

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Feszültség-kapuzott kationcsatornák vizsgálata
humán sejteken fiziológias és patológias
állapotokban**

Dr. Fehér Ádám

Témavezető: Prof. Dr. Varga Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Feszültség-kapuzott kationcsatornák vizsgálata humán sejteken fiziológias és patológias állapotokban

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

Írta: Dr. Fehér Ádám okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja keretében

Témavezető: Prof. Dr. Varga Zoltán, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Bartók Ádám, PhD
Dr. Pál Balázs Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Gábor Czirják, PhD
Dr. Zoltán Balajthy, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A
épület tanterme, 2024. november 27. 14 óra

1. ELŐSZÓ

Az ioncsatornák transzmembrán fehérjék, melyeket csoportosítani lehet szelektivitás (azaz hogy milyen ionokat transzportál) és kapuzás (azaz hogy milyen stimulus aktiválja őket) alapján. Az ioncsatornák egy kiterjedt családját alkotják a feszültség-kapuzott kationcsatornák, melyek számos funkciót látnak el különböző sejtípusokban. Ingerelhető sejtekben (ideg- és izomsejtek) közismert kanonikus szerepük az akciós potenciál (AP) létrehozása, de nem ingerelhető sejtekben is fontos működéssel bírnak. Ezek közé tartozik a nyugalmi membránpotenciál kialakítása és fenntartása, ozmoreguláció, intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és pH szabályozása, de szerepük van a sejt migrációban és proliferációban is. Így belátható, hogy a kóros működésük közvetlenül okozója lehet patológiás állapotoknak, valamint közvetett módon befolyásolhatja egyes betegségek lecsengését. Ilyen ioncsatorna betegségek (azaz „*channelopátiák*”), az epilepszia-, a Brugada-, a hosszú-QT- és a Lambert-Eaton szindrómák; valamint megkülönböztethetünk ioncsatornák kóros működéséhez kapcsolható patológiás állapotokat, mint daganatos, immun és autoimmun betegségeket. Ebből következik, hogy ezen ioncsatornák farmakológiai célpontok lehetnek számos betegség kezelésénél. Ahhoz, hogy az adott kezelés minél kevesebb mellékhatással járjon, találnunk kell szelektív gátlószereket, hogy a terápia sejt- illetve szövetspecifikus legyen. Ennek érdekében elengedhetetlen megismerni a humán sejtek ioncsatorna-profilját különös tekintettel a járulékos alegységek jelenlétére.

Dolgozatom két témát ölel fel, melynek során feltérképezi a különböző kationcsatornák kifejeződésének mintázatát fiziológias és patológiás állapotokban. A fiziológias állapotot az egészséges humán perifériás vérből nyert B sejtek jelentették. Kollaborációs projektünk a Debreceni Egyetem Transzplantációs Medicina tanszékével azt vizsgálta, hogy milyen változások következnek be a B sejtek ioncsatornaprofiljában antitest-mediált vesekilöködés során. A kutatás alatt észrevettük, hogy a kontroll (egészséges) mintákból nyert B sejtek egy részén feszültség-kapuzott nátriumcsatornákra (Nav) jellemző befele irányuló ionáram figyelhető meg, így elvégeztük ezen áramot adó ioncsatornáknak biofizikai- és expressziós vizsgálatát. A kóros állapot leírásához egy rosszindulatú daganatot, a glioblasztómát választottam. Ezen sejtek invazivitásához, és sugárrezisztenciájához hozzájárul a $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ ioncsatornák aktivitása. Mivel a pórusformáló (α) alegység számos sejtben kifejeződik, elvégeztük a járulékos (β) alegységek expressziójának vizsgálatát, amely jó kiindulási pont az ioncsatorna szövetspecifikus gátlására.

2. BEVEZETÉS

2.1 A humán B sejtek ioncsatornái

A B sejtek vagy B limfociták az adaptív immunrendszer részét képezik, és fontos szerepük van a humorális immunválaszban antitestek termelése révén. Emellett citokin szekrécióval a T sejt differenciációt és antigén-prezentációt is befolyásolják. Ezen komplex viselkedéshez nagyban hozzájárul a sejtmembránban kifejeződő ioncsatornák működése. A legtöbb tanulmány, ami a humán limfociták ioncsatornáiról szól, az vagy a T sejtekre fókuszált, vagy perifériás vérből vett limfocita állományt használt, amiben a B sejtek aránya csekély. Így a humán B limfociták ioncsatorna profilja kevésbé definiált, ami utat ad számos új tanulmány elvégzésére.

A humán limfociták számos ioncsatornát kifejeznek a sejtmembránjukban. Ezen transzmembrán fehérjék felelősek a sejtfejlődésért, sejtproliferációért, jelátvitelért és sejtaktivációért is. Köztük vannak feszültség-kapuzott-, Ca^{2+} -aktivált- és háttér káliumcsatornák; feszültség-kapuzott és raktár-függő kalciumcsatornák; feszültség-kapuzott protoncsatorna és tranziens receptorpotenciál (TRP) csatornák.

Közülük a legjobban karakterizált ioncsatorna a feszültség-kapuzott káliumcsatorna családba tartozó $\text{Kv}1.3$, amely mind B és T sejtekben megtalálható. A csatorna a membrán depolarizációjának hatására aktiválódik, és fő feladata a membránpotenciál szabályozása. A $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ egy kalcium-aktivált káliumcsatorna, mely B sejt receptor (BCR) aktiváció során, a nyugalmi membránpotenciál szabályozásával, lehetővé teszi a jelátvitelhez és sejtaktivációhoz elengedhetetlen kalcium beáramlást. Több publikáció is született már az L-típusú kalciumcsatornák ($\text{Cav}1$) jelenlétéről a T és B sejt membránjában, melyek aktivációja kapcsolatban van a T és B sejt receptor (TCR és BCR) stimulációval, de jelenleg nincs elfogadott elektrofiziológiai bizonyíték a kifejeződésükről. Egy másik kalciumcsatorna, a raktár-függő ORAI1 szintén TCR/BCR stimuláció során aktiválódik, és szerepe van a sejtproliferációban és a citokin termelésben is. A nátrium permeábilis ioncsatornák a humán limfociták membránjában nem rendelkeznek nagy irodalommal, habár pár tanulmány szerint a nátrium beáramlásnak szerepe lehet a limfociták sejtválaszában, mivel csökkentheti az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelkedésének esélyét, így megakadályozva a sejthalált. Ezen csatornák között leírták az amilorid-szenzitív nátriumcsatornákat, a TRP csatornákat és a purinerg receptorokat.

Az utóbbi évtizedekben sok publikáció született a limfociták ioncsatornáiról, és van bizonyíték a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák jelenlétéről a limfociták membránjában, de eddig nem készült olyan tanulmány, ami elektrofiziológiai és molekuláris biológiai módszerekkel is vizsgálja, és részletesebben karakterizálja a $\text{Nav}1$ ioncsatornákat a humán B sejteken.

2.2 A feszültség-kapuzott nátriumcsatorna család (szerkezet és funkció)

A feszültség-kapuzott nátriumcsatornák (Nav_1) legismertebb funkciója az akciós potenciál kialakítása az ingerelhető sejtek membránjának depolarizációján keresztül. A Nav_1 ioncsatorna család 9 tagból áll ($Nav_1.1-1.9$). Közülük a $Nav_1.1, 1.2, 1.3$ és 1.6 főleg a központi idegrendszerben található meg, míg a $Nav_1.7-1.9$ csatornák a perifériás idegrendszerben fejeződnek ki. Az idegsejtek mellett, az excitábilis sejtek másik csoportjában, az izomsejtekben is kifejeződnek Nav_1 csatornák. A $Nav_1.4$ a vázizomban, míg a szívizomban a $Nav_1.5$ dominál. Amellett, hogy a fő funkciójuk az AP kiváltása, a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák megtalálhatóak a nem ingerelhető sejtek membránjában is, mint asztrociták, hasnyálmirigy béta sejtek, keratinociták, dendritikus sejtek, makrofágok, vörösvértestek, T sejtek és neutrofil granulociták. Ezekben a sejtekben a nyugalmi membránpotenciál kialakításán túl szerepük van a sejtmigrációban és -differenciációban.

A szerkezetükben hasonlóak, miszerint négy doménből álló, körülbelül 230 kDa méretű polipeptid lánc alkotja ezen ioncsatornák alfa, pórusformáló alegységét. Mind a négy domén (DI-DIV) hat transzmembrán hélixből, és az azokat összekötő intra- és extracelluláris hurkokból áll. A transzmembrán hélixeket S1-S6 jelzéssel látták el. Az S1-S4-ig tartó régió adja a feszültség szenzort (Voltage Sensor Domain = VSD), melyből az S4 hélix rendelkezik pozitívan töltött aminosavakkal (arginin vagy lizin minden harmadik helyen), ami emiatt membrán-depolarizáció hatására elmozdul az extracelluláris tér felé. A feszültség-szenzor S4 hélice összeköttetésben (S4-S5 hurok) áll a pórusal (Pore Domain = PD), amit az S5-S6 hélixek és az azokat összekötő extracelluláris hurok (P-hurok) alkotnak.

