

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A T-sejtek kationcsatornáinak vizsgálata

Vörös Orsolya

Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Rövidítések jegyzéke

AA:	<i>Akkumulációs arány</i>
APC:	Antigen Presenting Cell/ <i>antigén prezentáló sejt</i>
ARP2/3:	Actin related protein 2/3 / <i>aktinhoz kapcsolódó fehérje 2/3</i>
BCR:	B Cell Receptor/ <i>B-sejt receptor</i>
CAD:	CRAC Activation Domain/ <i>CRAC aktivációs domén</i>
CC:	coiled-coil/ <i>„tekercselt tekercs”</i>
CD:	current density/ <i>áram sűrűség</i>
CD3/4/8/28:	Cluster of Differentiation/ <i>Differenciációs klaszter</i>
CHO:	Chinese Hamster Ovarium/ <i>kínai hörcsög ovárium</i>
CV:	Coefficient of Variation/ <i>variációs koefficiens</i>
CRAC:	Calcium Release Activated Calcium channel/ <i>Kalcium felszabadulás aktiválta kalcium csatorna</i>
CTL:	Cytotoxic T-Lymphocyte/ <i>citotoxikus T-sejt</i>
DLG1:	Discs Large homolog 1
DNS:	<i>deoxiribonukleinsav</i>
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPC:	Distal pole complex/ <i>disztális pólus komplex</i>
E.coli:	<i>Escherichia coli</i>
ER:	Endoplasmic Reticulum/ <i>Endoplazmatikus retikulum</i>
ERM:	Ezrin, Radixin and Moesin/ <i>ezrin, radixin és moezin</i>
FBS:	Fetal bovine serum/ <i>magzati szarvasmarha szérum</i>
FL:	full-length/ <i>teljes hosszúságú</i>
GAMIG:	Goat anti-Mouse IgG/ <i>Kecskeben termelt egér-ellenes IgG</i>
eGFP/mGFP:	enhanced/ Green Fluorescent Protein/ <i>felerősített/ zöld fluoreszcens fehérje</i>
GUK:	guanylate kinase / <i>guanilát kináz</i>
hDLG1:	human Discs Large homolog 1
HEK:	Human Embryonic Kidney/ <i>humán embrionális vese</i>
HRP:	Horseradish peroxidase / <i>torma peroxidáz</i>
HS1:	Hematopoietic lineage cell-specific protein 1/ <i>hematopoetikus sejtvonal sejt-specifikus fehérje 1</i>
IL-2:	Interleukin-2

IgG:	Immunoglobulin G/ Immunglobulin G
IP₃:	Inositol 1,4,5-trisphosphate / <i>Inozitol 1,4,5-triszfoszfát</i>
IS:	Immunological synapse/ <i>immunológiai szinapszis</i>
KD:	knocked down/ <i>csendesített (gén)</i>
LB:	Lysogeny broth/ <i>Lizogén tápoldat</i>
LCK:	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase/ <i>Limfocita specifikus fehérje tirozin kináz</i>
LFA-1:	Lymphocyte function-associated antigen 1/ <i>limfocita funkció-asszociált antigén 1</i>
MAGUK:	Membrane-Associated Guanylate Kinases/ <i>membrán-asszociált guanilát kináz</i>
MHC:	Major Histocompatibility Complex / <i>Fő hisztokompatibilitási komplex</i>
NFAT:	Nuclear Factor of Activated T-cells/ <i>az aktivált T- sejtek nukleáris faktora</i>
NF-κB:	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells/ <i>az aktivált B-sejtek kappa-könnyű-lánc-erősítő nukleáris faktora</i>
NHS:	N-hydroxysuccinimide/ <i>N-hidroxi-szukcinimid</i>
PBS:	Phosphate Buffered Saline/ <i>Foszfáttal pufferolt sóoldat</i>
PCR:	Polymerase Chain Reaction/ <i>polimeráz láncreakció</i>
PKCΘ:	Protein kinase C Theta/ <i>protein kináz C théta</i>
PLC:	Phospholipase C/ <i>foszfolipáz C</i>
PM:	Plasma membrane/ <i>plazmamembrán</i>
PSD95:	Postsynaptic density protein 95/ <i>Posztszinaptikus denzitás fehérje 95</i>
PVDF:	Polyvinylidene fluoride / <i>polivinilidén fluorid</i>
RF:	remaining fraction of the current / <i>megmaradó áramhányad</i>
shRNA:	short hairpin ribonucleic acid/ <i>rövid hajtű ribonukleinsav</i>
ROI:	Region of interest/ <i>az érdekelt terület</i>
SAM:	Sterile Alpha Motif/ <i>Steril alfa motívum</i>
SAP97:	Synapse-Associated Protein 97/ <i>Szinapszis asszociált fehérje 97</i>
SCID:	Severe combined immunodeficiency/ <i>Súlyos kombinált immunhiányos állapot</i>
SDS:	Sodium dodecyl-sulfate/ <i>Nátrium dodecil-szulfát</i>
SEB:	Staphylococcal enterotoxin type B/ <i>Staphylococcal enterotoxin típus B</i>
SEE:	Staphylococcal enterotoxin type E/ <i>Staphylococcal enterotoxin típus E</i>
SH3:	SRC Homology 3/ <i>SRC homológ 3</i>
Sig:	Signal peptide/ <i>szignálpeptid</i>
SLE:	Systemic lupus erythematosus/ <i>szisztémás lupusz eritematózus</i>

SMAC:	Supramolecular activation cluster/ <i>szupramolekuláris aktivációs klaszter</i>
c-SMAC:	central-Supramolecular activation cluster/ <i>központi szupramolekuláris aktivációs klaszter</i>
d-SMAC:	distal-Supramolecular activation cluster/ <i>disztális szupramolekuláris aktivációs klaszter</i>
p-SMAC	peripheral-Supramolecular activation cluster/ <i>perifériás szupramolekuláris aktivációs klaszter</i>
SOAR:	STIM1-Orai1 activating region/ <i>STIM1-Orai1 aktiváló régió</i>
SOC:	Super Optimal broth with Catabolite repression/ <i>Szuper optimális tápoldat katabolit visszaszorítással</i>
SOCE:	Store operated Ca^{2+} entry/ <i>intracelluláris raktárak által vezérelt Ca^{2+} beáramlás</i>
STIM1:	Stromal interaction molecule 1/ <i>Sztrómális interakciós molekula 1</i>
TB:	Terrific broth
TBS:	TRIS Buffered Saline / <i>TRIS puffertolt sóoldat</i>
TCR:	T Cell Receptor/ <i>T-sejt receptor</i>
TEA:	Tetraethylammonium/ <i>Tetraetilammónium</i>
TG:	Thapsigargin
TM:	Transmembrane / <i>transzmembrán</i>
WASP:	Wiskott-Aldrich Syndrome protein/ <i>Wiskott-Aldrich szindróma fehérje</i>
Wave2:	WASp family Verprolin-homologous protein-2 / <i>WASp család verpolin-homológ fehérje</i>
WIP:	WASP-interacting-protein/ <i>WASP –interakciós fehérje</i>
WT:	wild type/ <i>vad típus</i>

Tartalomjegyzék

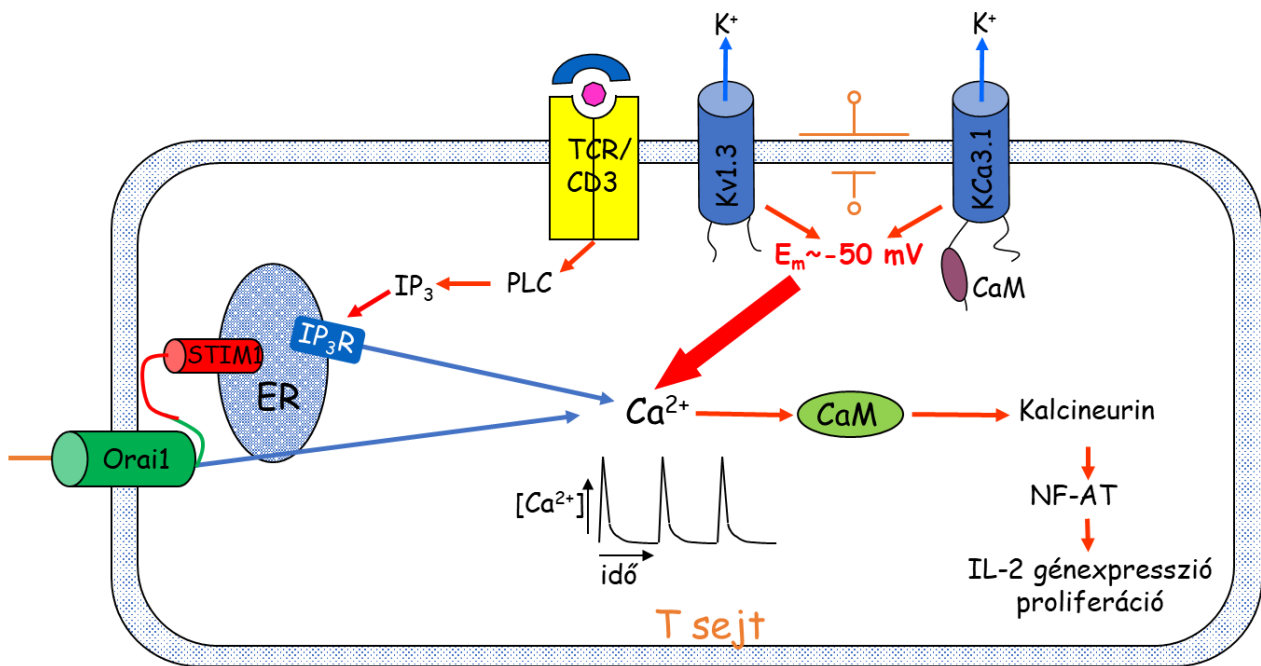
1	Bevezetés	7
1.1	Limfociták	8
1.2	T-sejtek kationcsatornáinak jellemzői	9
1.2.1	A Kv1.3 csatorna jellemzői	10
1.2.2	Az Orai és STIM jellemzői	11
1.3	A Kv1 ioncsatornák membránexpressziója	13
1.4	Immunológiai szinapszis és T-sejt aktiváció	15
1.5	Ioncsatornák az immunológiai szinapszisban	17
1.6	MAGUK fehérjecsald, SAP97	19
2	Célkitűzések	21
3	Anyagok és módszerek	22
3.1	Reagensek	22
3.2	Plazmidok, klónozás	22
3.3	Transzformálás	23
3.4	Plazmid preparálás	23
3.5	Sejtek és transzfekció	23
3.6	Virális transzdukció	24
3.7	Retrovirális shRNS-es géncsendesítés	24
3.8	Membrán jelölés	24
3.9	Gél elektroforézis és western blot	25
3.10	Coomassie-festés és GST affinitás kromatográfia	25
3.11	Retrovirális shRNS-es géncsendesítés	26
3.12	Immunfluoreszcencia	26
3.13	Immunológiai szinapszis létrehozása	27
3.14	Konfokális mikroszkópia és kiértékelés	27
3.15	Intracelluláris kalcium mérés	29
3.16	Kalcium mérése az immunológiai szinapszisban	30
3.17	Elektrofiziológia	30

3.18	Áramlási citometria	32
3.19	Statisztikai analízis	32
4	Eredmények	34
4.1	A HRET(E) szekvencia szerepe a Kv1.3 csatorna membrán-expressziójában és kapuzásában	34
4.1.1	Stratégiai szempontok a Kv1.3 konstruktok megtervezéséhez.....	34
4.1.2	A C-terminális régió deléciója nem csökkenti a Kv1.3 csatornák áramát.....	36
4.1.3	A farmakológiai mérések: a homomer H399K-ΔC csatornák jelenléte a membránban.....	38
4.1.4	A NOHRET csatornák kijutnak a sejtmembránba.....	40
4.1.5	A vad típusú és az FLAG-A413V-NOHRET alegységek együttes expressziója vad típusú Kv1.3 áramot eredményez.....	42
4.1.6	A NOHRET csatornák kapuzási árama hiányzik.....	44
4.1.7	A HRET(E) szekvencia eltávolítása vagy helyettesítése nem befolyásolja a Kv1.3 működését	46
4.2	Az Orai1 IS-beli tartózkodása megváltoztatja a T-sejtek Ca ²⁺ -válaszát.....	50
4.2.1	Az Orai1 immunológiai szinapszisba történő felhalmozódásának kinetikája ...	50
4.2.2	A STIM1 befolyásolja az Orai1 IS-beli tartózkodási idejét.....	52
4.2.3	Az Orai1 N-terminálisának deléciója a STIM1 csendesítéshez hasonló eredményeket mutat	56
4.2.4	A SAP97 szabályozhatja az Orai1 távozását az immunológiai szinapsziszból...	60
4.2.5	Az Orai1 az IS-beli tartózkodása szabályozza a T-sejtek Ca ²⁺ - választ	66
5	Eredmények megbeszélése	68
5.1	A Kv1.3 csatorna membránbeli expressziója.....	68
5.2	Ca ²⁺ -válasz Orai1 IS-lokalizáció függése T-sejtekben	71
6	Összefoglalás	78
7	Summary	79
8	Referenciák.....	80
9	Tárgyszavak	87
10	Keywords.....	88
11	Köszönetnyilvánítás.....	89

1 Bevezetés

Az adaptív immunválasz egyik fontos lépése a T-sejtek aktivációja, melynek során a T-sejt és az antigén prezentáló sejt (APC) között kialakuló fizikai interakció a T-sejtek polarizációját eredményezi. Ez a sejtfelszíni fehérjék és jelátviteli molekulák felhalmozódáshoz vezet a T-sejt és APC között kialakult kontaktrégióban, ezáltal egy jól szervezett szignalizációs platformot kialakítva, melyet immunológiai szinapszishoz nevezünk [1-3]. Az APC-vel való találkozáskor, az APC MHC molekuláján keresztüli antigén prezentáció hatására a T-sejt TCR/CD3 komplexe aktiválódik, amely különböző jelátviteli kaszkádokat indít el és eredményezi a T-sejt aktivációt [4, 5]. Ez a PLC (foszfolipáz C) aktiválódásához és IP_3 (inozitol 1,4,5-triszfoszfát) képződéséhez vezet. Az IP_3 az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában lévő IP_3 receptorhoz kötődik, melynek hatására Ca^{2+} áramlik ki a citoszólba az ER-ből. A CRAC csatorna a pórus-formáló Orai1 és az ER-rezidens STIM1 (sztrómális interakciós molekula 1) alegységekből épül fel [6-8]. Az endoplazmatikus retikulumból felszabaduló Ca^{2+} okozta ER-beli raktárürülést a STIM1 érzékeli, konformációváltáson megy keresztül, multimerizálódik és transzlokálódik a plazmamembrán közelében elhelyezkedő ER-régiókba, ahol összekapcsolódva a plazmamembránban elhelyezkedő Orai1-gyel aktiválja azt, mely az extracelluláris térből Ca^{2+} -beáramlást eredményez. A Ca^{2+} beáramláshoz a CRAC csatornák és a feszültség-kapuzott Kv1.3 és Ca^{2+} aktivált KCa3.1 kálium csatornák összehangolt működése szükséges [9-11]. A kálium csatornák -40 és -50 mV közötti értéken stabilizálják a membránpotenciált, így biztosítják a hajtóerőt a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramláshoz, mely nélkülözhetetlen a Ca^{2+} -közvetített jelátvitelhez és a T-sejtek proliferációjához (1. ábra).

