25 \times 10^6$  kötőhelyet jelent, az MHC II, IL-2R $\alpha$ , VLA-4 és TrfR értékei rendre  $76.6 \pm 8.6$ ,  $34.2 \pm 8.3$ ,  $<4.0$  és  $15.3 \pm 1.5$  volt.

**Molekuláris asszociációk vizsgálata** Méréseink szerint a VLA-4 integrin jelentős heteroasszociációt mutat az MHC II molekulával,  $E = 17.6 \pm 2.5$  energiatranszfer-hatékonysággal. A VLA-4 és az MHC I között valamivel kisebb, de még mindig jelentős az együttállás, itt  $E = 13.7 \pm 3.6$ . Negatív

kontrollként a TrfR és MHC I proximitása szolgált, ahol  $E = 3.5 \pm 2.0$ . A legnagyobb energiáttranszfer az MHC II és az MHC I között volt ( $20.6 \pm 1.5$ ).

**A toxin- és antitest-kötődés gátlásának detektálása** Egy sejtfelszíni receptorra vonatkozóan négy különböző mintán végeztünk patch-clamp kísérleteket, melyekben a Pi2 skorpiótoxin Kv1.3 csatornát blokkoló hatását vizsgáltuk a Kit 225 K6 sejtvonalon. A blokkolási görbékből számolt  $\tau$  bemosási időállandó a kontroll (jelöletlen) sejtekre  $\tau_{in} = 27.3 \pm 1.7$  s-nak adódott. A csak másodlagos aranygömb (g30:GAMIG) mellett inkubált mintára  $\tau_{in} = 26.1 \pm 1.7$  s értéket kaptunk, ami nem jelentős eltérés. Az antitesttel elsődlegesen jelölt sejteknél az MHC I, MHC II, IL-2R $\alpha$ , VLA-4 és TrfR esetében a  $\tau_{in}$  értéke rendre  $30.1 \pm 1.4$ ,  $28.7 \pm 1.6$ ,  $29.9 \pm 1.3$ ,  $27.6 \pm 1.7$  és  $27.8 \pm 1.6$  s volt. Ezek az értékek csak kismértékben nagyobbak a kontrolltól. Az antitesttel elsődlegesen és aranygömbbel másodlagosan is jelölt sejteken viszont jelentősen nőtt a  $\tau_{in}$  értéke a VLA-4 és a TrfR kivételével: rendre  $45.9 \pm 4.7$ ,  $40.0 \pm 3.1$ ,  $36.3 \pm 2.0$ ,  $29.6 \pm 1.7$  és  $29.2 \pm 1.2$ . Ezt azt jelenti, hogy a Kv1.3 csatornák az MHC-molekulákat tartalmazó raftokhoz közel helyezkednek el, a TrfR-októl pedig távol. A VLA-4 integrin esetében a kismértékű eltérés a VLA-4 receptorok kicsiny számából adódhat.

Összegzésképpen kiszámítottuk a csatorna-toxin asszociáció sebességi állandója, a  $k_{on}$  relatív változását is másodlagos jelölés hatására, az elsődleges jelölést alapul véve. A  $\Delta k_{on}/k_{on}$  a legnagyobb az MHC I-re és MHC II-re ( $-42.7 \pm 9.8$  % és  $-40.0 \pm 10.3$  %).

A toxin-kötődés bemosási időállandójának ( $\tau_{on}$ ) ilyen mértékű csökkenése alapján arra következtethetünk, hogy a Kv1.3 csatornák az MHC-molekulákat tartalmazó lipid raftokban vannak, vagy legalábbis többségük az immunogold részecskemérettel összemérhető távolságban van a raftoktól. Ez Jürgens és munkatársai valamint Murphy és munkatársai alapján 30-50 nm, az aranygömb átmérőjének és a bevonó antitestréteg vastagságának az összege.

Mivel az MHC II expressziós szintje  $76.6 \pm 8.6$  %-ka az MHC I-ének, ezért az MHC II statisztikusan közelebb helyezkedhet el a Kv1.3 csatornához. Az IL-2R $\alpha$  és a VLA-4 integrin esetében a  $\Delta k_{on}/k_{on} -17.5 \pm 10.6$  % illetve  $-13.0 \pm 10.3$  %. A VLA-4 esetében ez utóbbi érték is jelentős lehet, ha figyelembe vesszük ezen fehérje viszonylag kicsi expressziós szintjét ( $< 4$  %). A TrfR  $\Delta k_{on}/k_{on}$  értéke csupán  $-2.8 \pm 10.4$  % (nincs szignifikáns késleltetés).