A Nav_1 csatornákat elkülöníthetjük biofizikai paraméterek és farmakológia alapján. A biofizikai paraméterek között vizsgálhatjuk az aktiváció és inaktiváció kinetikáját, ezeknek a feszültség-függését és az inaktivációból való visszatérés kinetikáját is.

Az egyik leggyakrabban használt Nav_1 gátlószer a tetrodotoxin (TTX), egy gömbhalból izolált cukorvázás neurotoxin, mely a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák pórusához reverzibilisen kötődik az extracelluláris oldalról. TTX szenzitivitás alapján az izoformák között megkülönböztethetünk arra nM-os koncentrációban érzékeny, szenzitív ($Nav_1.1-1.4, 1.6$ és 1.7), és arra μ M-os koncentrációban érzékeny, rezisztens ($Nav_1.5, 1.8$ és 1.9) populációt. Szelektív Nav_1 gátlószerként vannak a kúpcsigákból izolált GIIIA és GIIIC μ -conotoxinok, melyek a vázizom-specifikus $Nav_1.4$ szelektív gátlószerei. Ezeken kívül gyakran használják $Nav_1.7$ szelektív gátlására egy tarantulából izolált peptid inhibitort, a protoxin-II-t.

2.3 A glioblasztóma és az U-87 sejtvonal

A gliómák az agyállomány gliasejtjeiből eredeztethető tumorok, melyeknek több csoportja is ismert. A multiform glioblasztóma (GBM) jelentős életminőség veszteséssel járó daganatos betegség. Prognózisa rendkívül kedvezőtlen, mivel az átlagos túlélési idő a legjobb kezelésekre ellenére sem haladja meg a 15 hónapot. A klinikumban a klasszikus kemoterápiás szereket (temozolomid, ciszplatin, karmusztin) kombinálják sugárterápiával és műtéttel. Ezen kezelésekre elsősorban a célja és eredménye a „debulking” azaz a daganat térfogatának a csökkentése, így definitív, a daganat megszüntetésére irányuló terápiás kombinációra ugyan vannak kezdeti kutatások, de még mindig limitált eredményekkel kecsegtetnek. Így szükség van új terápiás szerekre, melyek hatékonyan fellépnek azon klinikai kihívásokkal szemben, melyeket a GBM kezelése okoz.

A glioblasztóma kutatásban leggyakrabban használt sejtvonal az U-87 MG, mely az Uppsala-87 Malignant Glioma rövidítése. A sejtvonal alapjául használt szöveti mintát 1966-ban vették egy 44 éves férfi páciens-től. Az U-87 MG sejtekre jellemző az epitél morfológia, valamint a diploidhoz közel álló hipodiploid genotípus. Az elmúlt több mint 50 év alatt valószínűsíthető, hogy bekövetkeztek mutációk a sejtvonalon, de arról nem található irodalmi adat, hogy az U-87 MG sejtek és a glioblasztóma között van-e invazivitásbeli különbség.

Egy új terápiás célpont lehet a GBM invazivitásához hozzájáruló $K_{Ca}1.1$ (más néven BK, Slo1 vagy MaxiK) ioncsatorna, mely külön splice variánssal (gBK azaz glióma BK), dominánsan kifejeződik ezen daganatos sejtek membránjában.

2.4 A $K_{Ca}1.1$ ioncsatorna szerepe a glioblasztóma inváziójában

A GBM invazivitását már több ioncsatorna fokozott működésével is kapcsolatba hozták. Ezek között van a Nav1.7, a feszültség-kapuzott kloridcsatornák családjába tartozó CIC-3 (ami maga H^+/Cl^- antiporter), és a $K_{Ca}1.1$. Az utóbbi kettőnél egy közös elmélet van az invazitás kialakulásának mechanizmusában, melynek alapja, hogy a sejteknek zsugorodniuk kell, hogy be tudják szűrni az agyállományt. A celluláris ozmoregulációs modell alapján a vízvesztés ionáramhoz társul, jellemzően kifelé irányuló kálium- és kloridáramhoz. Az előbbi nagy részét a $K_{Ca}1.1$, míg utóbbit a CIC-3 adja. A hipotézis alapján a $K_{Ca}1.1$ káliumáramához paralel társul az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése a kalciumraktár-függő csatornák (ORAI) működése által, így a kalcium/kalmodulin dependens protein kináz II (CAMKII) aktív lesz, ami citoskeletális változásokat okoz, ami a feszültség-függése miatt aktiválja a CIC-3 transzportert. Ezen kívül a CAMKII foszforilálja a CIC-3-at, így közvetlenül is aktiválja a kloridáramot.

A $K_{Ca1.1}$ -nek, valószínűsíthetően az előbb említett modell miatt, a GBM sugár- és kemoterápiás rezisztenciájához is köze van.

2.5 A $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna szerkezete és funkciója

A $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna egyesített nomenklatúrában használt nevén kívül BK, MaxiK és Slo1 néven is ismert. Az előbbi kettő a magas egyedi csatorna K^+ vezetőképességre utal, mely irodalom alapján 200-300 pS körüli tartományban mozog. Az utóbbi pedig a *Drosophila* slowpoke-hoz való hasonlóságot jelzi.

A $K_{Ca1.1}$, a többi K_{Ca} ioncsatornával ellentétben, kalcium-függésén kívül feszültség-kapuzott is; valamint leírták már a csatorna feszülés általi aktiválódását is. Mint a legtöbb feszültség-kapuzott ioncsatorna, a $K_{Ca1.1}$ is tetramer, azaz négy alfa alegység képezi a csatorna pórusát. Ezen alfa monomerek a KCNMA1 gén termékei. Hasonlóan az előbb már említett Na_V ioncsatornákhöz egy alfa alegység egy VSD-ből és egy PD-ből áll. A $K_{Ca1.1}$ azonban eltéréseket mutat a klasszikus feszültség-kapuzott ioncsatornák szerkezetéhez képest. Ilyen a VSD-ben az S0 hélix, ami a feszültség érzékelésén kívül, a kalcium érzékenységhez, és a béta alegység moduláció létrejöttéhez szükséges. A C terminális oldalon található a citoszólikus RCK1 és RCK2 domének, melyeken található 1-1 kalciumion kötőhely. Továbbá az RCK1 tartalmaz egy magnézium ion kötőhelyet is.

Ezen ioncsatorna számos emlős sejtben/szövetben kifejeződik, melyekben eltérő biofizikai, illetve farmakológiai tulajdonságokat mutat. Ennek a diverz viselkedésnek a háttérében a moduláló járulékos alegységek állnak. Jelenleg két típusát ismerjük a szabályozó alegységeknek: a béta- (β) és a gamma (γ) alegységeket. Az előbbieknél négy altípusát különböztethetjük meg ($\beta 1$ - $\beta 4$), melyek a KCNMB1-4 gének termékei, és az α alegységekkel 1:1 arányban tudnak asszociálódni. Szerkezetük hasonló, mivel kis fehérjék (méretük 20-30 kDa között van), melyek két transzmembrán hélixből (TM1 és TM2) és azokat összekötő nagy extracelluláris hurokból állnak. A béta alegységek komplexet képeznek a pórusképző alfa alegységekkel.

A béta alegységek a $K_{Ca1.1}$ csatorna biofizikai paramétereit a következőképpen befolyásolják: A $\beta 1$; mely többek között a simaizomban és vesében fejeződik ki; növeli a csatorna kalcium érzékenységét, így 10 μM intracelluláris szabad Ca^{2+} esetében az aktivációs V_{50} érték negatívabb tartományba tolódik (kb. -50 mV-tal). A $\beta 2$; mely a hasnyálmirigyben, lépben, vesében és petefészekben fejeződik ki, a $\beta 1$ -hez hasonlóan negatív tartományba viszi a csatornaaktiváció feszültségfüggését. Ezen kívül a $\beta 2$ az N terminális oldalon inaktivációs labdával rendelkezik, mely felelős a csatorna gyors (20-30 ms időállandó) és komplett inaktivációjáért, mely alacsony $[Ca^{2+}]_i$ során is bekövetkezik. A $\beta 3$ négy splice variánsal rendelkezik ($\beta 3a-d$), melyek leginkább a lépben,

hasnyálmirigyben és herékben fejeződnek ki. A $\beta 3$ alegységek a csatorna aktivációját nem befolyásolják, azonban, ha $\beta 3a-c$ alegység társul a $K_{Ca1.1}$ -hez, akkor az ioncsatorna nagyon gyors (~ 1 ms időállandóval), de inkomplett inaktiváción megy keresztül pozitívabb tesztpotenciálokra ($+100$ mV felett), amennyiben magas (legalább $10 \mu M$) az intracelluláris szabad Ca^{2+} szint. Végül, ha az agyban dominánsan kifejeződő $\beta 4$ asszociálódik az alfa alegységhez, akkor a csatorna feszültség-érzékenysége csökken, és az aktivációs V_{50} érték pozitívabb membránpotenciál értékekre tolódik.