Korábban leírták, hogy ezen ioncsatornák (Kv1.3, KCa3.1, CRAC) emelkedett membránexpressziója figyelhető meg aktivált humán T-sejtekben, és szerepet játszanak a Ca^{2+} jel kialakulásában [10, 12-15]. A kálium csatornák szerepére egyértelmű bizonyíték, hogy az ioncsatornák működésének gátlása megakadályozza a Ca^{2+} jel kialakulását és a sejtek osztódását. A CRAC csatornák esetében az Orai1 alegység nem-vezető mutációja a T-sejtek teljes funkcióvesztéséhez vezet (SCID fenotípus: súlyos kombinált immunhiányos állapot) [11, 16-18].



1. ábra K^+ és Ca^{2+} csatornák szerepe a limfociták aktivációjában [16]

TCR: T-cell receptor. PLC: Phospholipase. IP_3 : Inositol 1,4,5-triphosphate. IP_3R : IP_3 receptor. ER: Endoplasmic reticulum/ endoplazmatikus retikulum. STIM1: Stromal interaction molecule 1. CaM: Calmodulin.

1.1 Limfociták

Az adaptív immunrendszer lehetővé teszi a gerincesek számára, hogy felismerjék és reagáljanak a különféle kórokozókra, beleértve a parazitákat, baktériumokat, gombákat és vírusokat. Az adaptív immunrendszer elsődleges effektor sejtjei a B- és T-sejtek [19].

A B-sejtek a csontvelőben érnek és elsősorban az antitestek termelésében vesznek részt. A B sejtek a sejtfelszínükön B-sejt receptorral (BCR) rendelkeznek, amely a specifikus antigén felismerést biztosítja a sejt számára. A B-sejtek emellett MHC I (fő hisztokompatibilitási komplex I.) és MHC II molekulákat expresszálnak, melyen keresztül bemutatják az általuk felismert antigént a helper T-sejteknek. Antigén felismerést követően a B-sejtek aktiválódnak és ellenanyag termelő plazmasejttekké differenciálódnak a helper T-sejtek által termelt citokinek hatására [20, 21].

A T-sejtek a tímuszban (csecsemőmirigy) keletkeznek, és elsősorban a sejtek által közvetített immunválaszokban vesznek részt [22, 23]. A B sejtekhez hasonlóan rendelkeznek specifikus antigént felismerő receptorkomplexszel (TCR), amelyet az antigént felismerő $\alpha\beta$ -lánc és a jeltovábbító CD3 alkot. A T-sejteknek két fő típusa van, a citotoxikus T-sejtek (CTL), melyeknek jellemző markere a CD8, és a segítő T-sejtek (helper), melyeknek jellemző markere a CD4 [5, 19].

A naiv citotoxikus T-sejtek akkor aktiválódnak, amikor felismerik antigén peptidjüket egy fertőzött gazdasejt MHCI molekuláján keresztül. Aktiválása után a CTL érett citotoxikus T-sejtté differenciálódik és gyorsan osztódik, ezzel nagyszámú aktivált effektor sejtet létrehozva, amelyek ezután ugyanazon antigén peptidet expresszáló fertőzött sejteket keresik, majd lízist és apoptózist indukálnak a fertőzött T-sejtekben [5, 19].

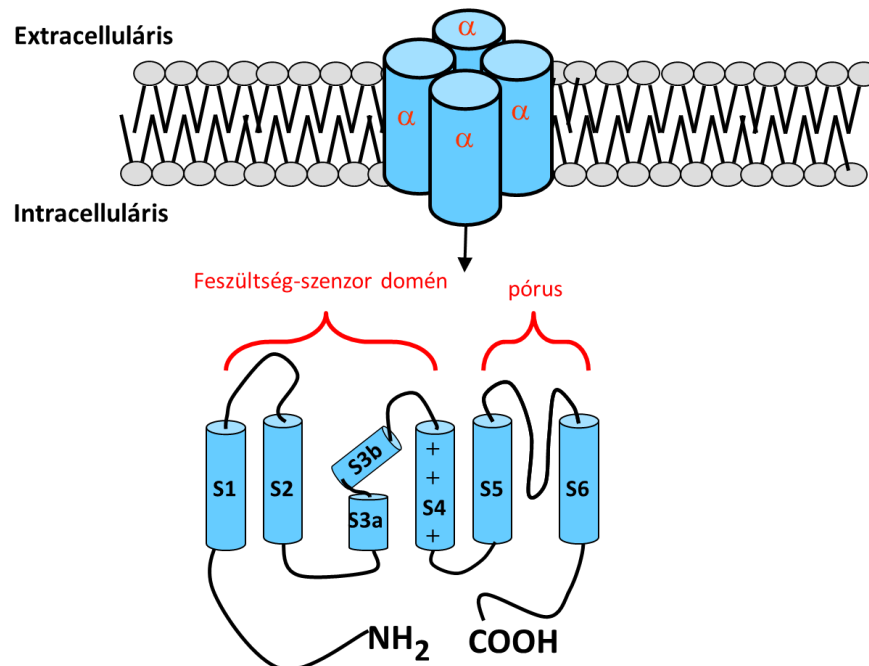
A helper T-sejtek nem rendelkeznek citotoxikus aktivitással, ehelyett az adaptív immunválasz szabályozására szolgálnak. A T-helper sejtek akkor aktiválódnak, amikor egy antigén prezentáló sejt (APC) kapcsolatba lép velük és prezentál számukra egy MHCII komplexhez kapcsolódott szervezetidegen antigént, amelyet a TCR (T-sejt receptor komplex) segítségével ismer fel. A naiv helper T-sejtek aktiválása a CTL-hez hasonló differenciálódást eredményez. A citotoxikus T-sejtektől eltérően, a helper T-sejtek aktiválása citokinek felszabadítását váltja ki, amelyek számos sejttypus aktivitását szabályozzák, beleértve az APC-ket, a B-sejteket és a CTL-eket is. Az adaptív immunrendszer résztvevői ezáltal együtt, gyorsan és specifikusan reagálnak a kórokozók fertőzésére.

1.2 T-sejtek kationcsatornáinak jellemzői

Az ioncsatornák pórusformáló fehérjék, amelyek szinte minden sejttypusban megtalálhatóak, és lehetővé teszik különböző ionok gyors átjutását a membránon keresztül (plazma és intracelluláris organelumok membránján is) az elektrokémiai gradiens irányában. Több ioncsatornát (például a legtöbb Na^+ , K^+ , Ca^{2+} csatornát) a feszültség, de például bizonyos K^+ és Cl^- csatornákat, a CRAC csatornát, TRP csatornákat, rianodin receptorokat és IP3 receptorokat (melyek viszonylag feszültség-érzéketlenek) másodlagos hírvivők és más intracelluláris és/vagy extracelluláris mediátorok szabályoznak [24]. A munkánk során a feszültség-függő $\text{Kv}1.3$ és a Ca^{2+} aktiválta CRAC csatorna Orai1 alegységével foglalkoztunk, ezért a továbbiakban ezeket tárgyaljuk részletesen.

1.2.1 A Kv1.3 csatorna jellemzői

A kálium csatornák nélkülözhetetlen szerepet játszanak a membránpotenciál beállításában és az intracelluláris jelátvitel szabályozásában különböző sejtekben [25, 26]. A feszültség-függő kálium csatornák négy alegységből állnak (a hetero- és homomerek egyaránt) a natív sejtekben és heterológ expressziós rendszerekben. Egy Kv csatorna alegység hat darab α -helikális transzmembrán szegmensből épül fel (S1-S6, 2. ábra). A csatorna intracellulárisan elhelyezkedő N-terminális régiója tartalmazza a tetramerizációs ún. T1 domént, amely szükséges az egyes alegységek ER-ban történő összeszereléséhez. Ezen kívül a Kv β járulékos alegységek képesek az N-terminushoz kötődni, és lehetővé teszik több jelátviteli molekula (mint például kinázok) kapcsolódását [27]. A Kv csatornák erősen konzervált pórus régióját az S5 és S6 közötti linker hozza létre, mely főként szelektivitási szűrőként funkcionál a K^+ ionok számára. A negyedik transzmembrán szegmenst, amely számos pozitívan töltött aminosav részt tartalmaz, a Kv csatornák feszültség szenzorának tekintjük [28]. A csatorna C-terminálisához különböző linker ill. adapter fehérjék kapcsolódhatnak, amelyek kihorganyozhatják a fehérjét a citoszkeletonhoz, vagy irányíthatják a csatorna kijutását a plazmamembránba (2. ábra) [13, 29-33].



2. ábra A Kv1.3 csatorna felépítésének sematikus ábrája

A Kv1.3 csatorna négy azonos pórusképző (α) alegységből áll (felül), ahol a négy alegység mindegyike hat transzmembrán α -helikális szegmensből (S1-S6) tevődik össze, amelyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnek össze (alul).

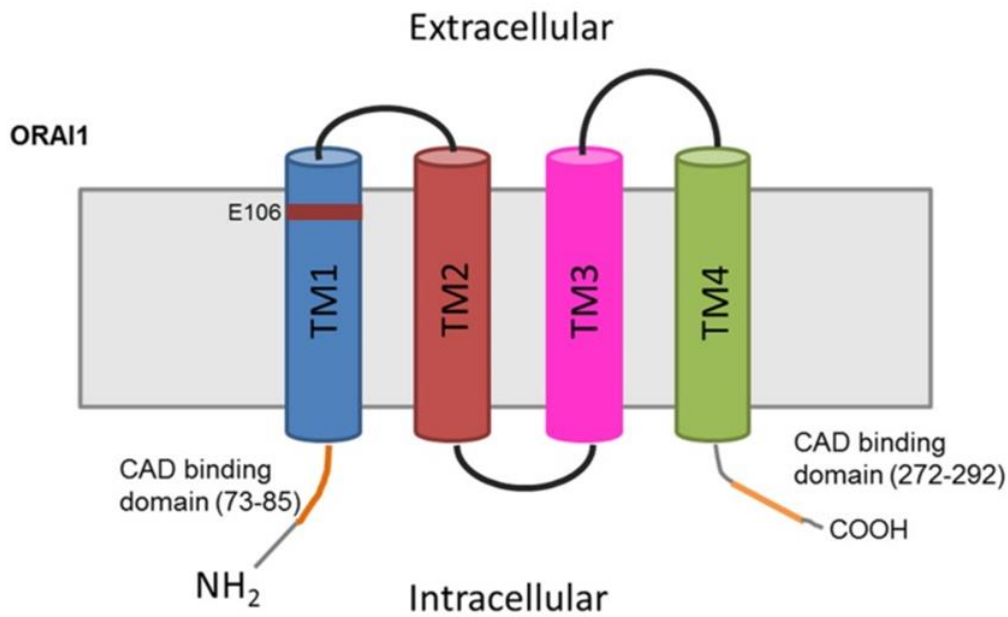
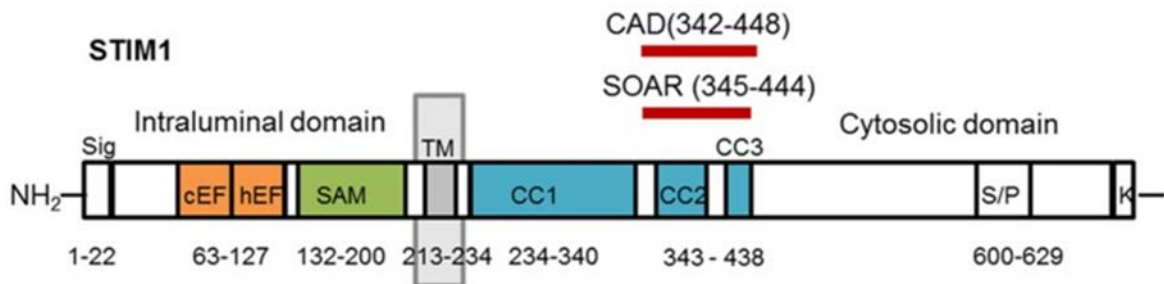
1.2.2 Az Orai és STIM jellemzői

A T-sejt aktiváció kulcsfontosságú lépése a Ca^{2+} -ionok CRAC csatornákon keresztüli beáramlása. Az ER Ca^{2+} raktárak kiürülését az endoplazmatikus retikulum membránjában elhelyezkedő STIM1 alegység érzékeli. A STIM1 ezután konformációs változásokon megy keresztül, multimerizálódik és transzlokálódik a plazmamembránhoz (PM), ahol aktiválja a PM-rezidens, Orai1 pórusképző domént [34-37]. Az Orai1 két izoformával rendelkezik: a hosszabb az Orai1 α , amely 301 aminosavból (aa) áll, a rövidebb pedig az Orai1 β , amelyben hiányzik az α izoforma első 70 aminosavja [38, 39]. A vad típusú változatnak tekintett Orai1 α -csatorna hat alegységből áll [40-42]. Minden alegység négy alfa-helikális transzmembrán domént (TM) tartalmaz, és intracelluláris N- és C-terminálokkal, valamint szelektivitási szűrővel rendelkezik a 106. pozícióban (3. A ábra) [37]. A STIM1 CRAC aktivációs doménjének (CAD) és az Orai1 N- (73-91aa, α izoforma szerinti számozás) és C-terminális végén (342 - 448aa) lévő CAD kötő domének kölcsönhatása a csatorna nyitását eredményezi. Korábbi tanulmányokban igazolták, hogy a 76-os pozíciójú triptofán, a 73.,74. és 75. helyzetben lévő aminosavakkal együtt fontos interakciós interfészként szolgál a STIM1-Orai1 kölcsönhatás során [6, 43, 44]. Az Orai1-gyel való homológia alapján két további emlős gént azonosítottak, az Orai2-t és az Orai3-t, amelyek közül az Orai3 kizárólag emlősökben fejeződik ki, és valószínűsíthető, hogy az Orai1-ből (és nem az Orai2-ből) duplikálódott [17, 45, 46]. Az Orai2 vagy az Orai3 STIM1-el való ko-expressziója HEK293 sejtekben olyan CRAC csatornákat hoz létre, amelyek az intracelluláris raktárak ürülésének hatására CRAC-szerű áramot mutatnak, azonban amplitúdója sokkal kisebb, mint az Orai1 esetében [46]. Különböző típusú primer sejtekben az Orai1 csendesítése (de nem az Orai2 vagy Orai3 csendesítése) megszüntette az intracelluláris raktárak által kiváltott Ca^{2+} beáramlást (SOCE) és a CRAC áramokat is, amely arra utal, hogy az Orai2 és Orai3 alegységek alternatív módon járulnak hozzá a (CRAC) Ca^{2+} csatorna működéséhez [47, 48]. Továbbá, kimutatták, hogy az Orai2 gén csendesítése egerekben növelte a SOCE-t T-sejtekben és makrofágokban [49]. Ezen kívül, a heteromerek képzésekor az Orai2 és Orai1 csökkent funkciójú heteromereket képeztek, hasonlóan az Orai3 és Orai1 által képzett csatornák esetében, ahol az Orai3 jelenléte csökkentette a STIM1 általi aktivációt az Orai1-Orai3 heteromer csatornáknál [49, 50].