Az a tény, hogy IL-2R $\alpha$  alegység esetében kisebb  $k_{on}$  – beli relatív változást mértünk, annak tulajdonítható, hogy bár az IL-2R $\alpha$  az MHC I és MHC II fehérjékhez hasonló méretű klasztereket alkot, a sűrűségük szignifikánsan kisebb, a nagyobb receptor-receptor távolságnak (8.8 nm az IL-2R $\alpha$ -ra és 7.0 nm az MHC I-re) és az ide vonatkozó konfokális mikroszkópiás képeknek megfelelően. Ezek szerint a Kv1.3 csatorna az IL-2R $\alpha$  alegységekkel is hasonló nagyságrendű, bár némileg kisebb mértékű molekuláris közelségben van, mint az MHC-molekulákhoz.

Egy, a fentiekkel analóg kísérletben sejt felszíni receptor-antitest kötődés késleltetését kívántuk megvizsgálni közeli antitest-aranygömb komplex hatására. Kísérleteink során azt találtuk, hogy az L243 MHC II-ellenes antitest *in situ* adása whole-cell konfigurációban  $53 \pm 15$  %-kal csökkentette a Kit 225 K6 sejtek Kv1.3 csatornáinak áramát. Ezt a jelenséget alapul véve olyan mérést terveztünk, melyben három mintát készítettünk: egy jelöletlen, egy MHC I-jelölt (W6/32 antitest) és egy MHC I aranygömb-jelölt (W6/32 + g30) sejtszuspenziót.

A minták sejtjeihez L243 antitestet adva a csatornák árama fokozatosan csökkent, melynek exponenciális illesztésből számolt  $\tau_{be}$  lecsengési időállandói rendre  $8.3 \pm 2.8$ ,  $11.3 \pm 4.2$  és  $37.4 \pm 9.5$  %. Eszerint minél nagyobb ligandot kötünk az MHC II közelében lévő MHC I-re, annál nagyobb mértékű az MHC II-jelölt L243 csatornaáramot módosító hatásának késleltetése. Az irodalom alapján úgy gondoljuk, hogy az L243 kötődése az MHC II-höz egy

intracelluláris jelátviteli folyamatot hoz létre, ez vezet a Kv1.3 csatornák gátlásához (indirekt hatás). Bene és munkatársai a sejtmembrán depolarizációját tapasztalták az MHC II-höz történő antitest-kötődés során JY B limfoblaszt sejteken, Pieri és munkatársai pedig az IL-2 receptorhoz történő IL-2 kötődéskor HUT-102B2 T-limfoblaszt sejteken. Ezek a megfigyelések összhangban állnak azon elképzelésünkkel, hogy mindkét receptor ugyanannak a transzmembrán szignalizációs platformnak, az MHC-ket tartalmazó lipid raftnak az eleme ezeken a sejt vonalakon.

## V. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink nyomán megállapításokat tehettünk sejtmembránbeli kationcsatornák receptorok és extracelluláris ozmolaritás általi szabályozásáról és ezek élettani szerepéről.

1. A DDT1 MF-2 simaizomsejteken az  $A_1$  adenzin-receptor agonista CPA és az  $A_{2A}$  adenzin-receptor agonista CGS 21680 ellentétes irányban változtatta meg a membránpotenciált.  $A_1$  és  $A_{2A}$  antagonistákkal meg tudtuk akadályozni ezt a változást.

A CPA alkalmazása dózisfüggő módon növelte sejteken mért kifelé irányuló feszültségfüggő káliumáramot, ezzel szemben a CGS 21680 csökkentette azt. Ennek alapján a káliumkonduktanciában bekövetkező változás tehető felelőssé a membránpotenciálbeli változásokért. A CGS 21680 dózisfüggő módon gyorsította a káliumcsatornák inaktivációját. A pertussis-toxin alkalmazása nem befolyásolta a CGS 21680 káliumáram-blokkoló hatását, jelezve, hogy az  $A_{2A}$ -agonista nem G-proteinen keresztül modulálja a csatornákat.