A gamma alegységek ($\gamma 1-\gamma 4$) ~ 35 kDa nagyságú transzmembrán fehérjék, melyeket az LRRC26, -52, -55 és -38 gének kódolnak. A szerkezetük hasonló, miképpen egy transzmembrán doménből (TM), az N terminális részen egy extracelluláris, leucinban gazdag doménből (LRRD) és egy rövid intracelluláris C terminális farki részből állnak. Az LRRC26 ($\gamma 1$) expressziója heterológ expressziós rendszerben, HEK-293 sejteket alkalmazva, $120-140$ mV-tal tolta a csatorna konduktancia-feszültség függését (G-V görbe) a negatív, hiperpolarizáló feszültségtartományba. A gammák kifejeződése még szabad intracelluláris Ca^{2+} hiányában is elősegíti a $K_{Ca1.1}$ aktivációját nullától negatívabb membránpotenciálokra. Így a γ alegységek $K_{Ca1.1}$ -hez való társulása nagyban megváltoztatja a csatorna feszültségérzékelését, egy teljesen új ioncsatorna fenotípust létrehozva.

2.6 A $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna modulátorai

A $K_{Ca1.1}$ számos modulátorral rendelkezik. Ezek között vannak olyan szerek, melyek csak az alfa alegységeken keresztül hatnak, illetve olyanok, melyek a járulékos β alegységeken keresztül befolyásolják a csatorna működését. Az előbbiekhöz tartozik az általános K_v gátlószer, a tetraetilammónium (TEA), és a paxilline (Pax), melyek millimólos, illetve nanomólos koncentrációban gátolják az ioncsatornát. Az utóbbiak között számos farmakon van, ideértve skorpiótoxinokat (iberiotoxin, charybdotoxin, slotoxin stb.), a zsírsavakat (arachidonsav, dokozaheptaénsav, eikozapentaénsav stb.), szterán-vázis vegyületeket (17β -ösztradiol, tamoxifen, litokólsav stb.) és az etanol is. A következőkben azoknak a szereknek fogom részletesen ismertetni a hatásmechanizmusát, melyeket a kísérleteimben is használtam.

Litokólsav (LCA): Az epesavak közé tartozik, és fő feladata a zsírok szolubilizációja. Emellett aktiválja az epesav-szenzitív ioncsatornákat (BASIC), és a $K_{Ca1.1}$ -et is β alegység-függő módon, úgy, hogy ha $\beta 1$ társul az ioncsatornához, akkor a csúcsáram megnő.

Arachidonsav (AA): Többszörösen telítetlen, $\omega 6$ családba tartozó zsírsav, melynek fontos jelátviteli szerepe van gyulladási folyamatokban, mint másodlagos hírvivő. Ezen kívül számos ioncsatornára hat, így gátolja az Nav csatornákat, aktiválja a $Hv1$ és TRP csatornákat. A $K_{Ca1.1}$ -re

kifejtett hatása β alegység-függő: az AA alkalmazása lassítja a csatorna $\beta 2$ vagy $\beta 3$ alegységek által kiváltott inaktivációját és $\beta 1/\beta 2/\beta 3$ alegység kifejeződése esetén növeli a csúcsáramot .

Iberiotoxin (IbTx): A kelet-indiai vörös skorpió mérgéből izolált 37 aminosavból álló peptid, mely nM-os koncentrációban szelektíven és reverzibilisen gátolja a $K_{Ca1.1}$ csatornát, az ioncsatorna pórusának extracelluláris oldalához kötődve. Az IbTx gátlásának van β alegység függése is, miszerint, az $\alpha/\beta 4$ csatorna-komplexet még mikromólos koncentrációban sem gátolja, ha pedig $\beta 1$ társul az α alegységhez, akkor a disszociációs konstans (K_d) a ~nM-os tartományból a 0.1 μ M-1 μ M-os tartományba tolódik.

Paxilline (Pax): *Penicillium paxilli* nevű gomba termelte toxikus indol alkaloid, mely szelektíven és reverzibilisen gátolja a $K_{Ca1.1}$ -et már nanomólos koncentrációban is ($K_d \sim 10-50$ nM, $[Ca^{2+}]_{ic}$ függően). A Pax nagyobb affinitással kötődik a csatorna zárt állapotához, így a csatornablokk fordítottan arányos a P_O -val ($K_d=10$ nM, ha $P_O \approx 0$; $K_d=10$ μ M, ha $P_O \approx 1$).

Ditiotreitol (DTT): Biokémiai reakciókban használt redukálószer, mely a diszulfid kötések bontja. $\beta 2$ vagy $\beta 3$ kifejeződése során a farokáram kifelé irányuló egyenirányításért felelős, extracelluláris hurkok között kialakult, diszulfidhidakat bontja, mellyel megszünteti az egyenirányítást. Így mM-os koncentrációban extracellulárisan alkalmazva a DTT prominens befelé irányuló farokáramot okoz negatív membránpotenciálok.

3. CÉLKITŰZÉS

Doktori értekezésemben a feszültség-kapuzott kationcsatornák expresszióját vizsgáltam fiziológias és patológias környezetben. Ehhez két modellt alkalmaztam:

1.) Humán perifériás vérből izolált B limfociták adták a fiziológias állapotot. Itt a B sejtek Na_v ioncsatornáinak vizsgálatát tűztük ki célul, melyeknek expresszióját molekuláris biológiai módszerrel, részletes biofizikai karakterizálását patch-clamp technikával terveztük megvalósítani.

2.) A patológias állapot a glioblasztóma sejtek jelentették. A REMBRANDT („REpository of Molecular BRAin Neoplasia DaTa”) adatbázis alapján a KCNMA1 gén a GBM-es betegek csak ~10%-ában túlexpresszált, és a csatorna túlzott kifejeződése nem korrelál a betegek túlélési idejével. Ugyanezen adatbázis alapján a KCNMB3 gén expresszója mRNS szinten fokozott a magasabb grádusú és rosszabb prognózisú gliómáknál. Azonban arra nincs adat, hogy milyen β alegységek fejeződnek ki funkcionálisan, és alkotnak komplexet a $K_{Ca}1.1$ ioncsatornával a GBM membránjában. Így rövid távú célunk volt meghatározni az invazivitáshoz és sugárrezisztenciához hozzájáruló $K_{Ca}1.1$ ioncsatorna fenotípusát primer GBM sejteket és glioblasztóma sejtvonalat használva.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok

Az összes fogyóanyagot a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) vásároltuk, hacsak más forrást nem jelöltem meg.

4.2 Sejtek izolálása

4.2.1 Primer glioblasztóma (GBM) sejtek

A betegekből nyert GBM szövetmintákkal való kísérletezést az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB,IV/186-1/2022/EKU) engedélyezte. A diagnózist neuropatológus állapította meg WHO kritériumok alapján. Minden betegről írásos beleegyezést kaptunk. A tumormintákat sebészeti eltávolítása után HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) oldatba raktuk, és jégen tároltuk a szállítás ideje alatt. A szövetmintákat 1-es típusú kollagenázzal emésztettük 30 percen keresztül. Ezután homogenizáltuk 15 ml-es Dounce homogenizátorral majd Pasteur pipettákkal. Ezt a sejtszuszpenziót majd 70 µM átmérőjű sejtszűrőn (Corning®, Corning, NY, USA) folytattuk át, majd T75-ös sejtenyészítő flaskában tapasztottuk le 2 órán keresztül 10%-os FBS (fötális borjúsavó) tartalmú DMEM médiumot használva (37 °C és 5% CO₂) majd kétszer mostuk 1x-es PBS-ben (foszfátpuffer), mielőtt újra felvettük őket a sejtmédiumban. (A sejtek tisztaságát gliális fibrilláris acidikus protein jelölésével igazoltuk, és csak azokon a sejteken kísérleteztünk, melyek 90% feletti pozitivitást mutattak.)

4.2.2 Humán perifériás B sejtek

Minden nap, az elektrofiziológiai mérések előtt, reggel történt a perifériás vénás vérvétel, melyhez egészséges felnőttek donorokat (nincs krónikus betegség vagy gyógyszereszedés, N=8) választottunk. Naponta donoronként 25-30 ml vér került levételre, melyet nátrium-heparinos csövekben gyűjtöttünk össze. Ezek a donorok a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetének, valamint a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársai voltak.