A STIM1 685 aminosavból álló, I-es típusú transzmembrán fehérje, amely nyugalmi állapotban az ER-ban helyezkedik el. A luminális N-terminális régiója tartalmaz egy ER szignál-peptidet, egy EF-kéz (EF-hand) és egy SAM (steril alfa motívum) domént, míg a citoszolikus C-terminális részén két „coiled-coil” doménből, egy prolin-szerin gazdag és egy

lizin gazdag régióból, valamint az Orai1 aktivációhoz szükséges CAD (CRAC aktivációs domén) doménből áll [8, 51]. Az ER Ca^{2+} -raktár ürülése a STIM1 átrendeződését eredményezi az ER-ből a plazmamembránhoz közeli pontokba. A citoszólikus C-terminális rész elengedhetetlen a STIM1 oligomerek ER-PM csomópontokhoz történő eljutásához és az azt követő CRAC csatorna nyitásához, ahol a CAD domének segítségével az Orai1 N- és C-terminálisán lévő CAD kötő doménekhez kapcsolódik, ezzel aktiválva a csatornát (3. B ábra) [8, 52]. Emlősökben előforduló homológja a STIM2, amely lényegesen gyengébb Orai1 aktivációra képes [53]. A STIM1-gyel ellentétben, a STIM2 fokozott kifejeződése negatív hatással van az endogén SOCE-ra, valamint a STIM1-hez képest jóval lassabban aktiválja az Orai1-et [54-58]. A STIM2 Jurkat T-sejtekben expresszálva csökkenti CRAC áramokat, csendesítése viszont nincs hatással a SOCE-ra, csak a bazális Ca^{2+} -szint szabályozására, valamint a STIM1 jelenléte szükséges a STIM2 Orai1-hez való kapcsolódásához [57].

Az Orai1 és a STIM1 különféle funkcióvesztéssel járó mutációi a CRAC csatorna működését (pl. konduktancia csökkenés, megszűnés) és ezzel együtt az immunválasz kialakulását is gátolhatják. A CRAC csatorna funkció módosulása ill. teljes elvesztése immunhiányt, gyakori fertőzéseket, T-sejt aktivációs defektusokat, veleszületett légzőizom elégtelenséget okozhat [17, 59-61]. Éppen ezért az Orai1 különböző fenotípusaira/mutánsaira irányuló kutatások rendkívül fontosak a CRAC csatornához köthető betegségek mechanizmusának megismerése végett [17, 61, 62].

A**B**

3. ábra Az Orai1 és a STIM1 felépítése [51]

(A) TM1-TM4: Transmembrane domain. CAD binding domain: CRAC activation domain binding domain. (B) Sig: Signal peptide. CEF: canonical EF-hand. hEF: hidden EF-hand. SAM: sterile alpha motif. TM: transmembrane domain. CC1-CC3: coiled-coil domain. CAD: CRAC activation domain. SOAR: STIM1-Orai1 activation region. S: serine. P: proline. K: lysine.

1.3 A Kv1 ioncsatornák membránexpressziója

Számos tanulmány jelent meg az ioncsatornák genéziséről, a membránba történő kijutásról és a csatornák összeszerelődéséről [25, 26, 63, 64]. Habár sok membránfehérje

rendelkezik egy egyértelműen azonosítható szignálszekvenciával, amely a plazmamembránba való kijutáshoz szükséges, a Kv1 csatornákból hiányzik ez a motívum, és maga az S2 szegmens szolgál a membránba történő expresszió felismerési helyeként [25]. Továbbá leírták, hogy a Kv1 csatornában jelen van több olyan fehérje motívum, amely szabályozhatja az ER-beli retenciót, vagy a plazmamembránba történő kijutást [65-67].

A Kv1.4 csatornák esetében az intracelluláris C-terminus „VXXSL” motívuma (618-622 aminosav) és a pórusrégió segíti elő a magas sejtfelszíni expressziót és szabályozza a membránba jutást [65]. A Kv1.1 csatornából azonban hiányzik a „VXXSL” szekvencia, ehelyett egy „HRET” aminosav motívummal rendelkezik, amely közvetlenül az S6 szegmens után helyezkedik el a csatorna C-terminálisán. A Kv1.1 csatorna HRET szekvenciájában lévő R vagy H aminosav utáni stop kodon inzerció a vezetőképességének elvesztését eredményezi, viszont a sejtfelszíni expressziós szint nem változik meg [68]. Emellett Lu és munkatársai kimutatták, hogy a Shaker K⁺ csatornák (ez a Kv1 homológja a *Drosophila melanogaster*-ben) a C-terminális „HRE” szekvencia nélkül is képesek a plazmamembránban kifejeződni, azonban a „HRE” régió hiánya drasztikus változást eredményezett a steady-state (egyensúlyi) aktivációs kapuzási paraméterekben, szemben a Kv1.1-gyel, mely nemvezetővé vált [69]. A „HRET” szekvenciát megelőző aminosavak eltávolítása a Shaker csatornában (éppen ellenkezőleg, mint a Kv1.1-re leírtakkal) megakadályozta a csatorna membránba történő kifejeződését [63].

A közelmúltban számos tanulmány beszámolt arról, hogy a Kv1.3 csatorna C-terminális deléciója nagymértékben rontja a csatornák plazmamembránba történő transzportját, valamint, hogy a Kv-csatornák C-terminusa fontos interakciós hely lehet számos kihorgonyzó/adapter fehérjének (PSD95, SAP97, kortaktin) [30, 63, 70-75]. Ezen kívül a Kv1.3 csatornában megtalálható „HRET(E)” szekvencia, mely közvetlenül az S6 szegmens után helyezkedik el, közel az aktivációs kapuhoz, ezért a C-terminális levágása, beleértve ezt a motívumot is, megzavarhatja az aktivációs kapu működését, ezzel létrehozva egy plazmamembránban kifejeződő, de nem vezető fenotípust [76]. A Kv1.3 csatornáról kimutatták, hogy a C-terminálisán lévő két glutamát (E, negatív töltésűek) jelenléte befolyásolja a csatorna sejtmembránba történő kijutását: ezeknek az aminosavaknak a C-terminálissal együtt történő deléciója/eltávolítása vagy izoleucinra történő mutációk hatására a Kv1.3 csatorna nemvezetővé vált és plazmamembránbeli expressziója is drasztikusan lecsökkent [63].

1.4 Immunológiai szinapszis és T-sejt aktiváció

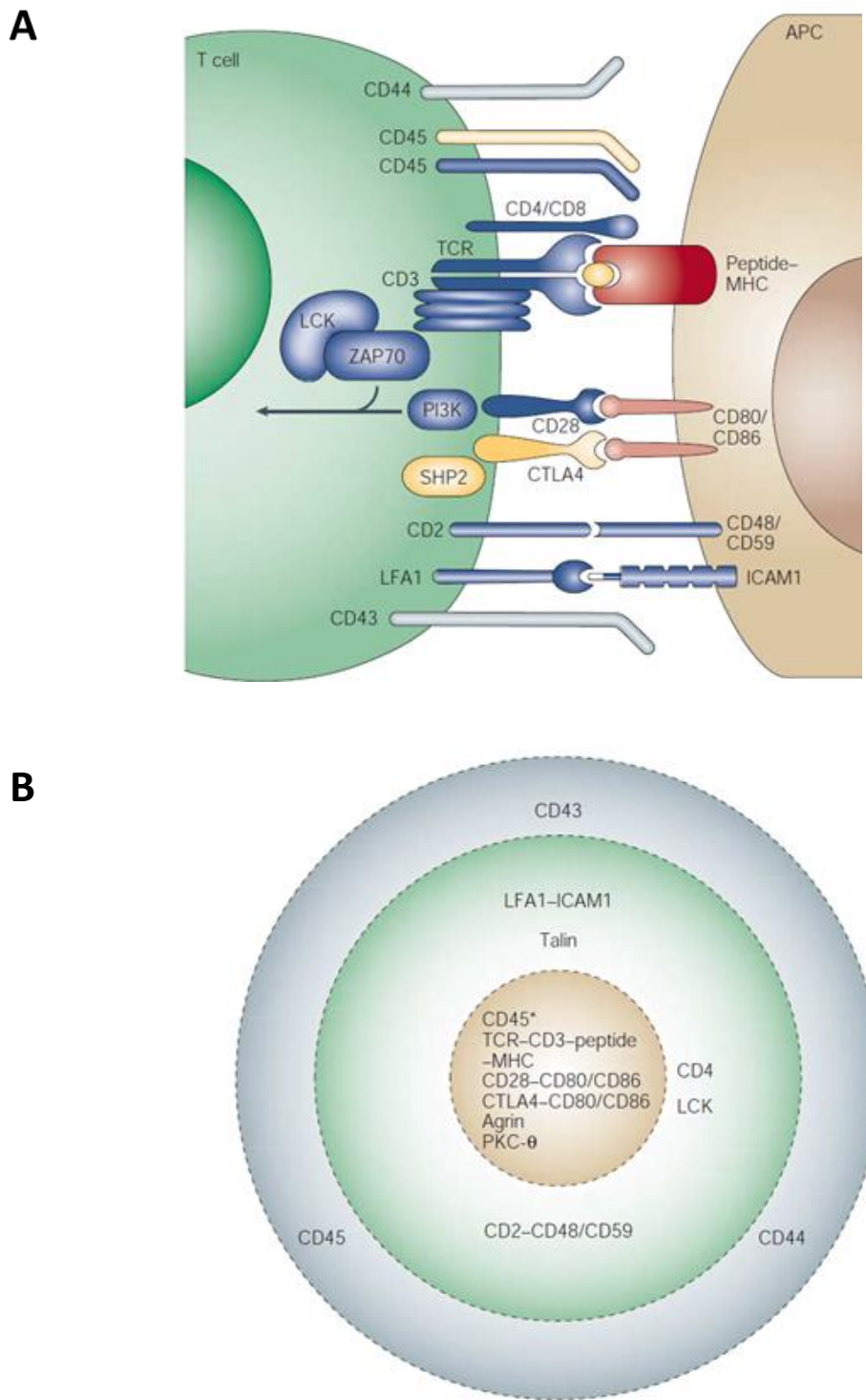
A T-limfociták *in vivo* aktivációja az antigén prezentáló sejtekkel (APC) való találkozás során valósul meg. A T-sejt és az APC közötti fizikai kölcsönhatás különböző jelátviteli kaszkádok elindulását eredményezi, mely a T-sejt polarizációjához vezet: a sejtfelszíni fehérjék, intracelluláris organellek és jelátviteli molekulák felhalmozódása a T-sejt-APC között létrejövő immunológiai szinapszisban (IS) [1-3]. A specifikus sejtfelszíni fehérjék IS-be történő mozgása szükséges a T-sejt megfelelő aktiválásához. Az IS kialakulása után és megléte során számos membrán (CD43, CD44, CD45) és intracelluláris fehérje ((p56)Lck, SAP97, PSD-95, HS1 stb.) rendeződik be, valamint az F-aktin fokozott polimerizációja figyelhető meg a T-sejtben (4. A ábra) [77, 78].

Ez az átrendeződés hozza létre az úgynevezett szupramolekuláris aktivációs komplexet (SMAC) a T-sejt és APC határán, amelyet egy centrálisan elhelyezkedő (c-SMAC) és egy perifériásan elhelyezkedő (p-SMAC) gyűrűszerűen elhelyezkedő régió hoz létre [79]. Ezek a régiók különböző molekulákból épülnek fel: míg az előbbit a TCR (T-sejt receptor), a CD28, valamint számos intracelluláris jelátviteli molekula, mint például a protein kináz C Θ (PKC Θ), úgy az utóbbit az aktinhoz kötődő talin, a limfocita-specifikus protein tirozin kináz (LCK), az intracelluláris adhéziós molekula 1 (ICAM-1), valamint a hozzá kapcsolódó LFA-1 (limfocita funkció-asszociált antigén 1) alkotja [79, 80]. Továbbá nemrégiben egy harmadik, disztális réteget is felfedeztek (d-SMAC), amelyben többek között a CD45 játszik szerepet (4.B ábra) [81].

A fent említett adhéziós molekulák mellett, a kostimulációs fehérjék is fontos szerepet játszanak az immunológia szinapszis működésében. A CD28 receptor a CD80-al kapcsolódik össze és dúsul fel a cSMAC régióban, valamint a PKC Θ molekulák is nagy mennyiségben vannak jelen a szinapszis centrális részében [78]. A szupramolekuláris aktivációs komplex perifériás gyűrűjében elhelyezkedő CD2 a CD48-hoz, illetve a CD59-hez is képes kötődni. Foszforilációt indukálva képes az intracelluláris Ca²⁺ szint potenciózására, valamint elősegíti a T-sejt APC-hez történő kapcsolódását [82, 83].