2. Tengerimalac szöveteit vizsgálva, pitvari szívizomzatban és tüdőartériában mind az adenzin-receptor agonista NECA, mind a PET

radiofarmakon analógja, az F-NECA koncentrációfüggő módon rendre a kontraktilis erő csökkenéséhez illetve fázisos kontrakcióhoz vezetett ( $A_1$ -mediált hatás). Az F-NECA hatása mindkét szövetnél kisebb volt.

A mellkasi aorta preparátumon és DPCPX-előkezelt tüdőartériákon a NECA és az F-NECA dóziszfüggő módon relaxációt indukált, a két analóg között viszont itt nem adódott szignifikáns különbség. ( $A_{2B}$ -receptor-mediált hatás).

A DDT1 MF-2 sejteken mért feszültségfüggő káliumáramot mind a NECA mind az F-NECA szignifikánsan csökkentette és az áram inaktivációját is gyorsította. A kiváltott hatás azonban az F-NECA esetében kisebb volt. Fentiekből arra következtettünk hogy az F-NECA a NECA egy funkcionálisan kevésbé aktív analógja.

**3.** A mechanikai feszülés-aktivált kationcsatornák szerepét vizsgáltuk abban a jelátviteli folyamatban, amely különböző fajok spermiumainak aktivációjához vezet. Ezeket a csatornákat gátolja a gadolinium, amely kísérleteink szerint a tengeri fugu és az édessvízi ponty spermájának motilitását dóziszfüggő módon csökkentette. A fugu spermiumban található egyik fehérje izoelektromos pontjának a motilitás megindulásával járó eltolódását gátolta a gadolinium-kezelés. Ez a fehérje közvetítheti a feszülés-aktivált csatornák hatását. A fluoriméteres anizotrópia-méréseink során azt találtuk, hogy a ponty-sperma motilitását kiváltó hipoozmotikus kezelés növeli a membránfluiditást, a gadolinium viszont ezt megakadályozza. A feszülés-aktivált kationcsatornák tehát szerepet játszanak olyan fajok sperma-motilitásának megindításában, ahol a sperma eltérő ozmolaritású közegbe kerül a megtermékenyítéskor.

**4.** A következő kísérletsorozatban ioncsatornák és receptorok együttállását vizsgáltuk humán T-limfóma sejtvonalon. A patch-clamp technika segítségével kimutattuk, hogy az MHC I, MHC II glikoprotein, IL-2R $\alpha$  alegység, VLA-4 integrin és transferrin sejtfelszíni receptorokhoz kötött 30 nm átmérőjű arany nanorészecskék különbözőképpen modulálják a Pi2 toxin Kv1.3 csatornához történő kötődését. A moduláció a csúcsáramok exponenciális illesztésével nyert

$\tau_{in}$  toxin-bemosási időállandó növekedésében mutatkozott meg a jelöletlen sejtekhez képest. Adatainkkal a Kv1.3 csatornák MHC-molekulákat tartalmazó raftokhoz való közelségét demonstráltuk. Az MHC I és MHC II már előzetesen igazolt közelségét felhasználva egy olyan kontroll-kísérletet végeztünk, melynek során az MHC I-hez kötött antitesteknek és aranygömböknek az (MHC II receptor-L243 antitest) kötődést térbeli leszorító hatását vizsgáltuk. Az L243-mediált csatornamodulációt ilyen módon sikeresen gátoltuk. Kidolgoztunk tehát egy olyan új módszert, mellyel receptor-csatorna vagy receptor-receptor proximitásokat tudunk detektálni, a koncentráció-ugrást követő, sztérikusan gátolt diffúzió elmélete alapján.

## VI. AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

**Rubovszky B**, Szentmiklósi AJ, Márián T, Cseppentő Á, Gesztelyi R, Székely A, Forizs F, Gáspár R, Trón L and Krasznai Z: Comparative pharmacological studies on the A<sub>2</sub> adenosine receptor agonist 5'-n-ethyl-carboxamidoadenosine and its F<sup>19</sup> isotope labelled derivate. *J. Pharmacol. Sci.* 93, 356-363 (2003)

Márián T, **Rubovszky B**, Szentmiklósi AJ, Trón L, Balkay L, Boros I, Gáspár R, Székely A, Krasznai Z: A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptor activation inversely modulates potassium currents and membrane potential in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 89, 366-372 (2002)

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

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