Elsőnek a teljes vért kétszeresére hígítottuk HBSS-ben, majd a mononukleáris sejteket denzitásuk alapján szeparáltuk, melyhez Histopaque-1077 szeparáló oldatot és SepMate™ (STEMCELL™ Technologies, Vancouver, Kanada) szeparáló csöveket alkalmaztunk. Ezután a B limfocitákat a mononukleáris sejtek közül mágneses gyöngyös szeparálással izoláltuk (human Pan B cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) a gyártó által mellékelt leírás

alapján. A sejtszámot meghatároztuk Bürker-kamra segítségével, majd reszuszpendáltuk a pelletet 40 $\mu\text{l}/10^7$ sejt gáztalanított pufferben (PBS, 0.5% albumin és 2 mM EDTA). Ezután hozzáadtunk a biotin-konjugált antitesteket (CD2, CD3, CD4, CD14, CD15, CD16, CD34, CD56, CD61, CD235a és Fc ϵ R1a ellenes antitestek; 10 $\mu\text{l}/10^7$ sejt) és inkubáltuk 5 percig 4 °C-on. Miután lejárt az inkubáció 10⁷ sejtenként 30 μl puffert és 20 μl anti-biotin mágneses gyöngyöket adtunk a sejtekhez. 10 perc 4 °C-on történő inkubáció után MACS oszlopokkal (Miltenyi Biotec) szeparáltuk a B sejteket (negatív szelekció). Azokat a B sejteket, amelyeket nem használtunk fel patch-clamp mérésekhez, TRIzol™ reagensben vettük fel és -80 °C-on tároltuk az RT-qPCR kivitelezéséhez.

4.3 Primer GBM és U-87 GM sejtek tenyésztése

A primer és sejtvonala GBM sejteket T75-ös flaskákban tenyésztettük DMEM médiumban, melyhez 10% FBS-t, 1% glutamátot, 1% penicillin-sztreptomycin és 1% nem-esszenciális aminosavakat adtunk. A primer GBM sejteket 3 passzázs, míg az U-87 MG sejteket 10 passzázs erejéig használtuk. A sejteket sejtinkubátorban tartottuk 37 °C és 5% CO₂ beállítást alkalmazva. A sejtpasszázst sterilfülkében végeztük, amely a következőképpen történt: a GBM sejtekről Pasteur vagy 2ml-es szerológiai pipetta (VWR International, Radnor, PA, USA) segítségével eltávolítottuk, majd 1x PBS-es mosás után 1x tripszin-EDTA oldatot (0,05% tripszin, 0,02% EDTA) pipettáztunk a flaskába, és 2 percig inkubáltuk 37 °C-on. Miután felváltak a sejteket átraktuk őket 15 ml-es centrifugacsövekbe, és 5 percen keresztül fugáltuk őket 1200 RPM-en. A felülúszó leszívása után a sejteket felvettük a médiumban, és egy új sejttenyésztő flaskába helyeztük őket.

4.4 Csendesítés siRNS alkalmazásával

Az U-87 MG sejteket Gibco® Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) médiumban transzfektáltuk, mely tartalmazott 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ DharmaFECT™-et (Horizon Discovery, Lafayette, CO, USA) és 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ negatív kontroll (AccuTarget™ Negative Control siRNA, Bioneer, Daejeon, Dél-Korea) vagy célzottan KCNMA1, KCNMB1-3 ellenes siRNS-t. A sejteket 37 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül. A csendesítés sikerességét Western blottal ellenőriztük.

4.5 Elektrofiziológiai mérések

4.5.1 Mérési rendszer felépítése

Az elektrofiziológiai mérésekhez konvencionális patch-clamp technikát alkalmaztunk, teljes-sejt konfigurációban. A mérőrendszer egy Axopatch 200B (Molecular Devices, CA, USA) erősítőn alapul, mely Digidata 1550B (Molecular Devices) digitalizálón keresztül csatlakozik a számítógéphez, amin a Clampex 10.7 (Molecular Devices) program segítségével végeztük az adatgyűjtést. A sejtek kiválasztása és a mérőpipetta pozicionálása Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokió, Japán) mikroszkóp segítségével történt, mely rezgésmentes asztalon helyezkedett el, és Faraday-kalitka vette körül a zajszűrés érdekében. A sejteket CELLSTAR® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) Petri csészében helyeztük el, és letapadásuk után 2 ml kontroll extracelluláris oldattal töltöttük fel a Petri csészét. Az oldatcsere manuális, gravitáció alapú perfúziós rendszeren keresztül történt, melynél az áramlási sebesség ~0.2 ml/perc volt. A konstans folyadékszint megtartásához vákuumos elszívó rendszert használtunk. A perfundálás során bekövetkező junkciós potenciál okozta feszültséghiba kiküszöböléséhez a referencia elektródát külön edényben tároltuk melyet agar híddal (3 M KCl) csatlakoztattunk a mérőedényhez. A mérőpipetták elkészítéséhez GC 150F-15 boroszilikát üvegapillárisokat (Harvard Apparatus, MA, USA) és P-87 Flaming/Brown mikropipetta húzót (Sutter Instruments, CA, USA) használtunk. A pipetták ellenállása mérőoldattól függően 3-8 M Ω között volt.

4.5.2 Elektrofiziológiai mérések során használt oldatok

A B limfociták méréséhez az alábbi oldatokat alkalmaztuk:

Kontroll (extracelluláris) oldat: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz és 10 mM HEPES; pH=7,35 (NaOH-val titrálva)

Pipetta (belső) oldat: 145 mM KF, 5 mM Na-aszpartát, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂ és 1 mM CaCl₂; pH=7,22 (KOH-val titrálva)

Na⁺ mentes oldat (pozitív kontroll): 145 mM kolin-klorid, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz és 10 mM HEPES; pH=7,35 (kolin bázissal titrálva)

Magas K⁺ koncentrációjú extracelluláris oldat (MK, membránpotenciál mérésekhez): 150 mM KCl, 10 mM HEPES, 5,5 glükóz, 1 mM CaCl₂ és 1 mM MgCl₂; pH=7,35 (KOH-val titrálva)

A TTX-et a megfelelő koncentrációkban (5, 15, 50, 150 nM) a kontroll oldatban hígítottuk ki.

A glioblastóma sejtek méréséhez használt oldatok összetétele:

Kontroll (extracelluláris) oldat: 145 mM Na-aszpartát, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz és 10 mM HEPES; pH=7.4 (NaOH-val titrálva)

Szabad [Ca²⁺] mentes pipetta (belső) oldat: 145 mM KF, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂ és 1 mM CaCl₂; pH=7,22 (KOH-val titrálva)

1 μM szabad [Ca²⁺] pipetta (belső) oldat: 145 mM K-aszpartát, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 8,5 mM CaCl₂; pH=7,2 (Tris-el titrálva)

Magas (~10 μM) szabad [Ca²⁺] pipetta (belső) oldat: 145 mM K-aszpartát, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 9,8 mM CaCl₂; pH=7,2 (Tris-el titrálva)

K_{Ca}1.1 modulátorok a kontroll oldatban hígítottuk ki minden mérőnapon a következő koncentrációkban: AA (30 μM), LCA (75 μM), IbTx (~20 nM), Pax (1 μM), DTT (20 mM).

Az oldószereket, melyekben a törzsoldatokat készítettük el (dimetil-szulfoxid vagy etanol) 1 V/V%-ban hozzá adtuk a kontroll oldathoz a modulátorok tesztelése során. Hacsak másképp nem jelöltem, a mérések 1 μM szabad [Ca²⁺] pipetta (belső) oldat használatával készültek.

4.5.3 Feszültség- és áramprotokollok

B sejt mérések:

Feszültség-zár üzemmódnál általánosan -100 mV tartópotenciált alkalmaztunk, míg áram-zár üzemmódnál nulla nA áramot injektáltunk (I=0). A mintavételezést és a zajszűrést (erősítőbe beépített négy pólusú aluláteresztő Bessel szűrő) a Nyquist-szabálynak megfelelően választottuk ki, miszerint 20 kHz-en történt a mintavételezés és 5 kHz-re állítottuk be a Bessel szűrőt. A mérések szobahőn történtek. A biofizikai paraméterek feltérképezésére különböző feszültségprotokollokat használtunk, mint lépcsőprotokoll, I-V (aktiváció feszültségfüggése), SSI („steady-state inactivation”, inaktiváció feszültségfüggése) és inaktivációból való visszatérés vizsgálata.

Glioblasztóma mérések:

Általánosan -100 mV tartópotenciált alkalmaztunk. A mintavételezés 20 és 50 kHz-el történt. A mérések szobahőn történtek. A biofizikai paraméterek feltérképezéséhez lépcső és I-V protokollokat alkalmaztunk.

4.5.4 Az adatok kiértékelése

A patch-clamp adatok kiértékelése és ábrázolása, valamint a statisztikai analízis Microsoft Excel (Microsoft, WA, USA), Clampfit 10.7 (Molecular Devices, CA, USA) és Graphpad Prism7 (Graphpad, CA, USA) szoftverekkel történt. A nyers adatokat először „offline” digitálisan szűrtük Clampfitben 5 pontos boxcar függvényvel.