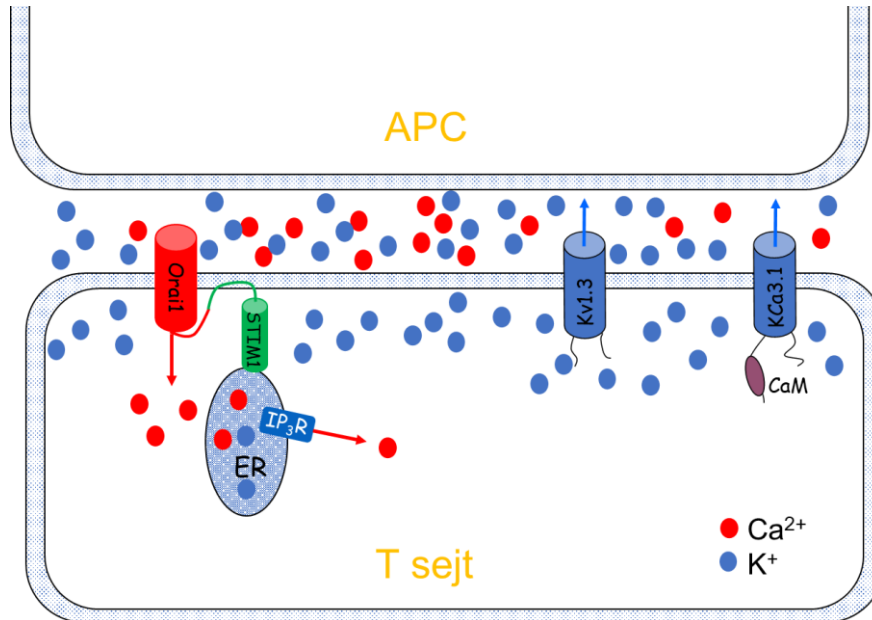
Továbbá a T-sejtre és az APC-re is egyaránt jellemző, hogy az IS-t F-aktin szálak stabilizálják. A TCR stimuláció a WASp, a WAVE2 és a HS1 aktin szabályozó fehérjéket az IS-be toborozza, valamint aktiválja a specifikus kinázokat, adaptermolekulákat (Dlg1), Rho GTPázokat magában foglaló útvonalakat és az Arp2/3 komplex-függő aktin polimerizációt [77]. Ezzel párhuzamosan a CD2 és CD28 molekulák aktivációja defoszforilációt és a kofilin aktivációját indukálja. A kofilin aktin szálakat „szétválasztó aktivitása” a szálakat

monomerekké bontja szét és új végeket hoz létre a szálak meghosszabbítására, amely folyamat tovább fokozza az aktin polimerizációját az IS-nél. A TCR stimuláció az ezrin és a moezin ERM fehérjék átmeneti defoszforilációját is indukálja, ami e fehérjék felszabadulásához vezet az aktin szálakból és a plazmamembránhoz kötődő fehérjékből [77].



4. ábra Az immunológiai szinapszis felépítése [78]

A legújabb vizsgálatok azt mutatják, hogy olyan fontos fehérjék, mint például a Kv1.3, a KCa3.1 és a CRAC - mind a STIM1, mind az Orai1 alegységek – is felhalmozódnak az immunológiai szinapszisban (IS) (5. ábra) [10, 12-15].



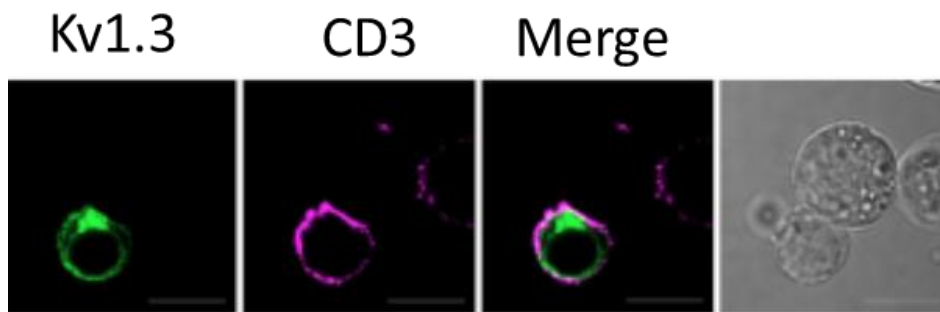
5. ábra Ioncsatornák az immunológiai szinapszisban

A sematikus ábra az ioncsatornákat (Kv1.3, KCa3.1, STIM1+Orai1 = CRAC) ábrázolja az immunológiai szinapszisban, a T-sejt-APC interfésznél.

1.5 Ioncsatornák az immunológiai szinapszisban

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a Kv1.3 ioncsatornák feldúsulnak a T-sejt és APC között kialakult immunszinapszisban, valamint a működésük is megváltozik foszforiláció, illetve defoszforiláció révén (6. ábra) [12, 13]. Továbbá igazolták, hogy a T-sejtekben is jelen lévő PSD-95 fehérje fontos szerepet játszik a Kv1.3 csatorna szinapszisba történő diffúziójában, valamint a kortaktin (aktin-kötő) fehérje közvetítésével a Kv1.3 csatorna az F-aktin polimerizáció során kihorgonyozódik az aktin citoskeletonhoz [13]. Számos tanulmány foglalkozott az SLE (*szisztémás lupusz eritematózus*) betegség lehetséges kiváltó okaival, ahol többek között azt mutatták ki, hogy az SLE-s T-sejtekben a Kv1.3 csatorna IS-be történő berendeződésének dinamikája eltér az egészséges T-sejtektől [84].

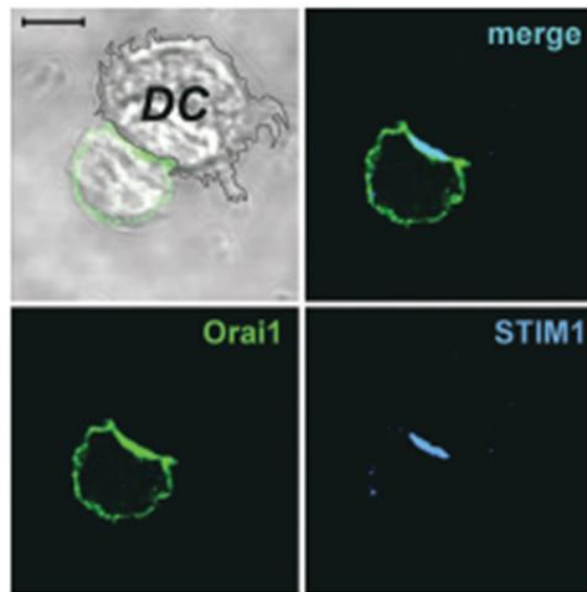
Egészséges sejtekben a Kv1.3 csatornák feldúsulásának folyamatos növekedése figyelhető meg a szinapszis képződés alatt, míg az SLE-s sejtekben a Kv1.3 ioncsatorna az IS képződés korai szakaszában elhagyta a szinapszist. Ez a lecsökkent tartózkodási idő az IS-ben bizonyítottan hozzájárul a T-sejt magasabb citoszólikus Ca^{2+} szintjének kialakulásához, mely az SLE-s T-sejtek hiperaktivitását okozhatja [84]. Továbbá a Kv1.3 esetében azt is leírták, hogy a csatorna IS-be történő diffúziójának gátlása antitest-keresztkötéssel a CD3-CD28 indukált Ca^{2+} -jel módosulását eredményezte az immunológiai szinapszisban [85].



6. ábra A Kv1.3 csatorna feldúsul az immunológiai szinapszisban, Jurkat T-sejtekben [13] Immunszinapszis létrejötte a SEE-előkezelt Raji és az mGFP-jelölt vad típusú Kv1.3-t expresszáló Jurkat (Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT) sejtek között. Balról jobbra: Az első felvétel a Kv1.3 jelet mutatja; az mGFP-vel jelölt csatornák zöld színnel jelennek meg. A Jurkat sejteket anti-CD3 primer és Alexa Fluor 647 GAMIG szekunder antitestekkel jelölték meg a szinapszisok azonosítására (második kép, magenta). A harmadik oszlop a Kv1.3 és anti-CD3 fluoreszcencia jel átfedő képeit mutatja, míg az IS-t alkotó sejtek fáziskontraszt képei a negyedik oszlopban jelennek meg. A skála 10 μ m hosszúságú.

Emellett beszámoltak arról, hogy a Ca^{2+} aktiválta CRAC csatorna mindkét alegysége (az Orai1 és a STIM1) felhalmozódik az IS-ben (7. ábra). Kimutatták azt is, hogy az Orai1 képes berendeződni a szinapszisba Jurkat és humán T-sejtekben egyaránt, még akkor is, ha az Orai1 nem vezető mutánsát (E106) expresszálják a sejtekben. Továbbá a CRAC csatornák keresztüli kalcium beáramlás elősegíti az aktin filamentumok polimerizációját és berendeződését az immunológiai szinapszisban, mely az ER átrendeződéséhez, és ez által az Orai1 és STIM1 IS-be történő diffúziójához vezet. Ezen kívül az aktin berendeződésében és dinamikájában bekövetkező kóros elváltozások nem a Ca^{2+} eltávolítása miatt jönnek létre,

sokkal inkább a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramlás gátlásának következményei [86].



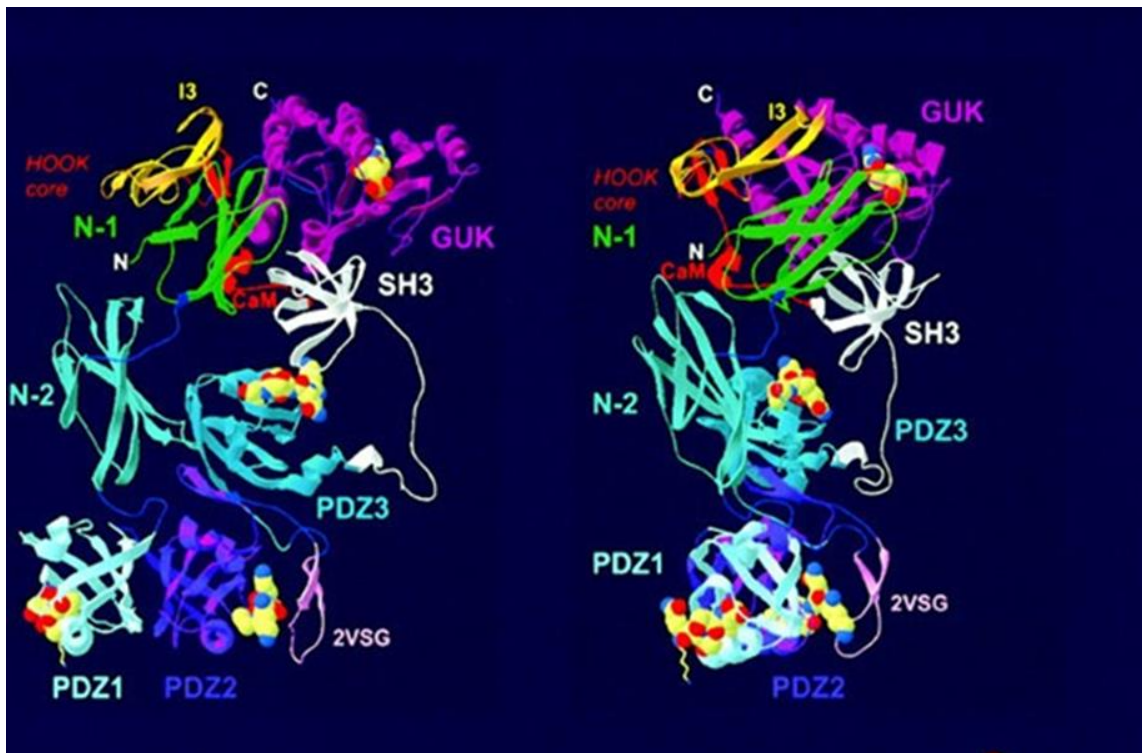
7. ábra Az *Orai1* és *STIM1* berendeződése T-sejtekben a dendritikus sejtekkel való kölcsönhatás során [14]

Primer humán T-limfocita IS-ben egy SEB-el aktivált, autológ dendritikus sejttel (bal felül). A GFP-vel konjugált *Orai1* (bal alul) és anti-humán *STIM1* (jobb alul) antitesttel jelölt *STIM1* az immunológiai szinapszisban. A kék és zöld csatorna fúziója (jobb felső ábra). Skála: 5 μm .

1.6 MAGUK fehérjecsalád, SAP97

A MAGUK (membrán-asszociált guanilát kinázok) fehérje család tagjainak főként a neuronális szinapszisok létrehozásában és működésében van szerepük. Felépítésüket tekintve különböző számú PDZ domént, SH3 domént, L27 domént és egy C-terminális GUK (guanilát-kináz) domént tartalmaznak, emiatt képesek kialakítani fehérje-fehérje kölcsönhatásokat citoskeletális fehérjékkel és a jelátvitelben részt vevő molekulákkal [87]. A MAGUK fehérjék különböző számú PDZ domént tartalmaznak, amelyen keresztül az interakciós partnerek C-terminálisához képesek kötődni. A fehérjében lévő SH3 domén szintén a fehérje interakciók kialakítását teszi lehetővé [88].

A Dlg1 (Discs large homolog 1), más néven szinapszis-asszociált fehérje 97 (SAP97), a MAGUK fehérjék családjába tartozó kihorgonyzó fehérje. Széles körben expresszálódik, különösen a test hámsejtjeiben. A többi MAGUK-hoz hasonlóan a SAP97 is három PDZ (PSD-95, Dlg és ZO-1) doménből, egyetlen SH3 és egy GUK (PSD-95, Dlg és ZO-1) doménből áll (8.ábra) [87]. Kimutatták, hogy a SAP97 számos partnerrel lép kölcsönhatásba a fehérje-fehérje interakciós doménjein keresztül, beleértve a membrán ioncsatornáit és a citoszólikus fehérjéket [13, 74, 89-91]. A SAP97 képes a kálium és nátrium ioncsatornához kötődni szívsejtekben, és ezáltal szabályozni a szív akcióspotenciált, illetve a késői befelé egyenirányító K^+ áramokat, valamint a SAP97 fontos szerepet játszik a káliumcsatornák lokalizációjának és kihorgonyzásának irányításában idegsejtekben [13, 74, 90, 91]. Továbbá azt is leírták, hogy a SAP97 más adapter fehérjékkel együtt (PSD-95) akkumulálódik az immunológiai szinapszisban, majd 15 perc után csökkent felhalmozódást mutat T-sejtek és CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakult szinapszisban [92].



8. ábra A SAP97 fehérje szerkezete [89]

A SAP97 három PDZ (PDZ1, PDZ2, PDZ3) doménből, egyetlen SH3 és egy GUK (guanilát-kináz) doménből áll.

2 Célkitűzések

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

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

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

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

3 Anyagok és módszerek

3.1 Reagensek

A használt oldatokat és a reagenseket a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be, ha ez másképpen nincs jelölve.

3.2 Plazmidok, klónozás

A vad típusú humán Kv1.3 csatornát (acc. #: M85217) pEGFP-C1 vektor plazmidba (Clontech, USA) klónoztuk a Bgl II és EcoR I restriktív helyek segítségével (Thermo Fisher Scientific Inc.). A „ragadós-vég” ligálásához T4 DNS-ligázt használtunk a standard protokoll szerint (Biocenter Ltd., Magyarország). A deléciós (ΔC , NOHRET, HRETE) és inzerciós és/vagy pontmutációs (FLAG, XHRETE, polyA, Atail) mutánsokat úgynevezett „flanking” primer mutagenézissel hoztuk létre. A pont mutánsokat (H399K, A413V), illetve a teljes hosszúságú Kv1.3 csatornát pRc-CMV vektorban expresszáztattuk.

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

A vad típusú Orai1 csatornát (Orai1-Full), amelyet Richard Lewis laboratóriumából (Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University, California, USA) kaptunk és az N-terminálisán trunkált Orai1 csatornát (Orai1- $\Delta 72$), amelyben az első 72 aminosavat töröltük, az N terminális régiójában mGFP-vel jelöltük meg. Majd a retrovirális transzdukcióhoz használt pBMN-LacZ vektorba (Nolan laboratóriuma/ Nolan's lab, Baxter Laboratory in Genetic Pharmacology, Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, Stanford, California, USA) klónoztuk Hind III és Not I restriktív helyek segítségével (Thermo Fisher Scientific Inc).