Az ioncsatorna modulátorok hatásának elemzéséhez minden esetben kiszámoltuk a maradó áramhányadokat (MÁH) a következő egyenlet alapján: $M\acute{A}H = I_{modul\acute{a}tor}/I_{kontroll}$, ahol az $I_{modul\acute{a}tor}$ a szaturált ionáram modulátor perfúzió során, míg az $I_{kontroll}$ a modulátor alkalmazást megelőző csúcsáram.

Az I-V adataiból elsőnek G-V görbékét készítettünk, melyhez a konduktanciákat a következő egyenlet alapján kaptuk meg: $G = I/(V_{parancs} - V_{reverz})$, ahol a G a konduktancia, I a csúcsáram, $V_{parancs}$ a parancsfeszültség és V_{reverz} az egyensúlyi (reverzál) potenciál. A V_{reverz} értékét a használt mérőoldatok összetétele alapján a Nernst egyenlettel határoztuk meg ($V_{reverz} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[X]_{EC}}{[X]_{IC}} \right)$; ahol R az egyetemes gázállandó, T a hőmérséklet Kelvinben, z az ion töltése, F a Faraday állandó, valamint $[X]_{EC}$ és $[X]_{IC}$ az adott ion koncentrációja extra- és intracellulárisan). A G-V görbék elkészítéséhez az összes parancsfeszültségen kapott konduktancia adatot a legnagyobb konduktanciára normáltuk ($G/G_{max} =$ nyitási valószínűség). Az SSI adatok ábrázolásához az I/I_{max} -ot (azaz az aktiválható csatornahányadot) kiszámoltuk, ahol az I a csúcsáram az adott impulzus során, míg az I_{max} a csúcsáram az első impulzus során. A G-V és SSI görbékét a Boltzmann egyenlettel ($Y = 1/(1 + \exp((V_{50} - V_{parancs})/k))$); ahol a k a görbe meredekségét jellemző állandó) illesztettük meg a V_{50} értékek meghatározásához.

Az inaktivációból való visszatérés időállandóját (τ_v) a következőképpen kaptuk meg: az impulzuspár második tagját (I) az első tagjára (I_{max}) normáltuk minden egyes impulzuspárnál (I/I_{max} =visszatért csatornahányad), majd a kapott görbét egyfázisú exponenciális egyenlettel illesztettük meg ($Y = A \left(1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau_v} \right) \right) + Y_0$; ahol A görbe amplitúdója, t az impulzusok között eltelt idő, τ_v a visszatérés időállandója és Y_0 az I/I_{max} t=0-nál). A $K_{Ca1.1}$ áram inaktivációját jellemző időállandót (τ_i) a következő egyenlettel kaptuk meg: $Y = A \left(\exp \left(-\frac{t}{\tau_i} \right) \right) + C$; ahol a C a szaturáció értéke.

4.6 Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

A teljes-sejt RNS, beleértve a hírvivő RNS-t is, TRIzol™ reagens segítségével izoláltuk a sejtekből. Az RNS minták tisztaságát UV spektroszkópiával (NanoDrop 2000 spektrofotométer) ellenőriztük vissza, melynek során kizárólag azokat a mintákat fogadtuk el, melyeknek az A260/A280 aránya 1.8 és 2.1 között volt. Ezután az RNS mintákat az qPCR mérések kivitelezéséig -80 °C-on tároltuk.

4.6.1 GBM sejtek

A komplementer DNS-t (cDNS) Superscript III™ Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) használatával készítettük el. A PCR-hez PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és génspecifikus primereket használtunk. Pozitív kontrollnak a GAPDH-t használtuk. A reakciót QuantStudio 3 készüléken futtattuk a következőképpen: 40 ciklus denaturáció (30 mp/ciklus) 95 °C-on, primertapadás 55 °C-on 45 másodpercig és meghosszabbítás 72 °C-on 60 másodpercig. Az adatok kiértékeléséhez QuantStudio Design and Analysis szoftvert használtunk.

4.6.2 B sejtek

Az Nav ioncsatornák mRNS szintű expressziójának kvantifikálásához elsőnek az RNS mintákból cDNS-t készítettünk, reverz transzkriptáz enzimet tartalmazó kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Vilnius, Litvánia) segítségével. Az RT-qPCR-hez LightCycler 480 SyBR Green I Master mix-et (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) és génspecifikus primereket (10 µM, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) alkalmaztunk. A reakciót LightCycler 96 RT-qPCR (Roche Diagnostics) készüléken futtattuk. A PCR ciklusok a következőképpen néztek ki: az 10 perc inkubálás 95 °C-on, majd 40 darab 10 másodperces ciklus volt 95 °C-on, végül 1 perc 60 °C-on. Pozitív kontrollnak a 36B4 gén által kódolt acidikus riboszómális foszfoprotein P0-t (RPLP0) használtuk. Minden mérést N=2 szer hajtottunk végre. A küszöb ciklust (Ct) a mérőműszer határozta meg, és minden 35 feletti értéket zajnak tekintettünk.

4.7 Western blot (WB)

Az U-87 MG sejtekből fehérjét izoláltunk Tris lízis puffer (25 mM merkaptotanol, 1 µl/ml Tween® 20, 10 µl/ml proteáz inhibitor és 50 mM Tris; pH=7,5) és sejtszonikátor segítségével. Az izolálás során a sejteket/mintákat jégen tartottuk, és utána a WB-hoz fel nem használt részt -80 °C-on

tároltuk 1 héten keresztül. A WB-hoz elsőnek a felhasználni kívánt fehérjemintát centrifugáltuk 13200 RPM-en és 4 °C-on 20 percen keresztül, majd a felülúszó leszívása után felvettük őket töltőpufferben (6x LB), és a mintát denaturáltuk 98 °C-on 10 percen keresztül. 120-120 µg denaturált fehérjét töltöttünk be a 12%-os ProSieve 50 (Lonza, ME, USA) akrilamid gélbe, melyet elektroforetizáltunk (80 mV 20 percig, majd 120 mV 90 percig). Ezután a gél PVDF (polivinilidén-fluorid) membránra transzferáltuk (100 mV, 90 perc), majd blokkoltuk a membránt 1 órán keresztül 5%-os tejpor TBST-ben (TBST = Tris-pufferelt sóoldat + 0.1% Tween® 20). Blokkolás és háromszoros TBST mosás után következett az éjszakai inkubálás az elsődleges antitestekkel 1:1000 hígításban, 4 °C-on. A következő napon, ismét háromszoros TBST mosás után, történt a másodlagos antitesttel való inkubálás szobahőn, 2 órán keresztül. Az előhívás előtt a membránt SuperSignal® West Pico kemilumineszcens szubsztráttal kezeltük a gyártó által megadott protokoll alapján. A kemilumineszcencia detektálásához Alpha Innotech FluorChem Q MultiImage III-at alkalmaztunk.

4.8 Sejtszinkronizáció és áramlási citometria

Az U-87 MG sejteket M fázis metafázisába 4 µg/ml (10 µM) kolhicinnel, G0/G1 fázisba pedig szérummentes DMEM-mel szinkronizáltuk. A kezelések 24 órán keresztül folytak 37 °C-on és 5% CO₂-n. A szinkronizálás sikerességét propidium-jodidos (PI) festéssel igazoltuk, melyhez először a kezelt és kezeletlen sejteket 80%-os etanollal permeabilizáltuk 20 percen keresztül szobahőn, majd 2 µg/ml PI-t adtunk a sejtekhez és 10 percig inkubáltuk őket szintén szobahőn az áramlási citometriás mérésekig. Az adatokat BD FACS Aria III (BD Biosciences, NJ, USA) áramlási citométerrel nyertük ki, 561 nm excitációs és 610/20 nm emissziós szűrőt használva. Az adatok kiértékeléséhez FlowJo V10 (BD Biosciences) programot használtunk.

4.9 Statisztikai analízis

Általánosan, az adatokat átlag ± SEM-ként tüntettük fel. A statisztikai analízist GraphPad Prism 7 programmal végeztük. A statisztikai értékelés során először elvégeztük a normalitás tesztet (D'Agostino-Pearson), majd kétmintás kétoldali t-próbát vagy egyutas variancia-analízist alkalmaztunk Tukey's post-hoc teszttel a normál eloszlást mutató mintáknál, és Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis teszteket alkalmaztunk a normál eloszlástól eltérő eloszlást mutató mintáknál. A glioblastóma modulátorainak hatását Wilcoxon próbával analizáltuk. A szignifikanciaszint (α) 5% volt.

5. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

5.1 Funkcionális Nav ioncsatornák jelen vannak a humán B sejt membránjában

5.1.1 Elektrofiziológiai és molekuláris biológiai adatok bizonyítják a Nav ioncsatornák expresszióját humán B sejtekben

Habár számos tanulmány alapján feltételezték már a feszültség-kapuzott nátriumcsatornák jelenlétét a humán B sejtek membránjában, közvetlen elektrofiziológiai adatok idáig ezt még nem bizonyították. A kutatásunkban elektrofiziológiai és molekuláris biológiai módszerekkel azonosítottuk a Nav ioncsatornák funkcionális expresszióját a humán B sejtek membránjában. A patch-clampel mért sejtek mintegy 40%-a mutatott befelé irányuló áramot, mely Na^+ mentes oldatra megszűnt, valamint karakterisztikusan Nav csatornákra jellemző feszültségfüggést mutatott. Ezzel ellentétben a T sejtek csupán 3%-án találtak TTX szenzitív nátriumáramot (habár a referált tanulmányban nem használtak protokollokat direkt a Nav csatornák kimutatására, így a tényleges arány magasabb is lehet).

A vizsgált biofizikai paraméterek alapján nem tudjuk egyértelműen azonosítani a sejtmembránban jelenlévő Nav csatornákat. A feszültség-kapuzott ioncsatornák, így köztük a Nav csatornák, kapuzása függ az expressziós rendszertől, ahogy ezen paramétereket befolyásolja a sejtmembrán lipidösszetétele és a járulékos alegységek kifejeződése is. Így a legtöbb, általunk is vizsgált, biofizikai paraméterek értékei nagy átfedést mutatnak a különböző Nav ioncsatornák között. Például adataink alapján az aktivációs V_{50} érték $-20,8 \pm 1,9$ mV volt, mely a legtöbb Nav csatornánál publikált tartományba esik. Egyedül a $\text{Nav}1.9$ -nél írtak le negatívabb aktivációs V_{50} értéket, mely körülbelül -40 mV volt. Az inaktivációból történő visszatérés időállandója (τ_v) értékei is nagy szórást mutattak méréseink során (7,5-42 ms), ami alapján több Nav csatorna együttes membránjelenlétét feltételezzük. A biofizikai paraméterek közül az utóbbi érték alapján lehet jobban elkülöníthetőek a Nav csatornák, mivel ismertek gyorsan visszatérő (például $\text{Nav}1.3$ és 1.4 ; $\tau_v=8-20$ ms) és lassan visszatérő ($\text{Nav}1.7$; $\tau_v \approx 150$ ms) izoformák.

RT-qPCR-rel TTX-szenzitív nátriumcsatornákat kódoló (SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN8A és SCN9A) valamint TTX-rezisztens csatornát kódoló (SCN11A) gének expresszióját mutattuk ki. Ezek közül domináns kifejeződést mutatott a TTX szenzitív $\text{Nav}1.3$, 1.4 és 1.7 ioncsatorna, míg a TTX rezisztens $\text{Nav}1.9$ csatorna alacsonyabb mRNS szinttel volt jelen. A TTX-szenzitív- és rezisztens Nav csatornák együttes jelenléte a membránban magyarázhatja a farmakológiai eredményeinket, miszerint a TTX 150 nM-os koncentrációban nem okozott akkora gátlást, mint vártuk volna, ha kizárólag TTX-szenzitív feszültség-kapuzott nátriumcsatornák lettek volna jelen a B sejt membránjában. A Hill-egyenlet, 150 nM TTX MÁH értékei alapján, 84 nM-os IC_{50} értéket adott, mely lényegesen magasabb

a TTX-szenzitív Nav csatornák publikált IC₅₀ értékeinél. Ezen érték szintén alátámasztja a TTX-rezisztens Nav csatornák alacsonyabb szintű membránexpresszióját. Ismert, hogy az ioncsatornák expressziója változik a sejtek differenciációja során. A K⁺ csatornák kifejeződési mintázata például változik a T és B sejtekben, valamint a dendritikus sejtekben érés során a Nav csatornák kifejeződésnek csökkenésével egyidejűleg a K_v csatornák expressziójának fokozódását figyelték meg. Egy későbbi publikációban kimutatták, hogy a Nav magas expressziója a dendritikus sejtek egy kisebb alpopulációjára (CD1a⁺) korlátozódik, mely tovább bizonyítja az ioncsatornák kifejeződésének és a sejt-differenciációnak a szoros kapcsolatát. A sejt-differenciáción kívül sejt-sérülés is kiválthat expressziós mintázatváltozást. Asztrocitákon mechanikai stimulációval kiváltott reaktív gliózis során TTX-szenzitív Nav csatornák helyét TTX-rezisztens csatornák vették át. Mivel a tanulmányunkban nem választottuk alpopulációkra a B sejteket, a vizsgált populációnk nagyon heterogén volt, ami magyarázhatja a magas variabilitást a TTX érzékenységben. Ez a heterogenitás állhat a mögött is, hogy a sejteknek csak egy részén láttunk Nav áramot. A patch-clampmel detektálható nátriumáram lehet, hogy a B sejtek csak egy bizonyos alpopulációján fedezhető fel. A feszültség-kapuzott nátriumcsatornákat funkcionálisan expresszáló alpopuláció(k)nak felderítése fontos feladat a jövőben, a Nav csatornák funkciójának megismerése érdekében.

5.1.2 A Nav csatornák hozzájárulnak a nyugalmi membránpotenciál kialakításához

Megmértük a B sejtek membránpotenciálját I=0 áram-zár üzemmódban, a Nav csatornák potenciális kanonikus funkcióját vizsgálva, és azt tapasztaltuk, hogy a nátrium mentes oldat perfúziója reverzibilis hiperpolarizációt okozott, az eleve pozitívabb nyugalmi membránpotenciállal rendelkező B sejteknél. Irodalmi adatok alapján a limfociták nyugalmi membránpotenciálja széles intervallumba esik: beszámoltak negatív ($E_m=(-)70 - (-)60$ mV), átmeneti ($E_m \approx -40$ mV) és pozitívabb ($E_m=(-)12 - (-)7$ mV) membránpotenciál értékekről is különböző publikációkban. Ennek a variabilitásnak az oka lehet az alkalmazott mérőmódszerek különbözősége. Szeparálatlan perifériás limfocita populáció vizsgálata során a B sejtek alacsony aránya miatt a pozitívabb nyugalmi membránpotenciál értékek kevésbé gyakoriak. Habár a SSI görbék alapján az általunk kapott nyugalmi membránpotenciálon ($E_m = -6,8 \pm 1,5$ mV) a legtöbb Nav csatorna inaktivált állapotban van (0 mV-on a Nav csatorna elérhetőség $0,05 \pm 0,02$ volt), a magas membránimpedancia és az alacsony citoplazma térfogat miatt kevés ioncsatornának az aktivációja is okozhat szignifikáns membránpotenciál változásokat. Elméletileg a Na⁺-mentes extracelluláris oldat közvetett módon is okozhatna membránpotenciál-változásokat elektrogén transzport mechanizmusok módosításán (például Na⁺/Ca²⁺ cserélő) keresztül. Ezt a lehetőséget vizsgálták dendritikus sejteken, ahol a Nav1.7-et lecsendesítve a nyugalmi

membránpotenciál hiperpolarizálódott, és inszenzitív lett az extracelluláris Na^+ koncentrációra, ami azonban a Nav csatornák közvetlen szerepére utal, így mi is ezt a mechanizmust valószínűsítjük.

A feszültség-kapuzott Na^+ csatornák élettani funkciója még nem teljesen ismert a limfocitákban. Előző tanulmányokban már utaltak a csatornák potenciális kanonikus funkciójára. Jurkat T sejteken a Nav csatornák jelenléte a sejtmigrációhoz köthető, mivel Matrigel inváziós esszé esetében a TTX alkalmazása szignifikánsan csökkentette a migrációt. Továbbá a Nav1.5 szerepet játszik a CD4^+ T sejtek érési folyamatának pozitív szelekciójában, mert ezen ioncsatornák funkciójának és expressziójának gátlása a szelekciós folyamatokat szignifikánsan befolyásolta. Azon Nav izoformákról, melyek kísérleteinkben RT-qPCR-rel magas expressziót mutattak a B sejtekben, még nincs limfocitákat érintő funkcionális tanulmány.

Az immunsejtek sok hasonlóságot mutatnak az ioncsatorna profiljukban a sejt differenciáció során. Például a Kv1.3 csatorna, mely kifejeződik makrofágokban, dendritikus sejtekben, T sejtekben és B sejtekben is, expressziója megnő a sejtaktiváció során a legtöbb szubpopulációban. A K^+ csatornák működése, a membrán hiperpolarizációja és így az elektrokémiai hajtóerő fenntartása révén, fontos a sejtaktivációhoz szükséges Ca^{2+} beáramláshoz. Elképzelhető, hogy a CD1a^+ dendritikus sejtekhez hasonlóan, a B sejtekben is, a Nav csatornák működése a membrán depolarizációja révén megakadályozza a szükségtelen sejtaktivációt.