A klónozás prokollja röviden az alábbi volt: a PCR során felszorosított konstruktokat 1%-os agaróz gélen megfuttattuk, majd kivágtuk és kitisztítottuk fenol-extrakciós módszerrel. Ezután mind az inzertet, mind a vektort a megfelelő restriktív enzimekkel hasítottuk (BglII és EcoRI a Kv1.3 esetén, Kpn2I és NotI az Orai1-nél), majd ismét kitisztítottuk fenol-extrakciós módszerrel. A ligáláshoz T4 DNS-ligázt használtunk a standard protokoll szerint (Biocenter

Ltd., Magyarország). Az összes konstruktot a Debreceni Egyetem Klinikai Genomikai Központjában szekvenáltattuk.

3.3 Transzformálás

A PCR során elkészült plazmidokat 200 μ l E. coli kompetens sejthez (DH5 α , ET12567) adtuk hozzá, majd 20 percig jégen inkubáltuk. 42°C-on hősokkot alkalmaztunk (50-60 s), majd ismét jégre helyeztük a mintákat. Ezután 800 μ l SOC médiumot adtunk a sejtekhez és 1 órán keresztül rázattuk 200 rpm-en, 37°C-on. Az így kapott sejteket megfelelő antibiotikum tartalmú (ampicillin vagy kanamicin) agar táptalajra szélesztettük. A petriben lévő sejteket 16 órán keresztül, 37°C-on növesztettük.

3.4 Plazmid preparálás

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

3.5 Sejtek és transzfekció

A Jurkat E6-1 sejteket RPMI médiumban (#R6504, Sigma-Aldrich Ltd., Magyarország) tenyésztettük, amelyhez 10% FBS-t, 2mM L-glutamint, 1 mM Na-piruvátot és 200 egységnyi penicillin/sztreptomicint adtunk.

A HEK-293-T, HEK tsA-201 és CHO sejteket DMEM médiumban növesztettük (#12800, Sigma-Aldrich Ltd., Magyarország), amely 10% FBS-t, 2mM L-glutamint, 1 mM Na-piruvátot, és 200 egységnyi penicillin/sztreptomicint tartalmazott. Az összes sejtet 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban tároltuk, és 2-3 naponta passzáltuk.

A Kv1.3 ioncsatorna esetében az expressziós rendszer (HEK tsA-201) mérésekre gyakorolt hatásainak (pl.: endogén Kv1.x csatornák/alegységek jelenléte, amely elősegítheti a heteromer

csatornák képződését, és kifejeződését a membránban) kizárása érdekében a tézisben bemutatott kísérleteket CHO sejtekben végeztük el, mivel ezek nem mutattak mérhető teljes-sejt áramot +50mV mellett [93, 94].

A DNS plazmidok tranziens transzfekcióját Lipofectamine 2000™ (Life Technologies, Magyarország) segítségével végeztük a gyártó által megadott protokoll alapján.

3.6 Virális transzdukció

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

3.7 Retrovirális shRNS-es géncsendesítés

A STIM1 és SAP97 fehérjék leütését Jurkat-sejtekben a virális transzdukcióhoz használt protokoll alapján (Nolan laboratórium) Mission shRNS (Sigma-Aldrich Ltd.) plazmidok segítségével végeztük. Az shRNS szekvencia a következő volt a STIM1 esetében: CCGGTGGTGGTGTCTATCGTTATTGCTCGAGCAATAACGATAGACACCACCATT TTG (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD); és a SAP97 esetében: CCGGCGGGTCAATGACTGTATATTACTCGAGTAATATACAGTCATTGACCCGTTTTT (mGFP-Orai1-Full-SAP97=KD).

A transzdukció kontrolljaként pLKO.1-puro plazmidot (Sigma-Aldrich Ltd.) használtunk, ami egy olyan shRNS inzertet tartalmazott, amely nem kapcsolódik egyetlen ismert génhez sem (mGFP-Orai1-Full-PURO). A géncsendesítés hatékonyságát western-blottal ellenőriztük.

3.8 Membrán jelölés

Az mGFP-Orai1-Full, mGFP-Orai1- Δ 72, mGFP-Orai1-Full-PURO, mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD és mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtek esetében az ioncsatornákat expresszáló Jurkat-sejteket üvegaljú petribe raktuk, majd 62,5 μ M Alexa Fluor™ 647 NHS észterrel 20 percig jelöltük őket jégen, 1 \times TBS-ben (Tris-buffered saline/ TRIS pufferolt sóoldat; 25 mM

Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl). A konfokális képek elkészítéséhez NIKON Ti2 mikroszkópot, a kiértékeléséhez ImageJ szoftvert használtunk.

3.9 Gél elektroforézis és western blot

A fehérje mintákat SDS gélelektroforézissel méretük alapján elválasztottuk, ahol 12%-os gélt használtunk (20percig 80V, majd 90percig 120V feszültséget alkalmazva), majd PVDF membránra (Millipore, Billerica, MA, USA) transzferáltuk. A membránt sovány tejpörrel blokkoltuk (Dóczy ABC, Debrecen), majd hozzáadtuk az elsődleges antitesteket: egér anti-STIM1, anti-FLAG M2, egér anti-SAP97 és nyúl anti-aktin. Ezután a membránt mostuk tween 20-at tartalmazó TBS-ben (Tris puffertolt sóoldat), majd hozzáadtuk az anti-egér IgG vagy anti-nyúl IgG HRP-kapcsolt másodlagos antitesteket (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA). Majd a membránokat 3-szor mostuk TBS-ben és 1-szer desztillált vízben, végül PierceTM ECl reagenst (ThermoFisher, Magyarország) adtuk hozzá és FluorChem Q MultiImage III Western blot képalkotó rendszer (ProteinSimple, USA) segítségével előhívtuk. A kísérletek során 1×10^6 sejtet használtunk minden egyes minta esetében.

3.10 Coomassie-festés és GST affinitás kromatográfia

A Coomassie-festéshez pGEX-4T-2-Orai1 N-ill. C terminálissal rendelkező GST fúziós fehérjéket (GST-Orai1-1-72; GST-Orai1-1-88; GST-Orai1-259-301) valamint a negatív kontrollként használt pGEX-4T-2-GST (glutathion-S-transzferáz) fehérjéket *Escherichia coli* (BL21) baktériumban termeltettük. A bakteriális lizátumokat 1 mM izopropil-béta-D-tiogalaktoziddal (IPTG) indukáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten, majd centrifugálással összegyűjtöttük, mostuk háromszor 1-szeres PBS-sel. Ezután 50 mM Tris-HCl-t (pH 7,5), 0,1% Tween20-t, 0,2% 2-merkaptóetanolt és proteázgátló koktél III-at (Calbiochem, Darmstadt, Németország) tartalmazó lízispufferben szonikáltuk. Ezután SDS gélen megfuttattuk és 1percig Coomassie-festéssel megfestettük, majd 16 órán keresztül mostuk 12% etanolt és 7% ecetsavat tartalmazó oldatban a fehérje termelődés ellenőrzése végett.

A GST affinitás kromatográfia során a korábban letermelt bakteriális fehérjékből a pGEX-4T-2-GST és GST-Orai1-1-72 bakteriális lizátumokat 1 óráig GST SpinTrap oszlopokra (GE Healthcare, USA) kötöttük ki, 4 °C-on inkubálva és állandóan forgatva. A Jurkat sejteket

(amelyek az SAP97 fehérjét tartalmazzák) háromszor mostuk 1xPBS-sel, majd lízispufferben szonikáltuk és hozzáadtuk a GST oszlopokhoz, melyekhez előzőleg felkötöttük a megfelelő GST konstruktot, majd egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C -on. Másnap a GST SpinTrap oszlopokat mostuk és az oszlopokhoz kötődött fehérjét 10 mM glutationnal eluáltuk. Az eluátumokat SDS-PAGE segítségével választottuk szét, és PVDF membránra vittük át. A fehérjék jelenlétét western-blottal igazoltuk speciális SAP97-elleni antitest segítségével.

3.11 Retrovirális shRNS-es géncsendesítés

A STIM1 és SAP97 fehérjék leütését Jurkat sejtekben a virális transzdukcióhoz használt protokoll alapján (Nolan laboratórium) Mission shRNS (Sigma-Aldrich Ltd.) plazmidok segítségével végeztük. Az shRNS szekvencia a következő volt a STIM1 esetében: CCGGTGGTGGTGTCTATCGTTATTGCTCGAGCAATAACGATAGACACCACCATTT TG (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD); és a SAP97 esetében: CCGGCGGGTCAATGACTGTATATTACTCGAGTAATATACAGTCATTGACCCGTTTTT (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD).

A transzdukció kontrolljaként pLKO.1-puro plazmidot (Sigma-Aldrich Ltd.) használtunk, ami egy olyan shRNS inzertet tartalmazott, amely nem kapcsolódik egyetlen ismert génhez sem (mGFP-Orai1-Full-PURO). A géncsendesítés hatékonyságát western-blottal ellenőriztük.

3.12 Immunfluoreszcencia

A FLAG epitóppal jelölt EGFP-Kv1.3 plazmidokat expresszáló HEK tsA-201 és CHO sejteket poly-L-lizinnel bevont lemezekre cseppentettük és 3-4 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, 5 %-os CO₂ mellett. Ezután fixáltuk a sejteket 1%-os formaldehid oldatban, majd egér anti-FLAG M2 antitesttel (1:1000, Sigma Aldrich Ltd, Magyarország) jelöltük. Másodlagos antitestként kecskében termeltetett anti-egér Alexa 647-et (ThermoFisher, Magyarország) adtunk a sejtekhez 1órán keresztül. Végül a lemezeket Fluoromount G-vel (eBioScience, USA) fedtük be. A konfokális képeket Zeiss LSM 510 META és Olympus FV-1000 mikroszkópokkal rögzítettük. He-Ne lézert választottuk az Alexa647 és mCherry (633 és 543nm) gerjesztésére,

valamint argon lézert (488 nm vonal) az EGFP megjelenítésére. A szeletek vastagságát kb. 1µm-re állítottuk be.

3.13 Immunológiai szinapszis létrehozása

A vad típusú (mGFP-Orai1-Full), az N-terminális levágott (mGFP-Orai1-Δ72) Orai1 csatornákat expresszáló Jurkat sejtekhez, illetve a vad típusú Orai1 csatornát expresszáló, de a STIM1 fehérjét (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD) és SAP97 fehérjét (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD) nem tartalmazó, valamint a kontroll shRNS-t (mGFP-Orai1-Full-PURO) tartalmazó Jurkat sejtekhez CD3-CD28 gyöngyöket adtunk (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28, ThermoFisher, Magyarország), hogy immunológiai szinapszist hozzunk létre, majd 200g-n összecentrifugáltuk 1 percig, 37 °C-on [84, 95, 96].

Ezután a sejt-gyöngy párokat poly-L-lizinnel bevont lemezekre cseppentettük és 1, 5, 15, 30 illetve 60 percig inkubáltuk 37 °C-on, 5 %-os CO₂ tartalom mellett. Az inkubáció után a lemezeket jégre tettük és acetonnal fixáltuk 1 percig. Ezt követően 1% BSA-t tartalmazó 1× TBS-sel (25 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl) mostuk a sejteket, majd Alexa-546-falloidinnel (Thermo Fisher Scientific Inc.) jelöltük meg, melyet az IS létrejöttének indikátoraként alkalmaztunk. A falloidot 10% BSA-t tartalmazó, 1× TBS-ben adtuk a sejtekhez, és 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk vele a sejteket. Végül a lemezeket Fluoromount G-vel (eBioScience, USA) fedtük be. A konfokális képeket NIKON Ti2 mikroszkóppal rögzítettük.

Az mGFP-Orai1-Full-PURO, mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD, mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtek mérését párhuzamosan végeztük.

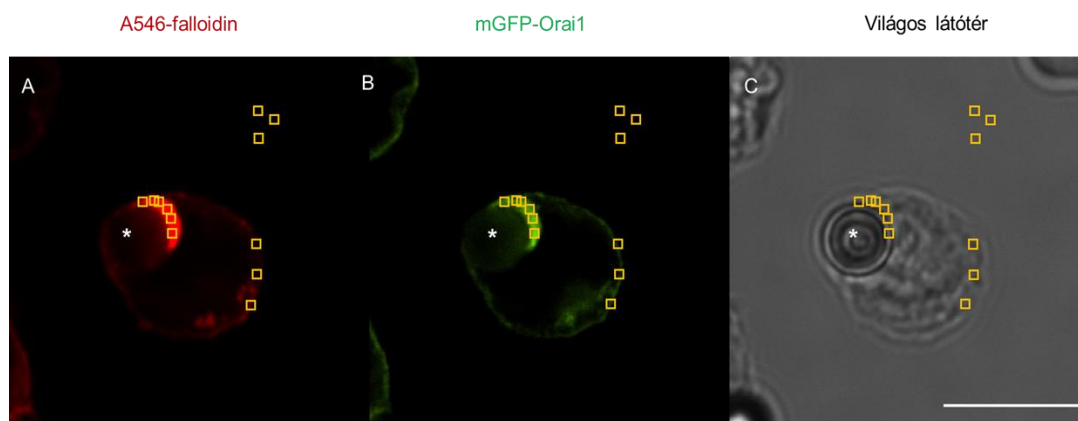
3.14 Konfokális mikroszkópia és kiértékelés

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

Az Orai1 esetében az immunológia szinapszistról készült képeket NIKON Ti2 mikroszkóp segítségével rögzítettük (a szeletek vastagsága körülbelül 1 µm volt). Az mGFP gerjesztéséhez

argon lézer 488 nm-es vonalát, az Alexa 546 esetében az 546 nm-es He-Ne lézergörjesztést alkalmaztunk, és az emittált fényt 505-550nm és 550-640nm sávszűrők segítségével detektáltuk.

Az Orai1-csatornák IS-ben való tartózkodási idejének meghatározásához a CD3-CD28 gyöngyökhöz kapcsolódott Jurkat T-sejtek konfokális képeit rögzítettük az 1., az 5., a 15., a 30. és a 60. percben. Az IS-kialakulásának meglétét a T-sejt F-aktin (Alexa-546-falloidin) polarizációja jelezte, CD3-CD28 gyöngy és a Jurkat sejt érintkezésénél (9. ábra).



9. ábra Az Orai1 csatorna IS-ben történő felhalmozódásának analízise

A szinapszisban tartózkodás kinetikáját úgy határoztuk meg, hogy konfokális képeket készítettünk azon Jurkat sejtekről, melyek a különböző Orai1 konstruktokat fejezték ki. **A)** Az IS-létrejöttének indikátorként Alexa546-falloidin festést alkalmaztunk (piros), hogy kiválasszuk a szinapszisban felhalmozódást mutató **B)** mGFP-Orai1 csatornákat (zöld). **C)** A világos látótér felvételt a sejt-gyöngy pozíciók, illetve a háttér meghatározásához használtuk. A gyöngyöket csillaggal jelöltük. Az ImageJ szoftver segítségével azonos méretű négyzeteket (sárga) rajzoltunk minden képre, azonos helyre a 1) szinapszisban, a 2) szinapszison kívül a sejtre és a 3) háttérre. A skála 10µm hosszú.