Figyelembe véve az alacsony átlagos Nav csúcsáramot ($-57,0 \pm 12,6 \text{ pA}$), lehetséges, hogy ezen ioncsatornáknak nem-kanonikus funkciói is vannak a B sejtekben, melyeknek nincs köze az ionáramláshoz és a membránpotenciál-szabályozáshoz. Ilyen funkciókat írtak le a neurális Kv2.1 és Kv2.2 csatornáknál is, melyek csomópontot alkotva a sejtmembrán és az endoplazmatikus retikulum között, szerepet játszanak a membrán trafficking-ben. Hasonlóan, a Kv1.3 csatorna nem-kanonikus funkcióját írták le vaszkuláris simaizom sejtekben, melyekben a proliferációhoz a kapuzási mechanizmus működése elégséges volt a K^+ ionok áramlása nélkül. Habár a nem-kanonikus funkciókat a tanulmányunk alapján nem tudjuk kizárni, a Na^+ -mentes oldat perfúziója során bekövetkezett erős hiperpolarizáció alapján a Nav csatornák kanonikus funkciója valószínűbb a B sejtek esetében.

5.2 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}/\beta 3$ komplexek funkcionálisan kifejeződnek a glioblastóma sejtmembránban

Ebben a tanulmányban kimutattuk, hogy a glióma sejtmembránjában a $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ a domináns K^+ csatorna, mely expressziójának sejtciklusfüggése van, de a hozzá asszociálódó $\beta 3$ alegységnek nincs. Habár a $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ számos szövetben kifejeződik, a járulékos béta/gamma alegység expresszió függ a szöveti mintázattól. A $\beta 3$ ritkábban fejeződik ki egészséges szövetben, és eddig csupán a herében,

hasnyálmirigyben és lépben írták le kifejeződését fiziológias esetben. Így a $\beta 3$ expresszió releváns lehet a különböző betegségek diagnózisában és terápiájában is. Például, a $\beta 3$ fehérjét kódoló gén (KCNMB3) túlzott kifejeződése rosszabb prognózissal jár a GBM-es betegeknél, valamint emelkedett $\beta 3$ expresszióról számoltak be fibroblaszt-szerű szinovocitáknál (FLS), reumatoid arthritisz esetében is. Továbbá a $\beta 3$ alegységek funkcionális kifejeződése a GBM membránban, akár sejt felszíni markerként is szolgálhat a jövőben, a magas grádusú gliómák esetében.

5.2.1 A $\beta 3$ a domináns járulékos alegység

A $K_{Ca}1.1$ $\alpha/\beta 3$ komplexek funkcionális kifejeződését a GBM sejtmembránban az alábbi pontok támasztják alá:

- 1. A KCNMB3 ($\beta 3$ alegység) transzkript kifejeződött mind a GBM mind az U-87 MG sejtekben, és utóbbiakban magas kópiaszámot detektáltunk PCR-rel, hasonlóan a KCNMA1-hez (α alegység).**
- 2. A makroszkópos áram emelkedett 30 μ M AA perfúzióra, és KCNMB3 csendesítésre ez az áramemelkedés szignifikánsan csökkent.**
- 3. Gyors és inkomplett inaktiváció jelentkezett 10 μ M szabad intracelluláris kalciumot alkalmazva +180 mV-on.**
- 4. A farokáram megjelenése -100 mV-on 20 mM-os DTT kezelés során.**
- 5. Az ionáram szenzitivitása ~20 nM IbTx-re egybevág a $K_{Ca}1.1/\beta 3$ komplexre publikált értékekkel .**

Ezen öt pont együttes jelenléte utal a $K_{Ca}1.1/\beta 3$ komplexek funkcionális kifejeződésére a GBM sejtmembránban. Mivel az eredményeink külön-külön más β alegységek kifejeződésénél is előfordulhatnak, ezért ezeknek az ismertetésével lentebb foglalkozunk.

A $\beta 1$ alegység, mely legfőképpen a simaizomban került leírásra, epesavak által aktiválhatóvá teszi az ioncsatornát. A mi kísérletünkben 75 μ M LCA aktiválta ugyan az ioncsatornát a sejtmembrán sejtjeinél, de több adat is a kifejeződése ellen szól. Először is, qPCR-rel nem tudtunk KCNMB1 terméket detektálni sem a primer sejteknél sem az U-87 MG sejteknél. Ezen kívül WB-tal sem adott jelet a $\beta 1$ ellenes antitest, holott a kontroll CHO sejtekkel igazoltuk az antitest hatékonyságát, valamint a KCNMB1 siRNS-sel való csendesítésével sem sikerült szignifikánsan változtatni az LCA hatást. Annak a tudatában, hogy az epesavak más ioncsatornákon is hathatnak (például ismertek az epesav-szenzitív „BASIC” csatornák), valószínűbb, hogy a litokólsav nem $K_{Ca}1.1$ -en keresztül növelte meg a

csúcsáramot a tanulmányunkban. A $K_{Ca1.1}/\beta 1$ komplex továbbá meglehetősen rezisztens az IbTx-ra (publikált IC_{50} értékek 65-370 nM-ig terjednek, ami ellentmond az általunk kapott MÁH értékeknek), ami tovább csökkenti a $\beta 1$ kifejeződésének valószínűségét. Végül a $\beta 1$ -hez asszociált $K_{Ca1.1}$ csatornáknak van farokárama negatív membránpotenciálon, amely ellentmond a mi adatainknak.

A $\beta 2$ alegység a qPCR eredmények alapján kifejeződik mRNS szinten a glioblasztóma sejtekben, és WB-tal is adott jelet a $\beta 2$ -ellenes antitest, valamint KCNMB2 csendesítésre csökkenő tendenciát mutatott az AA áramnövelő hatása. A fentiek alapján a $\beta 2$ kifejeződik a GBM membránjában, azonban a $\beta 2$ expresszió komplett inaktivációhoz vezet már alacsony citoszólikus Ca^{2+} -koncentrációnál és 100 mV-os depolarizációnál is, melyet nem detektálunk a patch-clamp méréseink során. A teljes inaktivációt még 10 μM intracelluláris szabad kalcium esetében sem láttuk. Ennek a komplett inaktivációnak a hiánya nem feltétlenül zárja ki a $\beta 2$ membránjelenlétét, mivel egy α alegységhez négy β asszociálódhat, így a különböző béta alegységek aránya befolyásolhatja az általunk detektált biofizikai paramétereket is. A sztöchiometriát a következőkben érdemes lesz figyelembe venni, hiszen több $\beta 2$ alegység (a gyors és komplett inaktiváció miatt) csökkent hajtóerőt jelent a kalcium influxra, míg több $\beta 3$ alegység kifejeződés (az inkomplett inaktiváció miatt) elnyújtott kalcium beáramlással járna.

A $\beta 4$ alegység a domináns a központi idegrendszerben, így a glioblasztómában várható volt a kifejeződése. Transzfektált sejteknél a $\beta 4$ alegység rezisztenssé teszi a $K_{Ca1.1}$ csatornát az IbTx-re, így a kapott adataink alapján a $\beta 4$ kifejeződése megkérdőjeleződik. Ennek ellenére vannak publikációk, melyek szerint IbTx szenzitív sejtek is kifejezhetik ezt az alegységet, melynek háttérében a sztöchiometria mellett a $\beta 4$ alegységek membrán processzálása állhat, de ezekre még tényszerű adat nem áll rendelkezésünkre.

A gamma alegységek kifejeződése valószínűtlen a GBM membránjában, hiszen a $K_{Ca1.1}/\gamma$ komplexek már alacsony intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnál is nagyon negatív membránpotenciálokra nyitnak (akár -150 mV), míg a GBM és U-87 MG $K_{Ca1.1}$ ioncsatornái pozitívabb tesztpotenciálokra kezdtek nyitni.

Összesítve a $K_{Ca1.1}/\beta 3$ komplexek domináns kifejeződését feltételezzük glioblasztómában, amellett, hogy $\beta 2$ alegységek is előfordulhatnak alacsonyabb számban.

5.2.2 A $K_{Ca1.1}$ expresszió emelkedett az M fázisban a sejtciklus analízis alapján

Mint ismert, egyes ioncsatornák expressziója változik a sejtciklus során. A K^+ csatornáknak nagy szerepe van a sejtciklus progresszióban a membránpotenciál szabályozása révén, hiszen a K^+ permeabilitás változása (a K^+ negatív Nernst potenciálja miatt), emelkedés (azaz csatornanyitás) esetén hiperpolarizálja, csökkenés esetén pedig depolarizálja a membránt. Általánosan, a G1/S fázis határán magas K^+ csatorna aktivitást írtak le, míg G2/M fázisban a káliumcsatornák alacsony membránaktivitása figyelhető meg. Ezzel párhuzamban a Na_V csatornák expressziója az M fázisban emelkedett. Egy korábbi tanulmányban humán mezenchimális őssejtek $K_{Ca1.1}$ ioncsatornáinak sejtciklusfüggését vizsgálták, és adataik alapján a $K_{Ca1.1}$ pozitív sejtek aránya csökkent volt a G2/M fázisban az éheztetéssel G_0 fázisba szinkronizált populációhoz képest. Ezzel ellentmondanak a mi adataink, mivel a kolhicinnel kezelt (M fázis-dúsított) U-87 MG populációnál a csúcsáram és az áramsűrűség is szignifikánsan nagyobb volt a szinkronizálatlan populációhoz képest, valamint ez az áramemelkedés Pax-szenzitív $K_{Ca1.1}$ áramnak bizonyult. Hasonlóan a mi adatainkhoz, megtermékenyítetlen egér oocitában található magas konduktanciájú K^+ csatorna - mely a Ca^{2+} -érzékenység és charybdotoxin - inszenzitívitás alapján nem biztos, hogy $K_{Ca1.1}$ - aktivitása szintén magasabb volt az M fázisban.

Hogy miért fontosak a káliumcsatornák a sejtciklus progresszióban, arra több magyarázat is felmerült. Először is, a mitózishoz a sejt volumen (így a nyomás) tranziens csökkenése szükséges, melyben a kifelé irányuló káliumáramot adó ioncsatornák szerepet játszanak. Leírták, hogy a medulloblastóma sejtekben a $K_V10.2$ csatorna szerepet játszik a sejtosztódáshoz szükséges sejtterefogat csökkentésben. A sejtméret-proliferáció összefüggését glióma sejteken is nézték, ahol ioncsatornák gátlásával és a tenyésztő médium ozmolaritásának (így a sejt volumen) változtatásával a proliferációs ráta is változott, úgy, hogy a sejtméret-osztódás görbéje harang alakot vett fel. Egy magyarázat a haranggörbe kialakulására, a makromolekuláris tömörülés elmélet, ami szerint a sejt ciklus szabályozásához szükséges makromolekulák konformációja és aktivitása függ a hidratáltsági állapotuktól. A modell alapján a molekulák aktivitása Boltzmann eloszlást követ, és mivel ez az aktivitás jelenthet proliferációs ráta növekedést és csökkenést is, így szükségszerűen kialakul egy térfogat intervallum, ahol a sejtosztódás optimális.

Ezen kívül a K^+ csatornáknak fontos szerepük van a kalciumjel kialakításban, a hajtóerő biztosításával. Így egyes káliumcsatornák specifikus gátlásával sejt ciklus blokáddá érhető el, ami csökkent proliferációhoz vezet. Ezen ioncsatornák közé tartozik a $K_V1.3$, $K_V10.1$, $K_V11.1$ és a $K_{Ca3.1}$ is. Továbbá azt találták, hogy a K^+ konduktancia nem is mindig szükséges a sejt ciklus progresszióhoz, a káliumcsatornák nem-kanonikus funkcióit feltételezve. Ilyen nem-kanonikus funkciót találtak a

Drosophila EAG csatornánál, ami a humán $K_v10.1$ ortológja. A csatorna pórusában egy aminosavat elmutálva létrehoztak egy nem-konduktív ioncsatornát, melynek expressziója a vad típusú EAG csatornához hasonló módon növelte a proliferációs rátát. A fenti szerepek közül, a glioblasztóma $K_{Ca}1.1$ -nek ismert az ozmoregulációs szerepe, így ez is magyarázhatja az M fázisban látott magasabb $K_{Ca}1.1$ áramot.

Farmakológiai eredményeink alapján, az alfa alegységgel ellentétben, a béta alegység expressziója nem változott a sejtciklus függvényében, mivel $30 \mu M$ AA áramnövelő hatása nem tért el szignifikánsan a szinkronizált és a szinkronizálatlan populációk között. Mivel a $\beta 3$ ugyanúgy jelen van az M fázisban, ezért a glioblasztóma $K_{Ca}1.1$ csatornák béta alegység-függő, szövetspecifikus gátlása egy jövőbeli potenciális terápiás lehetőséget kínál.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Disszertációmban a feszültség-kapuzott kationcsatornák membránexpresszióját vizsgáltam fizioiógias és patológiás állapotokban. A fizioiógias állapotot az egészséges, krónikus betegségben nem szenvedő, alanyok B sejtjei, míg a patológiás állapotot GBM-es betegek mintái és az U-87 MG sejt vonal adták.

A B sejteken elsőként karakterizáltuk a feszültség-kapuzott nátriumcsatornákat. Molekuláris biológiai és elektrofizioiógiai adataink alapján TTX-szenzitív és rezisztens N_{aV} csatornák egyszerre vannak jelen és funkcionálnak a B sejtek membránjában. Eredményeink alapján e csatornák kanonikus funkciója a valószínű, azaz a nyugalmi membránpotenciál kialakításában és szabályozásában játszanak szerepet. Mivel még mindig keveset tudunk a nátriumcsatornák szerepéről az immunsejtek működésében, ezért a N_{aV} csatornák funkcionális jelenlétét érdemes lehet a jövőben figyelembe venni ezen sejtek farmakológiai és funkcionális vizsgálata során. Tovább vizsgálva, hogy a B sejtek milyen alpopulációin jelenik meg a N_{aV} csatorna, megalapozhatja az immunfunkciók szelektív farmakológiai modulálását.

A glioblasztóma sejteken azt találtuk, hogy a $K_{Ca1.1}$ ioncsatorna funkcionális komplexeket alkot a $\beta 3$ alegységgel a sejtmembránban. A GBM sejtek $\beta 3$ expressziója a jövőben kemoterápiás célpont lehet, hiszen a központi idegrendszerben leginkább a $\beta 4$ alegység fejeződik ki, így a $K_{Ca1.1}/\beta 3$ komplexek gátlása szövetspecifikus lenne a glioblasztómára. A $\beta 3$ expresszióját a malignus glioblasztóma sejtek markereként is alkalmazhatnák a jövőben, mely nem csak a terápiában, de a diagnosztikában is segítséget nyújtana.



Nyilvántartási szám: DEENK/140/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fehér Ádám

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fehér, Á.**, Pócsi, M., Papp, F., Szántó, G. T., Csóti, Á., Fejes, Z., Nagy, B. J., Nemes, B. Á., Varga, Z.: Functional Voltage-Gated Sodium Channels Are Present in the Human B Cell Membrane.
Cells. 11 (7), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11071225>
IF: 6
2. **Fehér, Á.**, Pethő, Z., Szántó, G. T., Klekner, Á., Tajti, G., Batta, G., Hortobágyi, T., Varga, Z., Schwab, A., Panyi, G.: Mapping the functional expression of auxiliary subunits of KCa1.1 in glioblastoma.
Sci. Rep. 12 (1), 1-14, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26196-w>
IF: 4.6

További közlemények

3. Szántó, G. T., **Fehér, Á.**, Korpos, É., Gyöngyösi, A., Kállai, J., Mészáros, B., Óvári, K., Lányi, Á., Panyi, G., Varga, Z.: 5-Chloro-2-Guanidinobenzimidazole (ClGBl) Is a Non-Selective Inhibitor of the Human HV1 Channel.
Pharmaceuticals (Basel). 16 (5), 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16050656>
IF: 4.6 (2022)
4. Kovács, Z. M., Óvári, J., Dienes, C., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Horváth, B., **Fehér, Á.**, Varga, Z., Szentandrassy, N.: ABT-333 (Dasabuvir) Increases Action Potential Duration and Provokes Early Afterdepolarizations in Canine Left Ventricular Cells via Inhibition of IKr.
Pharmaceuticals (Basel). 16 (4), 488, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16040488>
IF: 4.6 (2022)





5. Nemes, B. Á., László, S., Zsidó, Z. B., Hetényi, C., **Fehér, Á.**, Papp, F., Varga, Z., Szőke, É., Sándor, Z., Pintér, E.: Elucidation of the binding mode of organic polysulfides on the human TRPA1 receptor.
Front. Physiol. 14, 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2023.1180896>
IF: 4 (2022)
6. Bártai, I. Z., Dombi, Á., Borbély, É., **Fehér, Á.**, Papp, F., Varga, Z., Mócsai, A., Helyes, Z., Pintér, E., Pozsgai, G.: Investigation of the Role of the TRPA1 Ion Channel in Conveying the Effect of Dimethyl Trisulfide on Vascular and Histological Changes in Serum-Transfer Arthritis.
Pharmaceuticals (Basel). 15 (6), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph15060671>
IF: 4.6
7. Papp, F., Toombes, G. E. S., Pethő, Z., Bagosi, A., **Fehér, Á.**, Almássy, J., Borrego, J., Kuki, Á., Kéki, S., Panyi, G., Varga, Z.: Multiple mechanisms contribute to fluorometry signals from the voltage-gated proton channel.
Commun Biol. 5 (1), 1131, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-022-04065-6>
IF: 5.9
8. Borrego, J., **Fehér, Á.**, Jost, N., Panyi, G., Varga, Z., Papp, F.: Peptide Inhibitors of Kv1.5: an Option for the Treatment of Atrial Fibrillation.
Pharmaceuticals (Basel). 14 (12), 1-21, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14121303>
IF: 5.215

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 39,515

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,6**

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

Debrecen, 2024.04.16.