A konfokális képek kiértékeléséhez az ImageJ szoftvert használtuk: az A546-falloidinnal jelölt F-aktin szinapszisbeli polarizációja alapján (amely kijelöli a szinapszis helyét) azonos nagyságú négyzeteket rajzoltunk ROI-ként a szinapszisban, a szinapszison kívül (beleértve a membránt és az intracelluláris régiókat) és egy sejtmentes területen háttérként (9. A ábra). Majd ezeket a meghatározott helyzetű ROI-kat használtuk az mGFP fluoreszcens csatorna esetében az mGFP-Orai1 felhalmozódásának meghatározására (9. B ábra). Az akkumulációt a következő egyenlettel határoztuk meg:

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

ahol egy sejtet akkor tekintettünk Orai1-polarizáltnak, ha az akkumulációs aránya (AA) 1,5-nél magasabb volt [13, 84].

3.15 Intracelluláris kalcium mérés

Az Orai1-et kifejező, különböző JurkaT-sejteket poly-L-lizinnel bevont üvegaljú petrikbe helyeztük színtelen RPMI médiummal együtt, majd 1 μ M FURA-2 acetoxi-metilészterrel (Thermo Fisher Scientific Inc.) megtöltöttük és inkubáltuk 25 percig, 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett.

A sejteket 2mM Ca²⁺-ot tartalmazó oldattal mostuk (143,3 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 10 mM HEPES, 5,5 mM glükóz, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) és az inverz fluoreszcens mikroszkóp ~35-37°C-ra fűtött mintatartójába helyeztük. A sejteket 2mM-os Ca²⁺ oldattal, majd 0mM-os Ca²⁺ oldattal (143.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 10 mM Hepes, 5.5 mM glükóz, 1 mM MgCl₂, 0.1mM EGTA) perfundáltuk. Ezután 1 μ M thapsigargin-t (TG) (Thermo Fisher Scientific Inc.) tartalmazó 0mM-os Ca²⁺ oldatot adtunk a sejtekhez az endoplazmatikus retikulum (ER) Ca²⁺ raktárainak kiürítésére. A Ca²⁺ visszaadása során, az 1 μ M thapsigargin-t (TG) tartalmazó 2mM-os Ca²⁺ oldattal való perfundálással aktiváltuk a Ca²⁺ beáramlását a SOCE-n keresztül.

A mérésekhez NIKON ECLIPSE Ts2R mikroszkópot használtunk, amelyet VisiChrome High Speed Polychromator-ral (Visitron Systems GmbH) kombináltunk. A FURA-2 festék excitációjához és emissziójához 340- és 380 nm gerjesztési szűrőket ill. 510 nm-es emissziós szűrőt használtunk. A képeket PCO Edge 4.2 sCMOS kamerával rögzítettük 10

másodpercenként. A képek kiértékelését VisiView® Imaging szoftver (Visitron Systems GmbH) segítségével végeztük. A kiértékelés során csak az mGFP-t expresszáló sejteket vettük figyelembe.

3.16 Kalcium mérése az immunológiai szinapszisban

Az Orai1 vad típusú csatornát (mGFP-Orai1-Full), az N-terminális deléciós csatornát (mGFP-Orai1- Δ 72), a kontroll shRNS-sel transzfektált (mGFP-Orai1-Full-PURO), illetve a SAP97 fehérjét nem tartalmazó (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD) és az Orai1 vad típusú csatornát stabilan expresszáló Jurkat sejteket poly-L-lizinnel bevont üvegaljú petrikbe helyeztük. Ezután 1 μ M FURA-2 acetoxi-metil-észterrel (Thermo Fisher Scientific Inc.) töltöttük meg, majd 25 percig, 37°C-on inkubáltuk őket fenol-red mentes RPMI médiumban (10% FBS, 2 mM L-glutamin, 1 mM Na-piruvát, 200 egységnyi penicillin/sztreptomicin). A sejteket ezután fenol-red mentes RPMI médiummal mostuk és a fluoreszcens mikroszkópba helyeztük a mérés megkezdésekor. A kalcium mérését a már korábban leírtak szerint, 37 °C-on hajtottuk végre. A szinapszis képzéshez CD3-CD28 gyöngyöket (Dynabeads™ Human T activator, Thermo Fisher Scientific Inc.) pipettáztunk a sejtekhez majd a gyöngyökkel való kapcsolódástól számított 90 percen keresztül rögzítettük a sejtek kalcium válaszát.

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

3.17 Elektrofiziológia

A Kv1.3 plazmidokkal transzfektált (HEK tsA-201 és) CHO sejteket normál extracelluláris oldattal (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz, 10 HEPES, pH: 7,35) mostuk és 35mm átmérőjű petrikbe cseppentettük. A Kv1.3 ionáramokat whole cell

(teljes-sejt) és outside-out konfigurációban mértük Axopatch 200B erősítő (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) és a pClamp nevű szoftver (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) segítségével. A pipettát belső oldattal (140 mM KF, 11 mM EGTA, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and 10 mM HEPES (pH 7,20, ~295 mOsm) töltöttük fel. A mérésekhez használt tetraetil-ammóniumos (TEA) oldat a következőket tartalmazta: 100mM TEA-Cl, 45mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂, 5,5mM glükóz, 10mM HEPES (pH 7,35, 305 mOsm). A gating-current (kapuzási áram) és single channel (egyedi-csatorna) mérésekhez használt külső oldat nem tartalmazott Na⁺-ot (145 mM kolin-Cl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES (pH 7,35 , 305 mOsm), mivel néhány CHO sejt befelé folyó Na⁺ áramot expresszált. Az A413V mutáns mérésekor P/5 online protokoll segítségével korrigáltuk a szivárgási áramot (leak), illetve minimalizáltuk a kapacitív tuskét. A sejteken történő oldatcserét a gravitáció által hajtott perfúziós rendszer segítségével valósítottuk meg, folyamatos elszívás mellett.

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

Az áram aktivációs kinetikáját a Hodgkin-Huxley modell segítségével illesztettük meg ($I(t)=I_a \times (1 - \exp(-t/\tau_a))^4 + C$, ahol I_a az aktivációs áram komponens amplitúdója; τ_a az áram aktivációs időállandója; C : konstans) az áramgörbe emelkedő szakaszára, amelyet 15 ms hosszú +50mV-ra történő depolarizáció idézett elő. Egy adott T-sejt aktivációs időállandóját a három egymást követő, 15 másodpercenként megismételt depolarizáció során kapott időállandók átlagaként határoztuk meg. P/5 protokollt alkalmaztunk a szivárgási áram minimalizálására.

Az inaktivációs áram kinetikájának meghatározásához egyetlen exponenciális függvényt illesztettünk ($I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_{in}) + C$, I_0 : áram amplitúdója, τ_{in} : inaktivációs időállandó; C : a whole cell (teljes- sejt) áramának egyensúlyi állapota az impulzus végén) az áramgörbe csökkenő szakaszára, amelyet 2 másodperc hosszan, -120mV tartási potenciálról +40mV-ra depolarizáltunk. Egy adott T-sejt inaktivációs időállandóját úgy határoztuk meg, mint τ_a esetében, azzal az eltéréssel, hogy az impulzusokat 60 másodpercenként adtuk a sejtre.

A steady-state (egyensúlyi) aktiváció feszültségfüggését az alábbiak szerint kaptuk meg. A sejteket -120mV holding (tartó) potenciálon tartottuk, és depolarizáltuk különböző tesztpotenciálokra -70 és +50mV között, 10mV-os lépésekben, 30 másodpercenként. A whole-

cell (teljes-sejt) vezetőképességének csúcsát ($G(V)$) az egyes tesztpotenciálokon egy adott V tesztpotenciál csúcsárama (I_p), és a K^+ megfordítási potenciál ($E_r = -85\text{mV}$) alapján számítottuk ki $G(V)=I_p/(V-E_r)$. A $G(V)$ értékeket a maximális vezetőképességre normáltuk, és a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk, és az adatpontokra a Boltzmann-függvényt illesztettük: $G_N=1/(1+\exp[-(V-V_{1/2})/k])$, ahol G_N a normált vezetőképesség, V a tesztpotenciál, $V_{1/2}$ a fél-aktivációs feszültség, és k a függvény meredeksége.

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

3.18 Áramlási citometria

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

3.19 Statisztikai analízis

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

A szinapszisban polarizált-sejtek arányának összehasonlítására Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk. Az AA értékek és Ca^{2+} csúcsok számának összehasonlításához minden mintánál egyszempontos varianciánalízist (one-way ANOVA), vagy Mann-Whitney próbát (rank sum test) használtunk. A szignifikancia szintet 0.05-nek választottuk. Minden egyes időpont és minden egyes sejtvonala esetén legalább három napon ($N \geq 3$) gyűjtöttük az adatokat, és a sejtek száma minden nap magasabb volt, mint 9 ($n \geq 9$).

4 Eredmények

4.1 A HRET(E) szekvencia szerepe a Kv1.3 csatorna membrán-expressziójában és kapuzásában

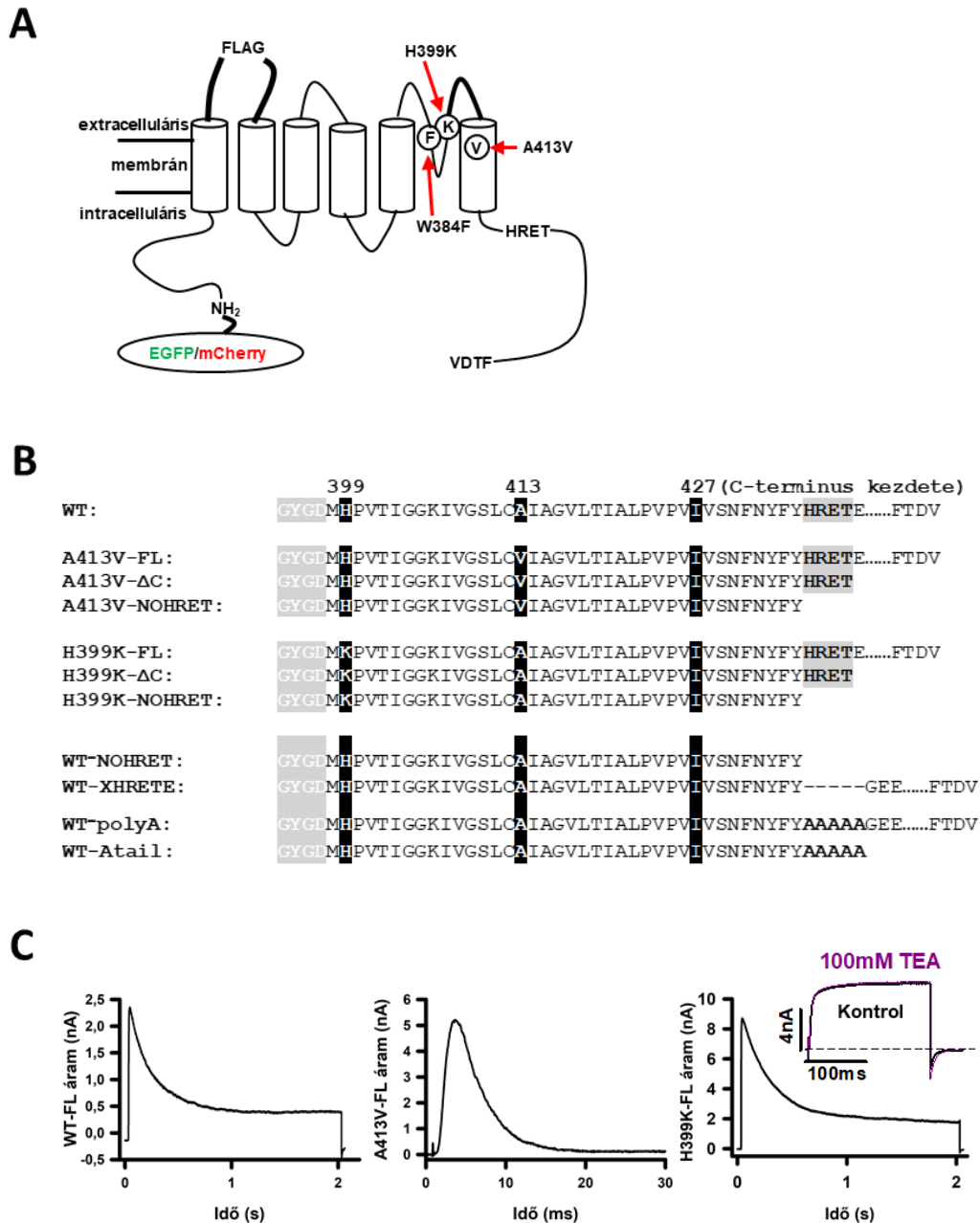
4.1.1 Stratégiai szempontok a Kv1.3 konstruktok megtervezéséhez

Munkánk során három stratégiát alkalmaztunk CHO sejtekbe transzfektált Kv1.3 alegységek egyedi azonosítására. Először az S6-ban, a 413. pozícióban lévő alanint elmutáltuk valinra (A413V), amelyről kimutatták, hogy drámai módon felgyorsítja az A413V homomerek inaktivációs kinetikáját a vad típusú csatornához képest ($\tau_{\text{inakt.A413V}}=4\text{ms}$, $\tau_{\text{inakt.WT}}=200\text{ms}$) (10. A-C ábrák) [97, 98]. Az A413V és a WT alegységekből álló heterotetramerek köztes inaktivációs kinetikát mutatnak a $\tau_{\text{inakt.A413V}}$ és $\tau_{\text{inakt.WT}}$ között, a tetramer csatornában lévő mutáns alegységek számától függően (ezekről később bővebben beszélünk, 15. ábra). Következésképpen, a heteromer csatornák jelenléte könnyen nyomon követhető a membránban a K^+ áram inaktivációs kinetikájának illesztésével [98].

Másodsorban, a 399-es pozícióban a hisztidint (H) helyettesítettük lizinnel (K), amely TEA (tetraetil-ammónium)-rezisztens fenotípust eredményezett (amint azt korábban munkacsoportunkban leírták) (10.C ábra) [99-101]. A TEA-szenzitív ($K_d \approx 11.4\text{mM}$) és az inszenzitív ($K_d \approx 2000\text{mM}$) Kv1.3 alegységek összeszerelődése módosítja a heterotetramerek TEA iránti affinitását, ezért a heteromultimer képződés könnyen azonosítható 100mM TEA alkalmazásával [99].

Harmadszor, az immuncitokémiai kísérletekhez olyan konstruktokat használtunk, amelyeknél az S1 és S2 szegmens között lévő extracelluláris hurokba a FLAG inzertet illesztettünk. A FLAG epitóp beillesztése nem változtatja meg drámaian a Kv1.3 korábban bemutatott tulajdonságait, de lehetővé teszi a plazmamembránban elhelyezkedő csatornák jelölését.

Ezeket a módosításokat különféle, a C-terminuson végrehajtott mutációkkal (pontmutáció, deléción) kombináltuk. Minden konstrukttal esetében a csatornafehérjéket az N-terminálison EGFP-vel fúzionáltuk. A C-terminálison lévő deléciónkat egy a „HRET” szekvencia után (ΔC - vel jelölt konstrukttal) vagy a „HRET” szekvencia előtt (NOHRET végződésével jelölt) bevezetett stop kodon segítségével hoztuk létre (10. A és 10. B ábra).



10. ábra A Kv1.3 ioncsatorna pont- és C-terminális mutánsai

A) A vad típusú Kv1.3 csatorna egy alegységének sematikus illusztrációja, amelyen a következőket tüntettük fel: az N-terminálishoz fúzionált EGFP/mCherry, FLAG epitóp, a pontmutációk helye (H399K, A413V, W384F), HRET szekvencia és a C-terminális négy utolsó aminosava (FTDV). B) A vad típusú Kv1.3 és mutáns Kv1.3 csatornák aminosav szekvenciái, a 394. aminosavtól kezdve (.....: a C-terminális azon részét jelöli, amelyek nem relevánsak a kísérletek szempontjából). Az aminosavakat a megfelelő egybetűs jelölésükkel tüntettük fel. FL: teljes hosszúságú C-terminus, ΔC: a C-terminális eltávolítása a 439. aminosav után, NOHRET: trunkáció a 435. pozíció után, XHRETE: deléciós mutáns, ahol a csak HRETE

szekvenciát kivágtuk, polyA: a HRETE szekvenciát AAAAA aminosavakra cseréltük, Atail: a HRETE szekvenciát AAAAA aminosavakkal cseréltük ki és a C-terminus tovább részét levágtuk. A C-terminális kezdőpontját a 427. aminosav jelöli. C) A teljes-hosszúságú C terminálist tartalmazó vad típusú (WT-FL (bal oldal)), A413V mutáns (A413V-FL (középső)) és H399K mutáns (H399K-FL (jobb)) csatornák árama. WT-FL (outside-out konfiguráció): a sejteket +50mV-ra depolarizáltuk, -120mV-os holding (tartó) potenciálról, 2 másodpercen keresztül. A413V-FL (teljes-sejt konfiguráció): a sejteket -120mV-on tartottuk, majd +50mV-ra depolarizáltuk 30 milliszekundumig. H399K (teljes-sejt konfiguráció): a sejteket +50mV-ra depolarizáltuk, -120mV-os holding potenciálról, 2 másodpercen keresztül. Betét ábra: teljes-sejt áram a H399K-FL-t expresszáló sejtben, ahol -120mV tartópotenciálról 0mV-ra depolarizáltunk, 200ms-on hosszan, 100mM TEA jelenlétében, illetve nélküle.

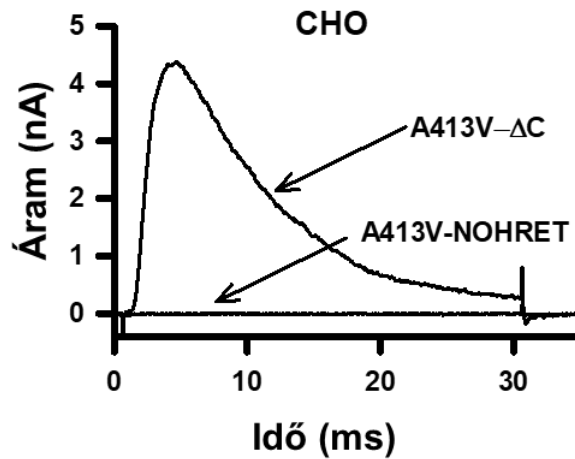
4.1.2 A C-terminális régió deléciója nem csökkenti a Kv1.3 csatornák áramát

Számos tanulmány számolt be arról, hogy a Kv-csatornák C-terminálisának eltávolítása drasztikusan befolyásolja a csatorna sejtmembránbeli expresszióját, és hogy a „HRET” szekvencia döntő fontosságú a membránban történő kifejeződéshez [68]. Ennek tesztelésére Kv1.3 A413V- Δ C és A413V-NOHRET konstrukciókat CHO sejt vonalakban expresszáltuk. Munkánk során a Δ C kifejezés olyan konstruktra utal, amelyet közvetlenül a HRET-motívum (Δ 439-523 aminosav) után trunkáltunk, míg a NOHRET azt jelzi, hogy a konstruktból hiányzik a teljes C-terminális, beleértve a HRET motívumot is (Δ 435-523).

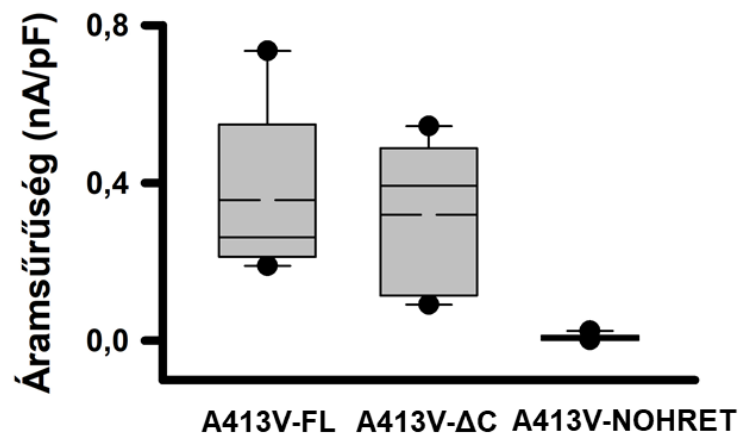
A 11. A ábra mutatja, hogy az A413V- Δ C konstrukció expressziója robusztus teljes-sejt áramot eredményezett, amelynek gyors inaktivációs kinetikája van, amint azt a teljes hosszúságú, homotetramer A413V esetében láthattuk (10.C ábra). Az A413V-NOHRET konstrukttal, azonos körülmények között transzfektált CHO sejteken nem detektáltunk feszültség- és időfüggő áramot. Az áramsűrűségeket (CD, csúcsáram +50mV-nál normalva a teljes-sejt kapacitásra) összehasonlítva az A413V-FL ($CD_{FL} = 0,36 \pm 0,1$ nA / pF, n=5) és az A413V- Δ C ($CD_{\Delta C} = 0,32 \pm 0,09$ nA / pF, n = 5) között nem tapasztaltunk szignifikáns

különbséget, azonban az A413V-NOHRET-nél igen ($CD\ NOHRET = 0,008 \pm 0,002\ nA / pF$, $n = 10$) (11.B ábra).

A



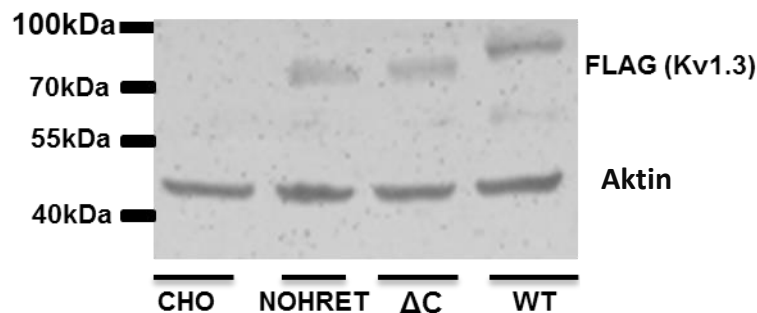
B



11. ábra Tipikus áramgörbék az A413V mutánsokon CHO sejtekben.

A) Reprezentatív áramgörbék az EGFP-vel fúzionált A413V- Δ C és A413V-NOHRET konstrukciókkal transzfektált CHO sejtekben, 30 ms hosszú, -120mV holding potenciálról +50mV-ra történő depolarizáció során. B) Boxplot diagram CHO-ban mért áramsűrűségről a teljes hosszúságú (A413V-FL), a C-terminálisán deletált (A413V- Δ C) és az A413V-NOHRET esetében. Az átlagot (szaggatott vonal), mediánt (folytonos vonal), alsó és felső kvartilist, a minimum és maximum értéket tüntettük fel. Az áramsűrűséget az anyagok és módszerek részben leírtak szerint határoztuk meg.

Továbbá western-blot alkalmazásával megvizsgáltuk azt is, hogy fehérje szinten megfelelően letermelődnek-e a különböző csatorna variánsok. Ehhez az S1-S2 közé beillesztett FLAG epitóppal rendelkező mutánsokat használtuk. A 12. ábra egyértelműen szemlélteti, hogy a három FLAG-es konstrukt bármelyikével transzfektált CHO-sejtek megfelelő méretű (85-95 kDa közötti), EGFP-vel jelölt Kv1.3 csatorna alegységet expresszálnak



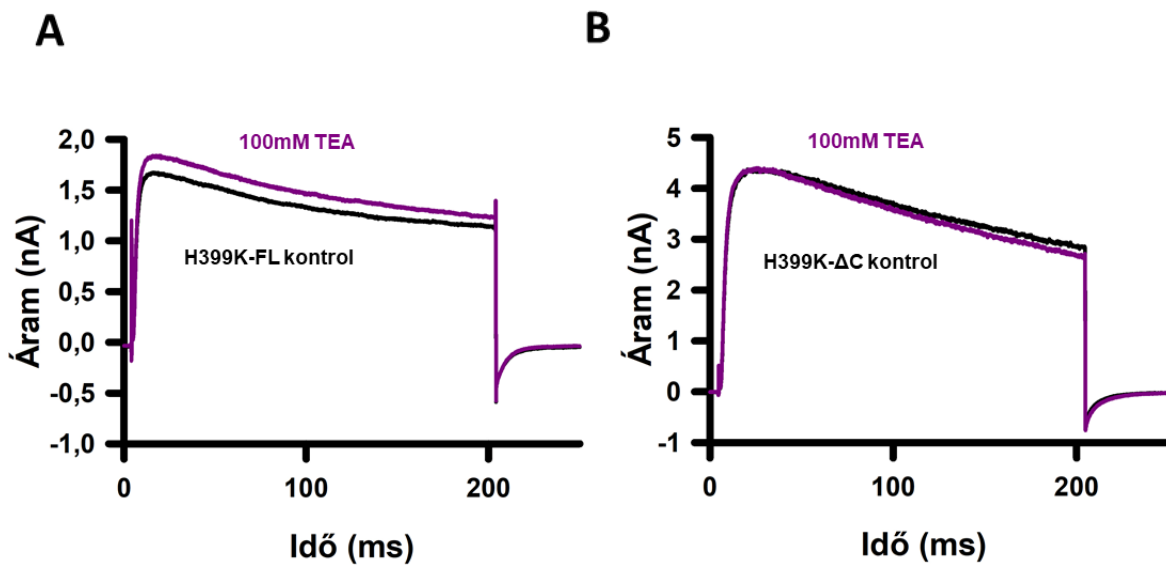
12. ábra Western blot kísérletek a FLAG-et expresszáló Kv1.3 konstruktok esetében

A CHO sejteket FLAG-et tartalmazó A413V-FL, A413V- Δ C vagy A413V-NOHRET plazmidokkal transzfektáltuk. A kísérlet kontroljaként aktin jelölést használtunk. Az EGFP-vel jelölt Kv1.3 alegységek és a FLAG epitóp együttes becsült mérete 85-95 kDa között van a különböző konstruktok esetében, az aktin mérete 42 kDa. A marker ProSieve QuadColor fehérje marker volt (4,6 kDa - 300 kDa).

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

A K⁺ áram expressziójára kifejtett mutáció-specifikus hatások (A413V) kizárására alternatív, farmakológiai megközelítést alkalmaztunk annak megismerésére, hogy a C-terminálisán csonkolt csatornák képesek-e kijutni a plazma membránba. A TEA (tetraetil-ammónium), a különböző K⁺ csatornák általános inhibitora, gyors, nyitott-csatorna blokkoló, melynek affinitása a pórusrégió extracelluláris szájában lévő aromás aminosav oldalláncától függ [100, 102]. Korábban munkacsoportunk tagjai kimutatták, hogy a Kv1.3-ban a TEA-kötő, 399. pozícióban lévő hisztidin (H399) pozitív töltésű aminosavvá (pl. lizin, (K)) történő mutációja egy teljesen TEA-érzékeny csatornához vezetett [103]. Eredményeink is egyértelműen bizonyították, hogy a FLAG- H399K-FL (H399K mutációval rendelkező, teljes

hosszúságú, FLAG-es) mutáns CHO-sejtekbe transzfektálva, 100 mM TEA jelenlétében sem csökken a csatornák árama ($RF = 0,95 \pm 0,01$, $n = 5$) (13.A ábra). Amikor a CHO sejteket FLAG-H399K- ΔC plazmival transzfektáltuk, a teljes hosszúságú H399K konstrukthoz hasonló áramgörbéket rögzítettünk és TEA rezisztens áramot kaptunk ($RF = 0,98 \pm 0,01$, $n = 5$) (13.B ábra). A C-terminális HRET-szekvenciát is magába foglaló delécioja (FLAG-H399K-NOHRET) olyan fenotípust eredményezett, amely nem expresszál kifelé irányuló K^+ áramot, ahogyan azt az A413V mutáns esetében már korábban leírtuk (a disszertációban nem került bemutatásra).



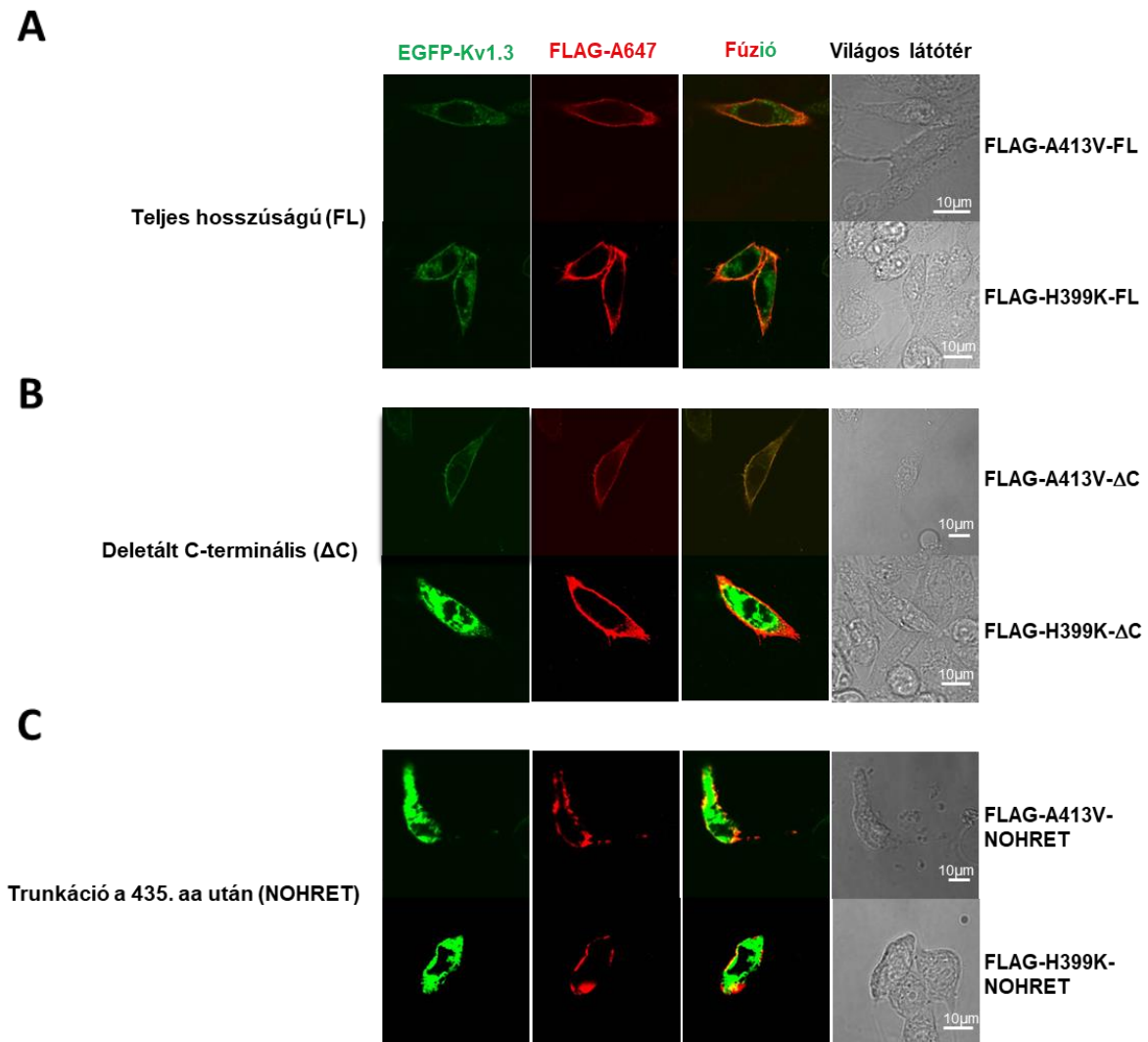
13. ábra A H399K- ΔC áram TEA inszenzitív

A) H399K-FL (EGFP-vel és FLAG-el jelölt) csatornák teljes-sejt áramgörbéi CHO sejtekben: 0 mV-os (nem +50mV, hogy csökkentsük a teljes-sejt áramot), 200ms hosszú impulzusokkal depolarizáltuk a sejteket, a tartópotenciál -120 mV volt. Kontrol extracelluláris oldat: fekete vonal, 100mM TEA: lila vonal. **B)** H399K- ΔC csatornát (EGFP-vel és FLAG-el fuzionált) expresszáló CHO sejten rögzített teljes-sejt áram, 100mM TEA jelenlétében (lila) és hiányában (fekete). Ugyanazt a feszültség protokollt alkalmaztuk, mint az A) pontban.

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy mind a kinetikailag (A413V) mind a farmakológiailag (H399K) jelölt, C-terminális deletált Kv1.3 csatorna alegységek (A413V- Δ C és H399K- Δ C) funkcionális homotetramer csatornákat képeznek a membránban. Azonban azokon a csatornákon, ahol a C-terminális HRET szekvenciáját is levágtuk (azaz A413V-NOHRET, H399K-NOHRET), nem tudtunk teljes-sejt áramokat rögzíteni. Ez utóbbi lehet a konstrukciók nem megfelelő kifejeződésének következménye, vagy adódhat a vezetőképesség, ill. funkció elvesztéséből.

4.1.4 A NOHRET csatornák kijutnak a sejtmembránba

Ezután megvizsgáltuk, hogy a sejtmembránban kifejeződnek-e az olyan C-terminálisán „csonkolt” konstrukciók, amelyekből hiányzik a „HRET” motívum. Az intracelluláris N-terminálisán EGFP-vel konjugált, pont- és deléciós mutáns Kv1.3 alegységekbe extracelluláris FLAG epitópot klónoztunk (FLAG-H399K-FL, FLAG-H399K- Δ C, FLAG-H399K-NOHRET és FLAG-A413V-FL, FLAG-A413V- Δ C, FLAG-A413V-NOHRET). A csatorna alegységek lokalizációját konfokális fluoreszcenciás mikroszkóppal detektáltuk. A FLAG-epitópot tartalmazó teljes hosszúságú (FL), H399K és A413V mutáns Kv1.3 csatornákat sikerült anti-FLAG antitesttel megjelölni CHO sejtekben, amely a csatorna membránban történő kifejeződését bizonyítja (14.A ábra). Ugyanezt figyelhettük meg mindkét Kv1.3 pont mutánsnál (A413V, H399K), a Δ C illetve a NOHRET deléciós mutáns esetében is (14.B és 14.C ábra). Habár a C-terminális deletált csatornák intracelluláris retenciója megnövekedett a teljes hosszúságú csatornához képest, a Δ C és NOHRET csatornák képesek a sejt membránjában kifejeződni. Ezek az adatok mind alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a Kv1.3 csatornák a „HRET” motívum nélkül is eljuthatnak a membránba, és nem a membránbeli expresszió, hanem a csatorna kapuzása/vezetőképessége módosul a C-terminális deléció hatására.



14. ábra *Reprezentatív mikroszkópos képek az EGFP- és FLAG fúzionált Kv1.3 mutáns csatornákról CHO-ba transzfektálva*

CHO sejtek, amelyek expresszálják A) az A413V-FL/ H399K-FL, B) az A413V-ΔC/H399K-ΔC C-terminálisan deletált csatornákat és a C) A413V-NOHRET/H399K-NOHRET csatornákat. Az első oszlop a Kv1.3 csatornák EGFP jelét mutatja. A sejteket anti-FLAG antitesttel és Alexa Fluor 647 GAMIG másodlagos antitestekkel jelöltük, hogy ellenőrizzük a csatorna kijutását a plazmamembránba (második oszlop). A harmadik oszlop: a zöld (EGFP) és piros (FLAG) fluoreszcens csatornák fúziója látható, a negyedik oszlop: sejtek világos látótér felvétele.

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

Az mCherry-vel jelölt, vad típusú, teljes hosszúságú Kv1.3 csatornákat transzfektáltuk az EGFP-A413V-NOHRET plazmid mutánsokkal együtt 1 : 1 arányban, és megvizsgáltuk, hogy a WT alegységek jelenléte képes-e kompenzálni az A413V-NOHRET alegységeket tartalmazó csatornák vezetőképességét CHO sejtekben. Feltételezve, hogy a tetramer csatornák véletlenszerűen állnak össze az egyes alegységekből, az 1:1 ko-transzfekeció aránynak túlnyomórészt (87,5%) olyan heteromer csatornákat kell eredményeznie, amelyeknek az inaktivációs kinetikája a WT és az A413V közötti lesz (15. ábra) [97].

A

Homomer csatornák

A413V

WT



$$\tau_{i,4}=4 \text{ ms}$$

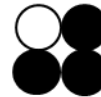
$$\tau_{i,0}=200 \text{ ms}$$

6,25%

6,25%

B

Heteromer csatornák



$$\tau_{i,1}=11 \text{ ms}$$

$$\tau_{i,2}=28 \text{ ms}$$

$$\tau_{i,3}=75 \text{ ms}$$

25%

37,5%

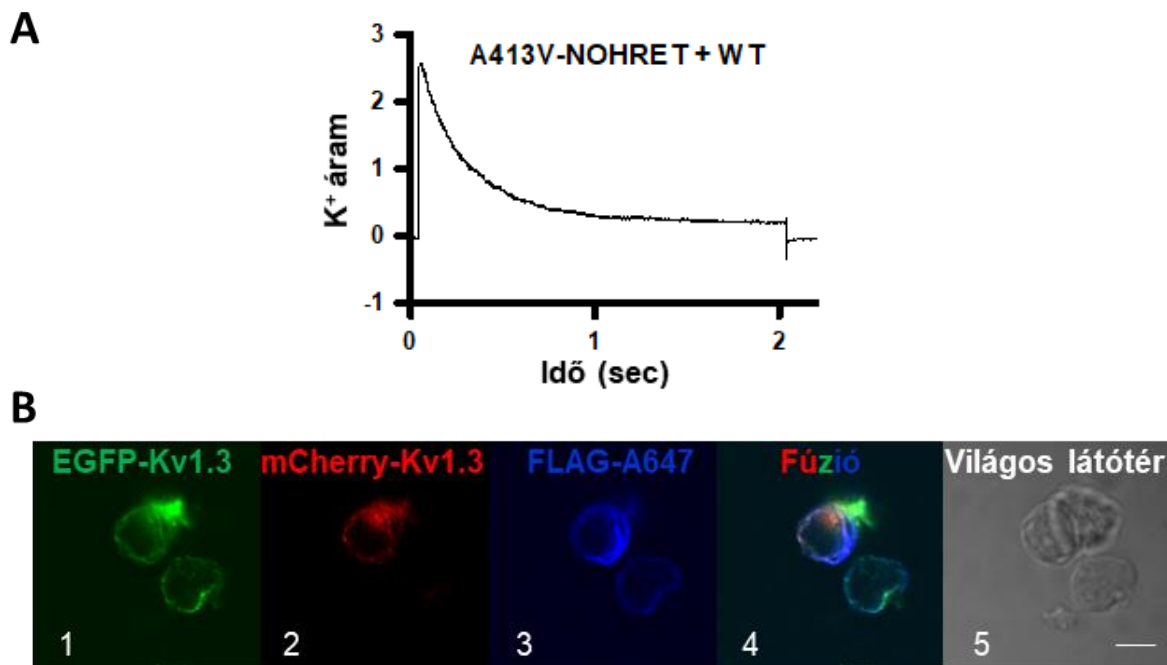
25%

15.ábra A homotetramer és heterotetramer csatornák összeszerelődése WT és A413V alegységek ko-transzfekeciója során

A WT és A413V alegységek heterotetramerei 11ms (3 A413V és 1 WT alegység), 28ms (2-2 A413V és WT) és 75ms (1 A413V és 3 WT alegység) inaktivációs időállandóval ($\tau_{i,m}$) rendelkeznek (itt feltételeztük, hogy $\tau_{i,0} = 200\text{ms}$ WT homomereknél és $\tau_{i,4}=4\text{ms}$ A413V homomereknél).

Ezzel ellentétben, azt tapasztaltuk, hogy az A413V-NOHRET és a WT-Kv1.3 csatornákat egyaránt expresszáló CHO sejtek olyan áramokat mutatnak, amelyek hasonlítanak a teljes hosszúságú WT csatornák áramhoz, és nem többféle heteromer áram „keverékeként” jelennek meg, amelyet különféle inaktivációs időállandók jellemeznek (16.A ábra.) A csak mCherry-WT-Kv1.3 csatornát expresszáló sejtek áramsűrűsége (3390 ± 1110 pA/pF) jóval magasabb volt, mint az mCherry-WT-Kv1.3 és az EGFP-A413V-NOHRET együttes transzfekciójakor detektálható áramoké (1010 ± 311 pA/pF, $p = 0,028$).

Ezen kívül a CHO sejteket FLAG-jelölt A413V-NOHRET (EGFP-konjugált) és WT-Kv1.3 (mCherry konjugált) keverékével transzfektáltuk, és anti-FLAG jelölésnek vetettük alá őket: a mikroszkópos felvételeken egyértelműen látszik, hogy a csatorna képes kijutni a membránba (16.B ábra).

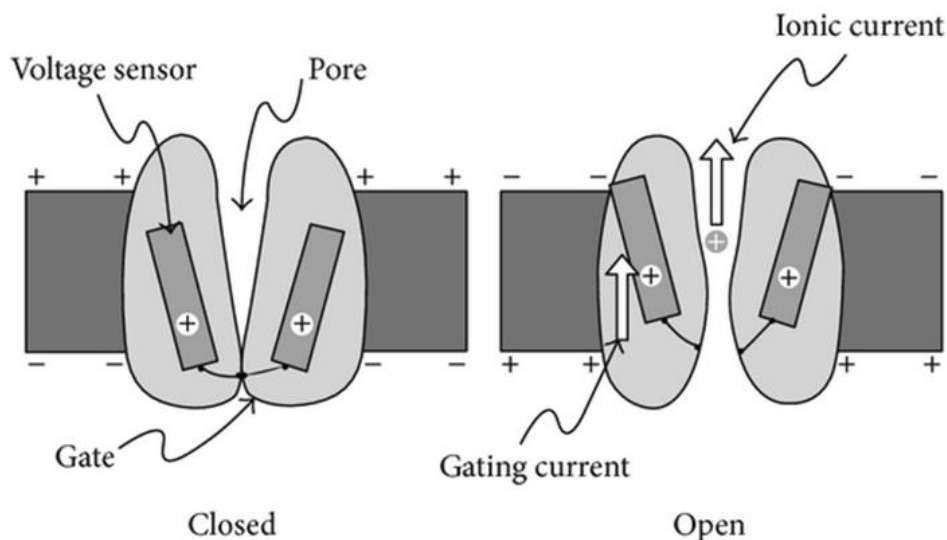


16. ábra Az A413V-NOHRET és WT csatornák ko-transzfekciója

A) A homomer és heteromer csatornák keverékének teljes árama CHO sejtekben a mCherry-Kv1.3-WT és EGFP-A413V-NOHRET 1:1 arányú ko-transzfekciója során (+50mV depolarizációval, -120mV tartó feszültségről). **B)** Reprezentatív konfokális képek a FLAG-jelölt, EGFP-vel fúzionált (zöld) A413V-NOHRET és mCherry-vel fúzionált WT-Kv1.3 (piros) membránexpressziója. **B1)** EGFP-vel fúzionált A413V-NOHRET (zöld), **B2)** az mCherry-vel fúzionált WT-Kv1.3 (piros), **B3)** anti-FLAG jelölés a FLAG-jelölt, EGFP-vel fúzionált A413V-NOHRET csatornák miatt, A647 másodlagos antitest konjugációjának segítségével (kék), **B4)** a három fluoreszcens csatorna fúziója, **B5)** sejtek a világos látótérben.

4.1.6 A NOHRET csatornák kapuzási árama hiányzik

Annak feltárására, hogy a vezetőképesség vagy az aktivációs kapu sérült-e a HRET eltávolításakor a NOHRET Kv1.3 csatornában, WT-NOHRET Kv1.3 csatornák kapuzási tulajdonságait vizsgáltuk meg CHO sejtekben (17. ábra) [104].

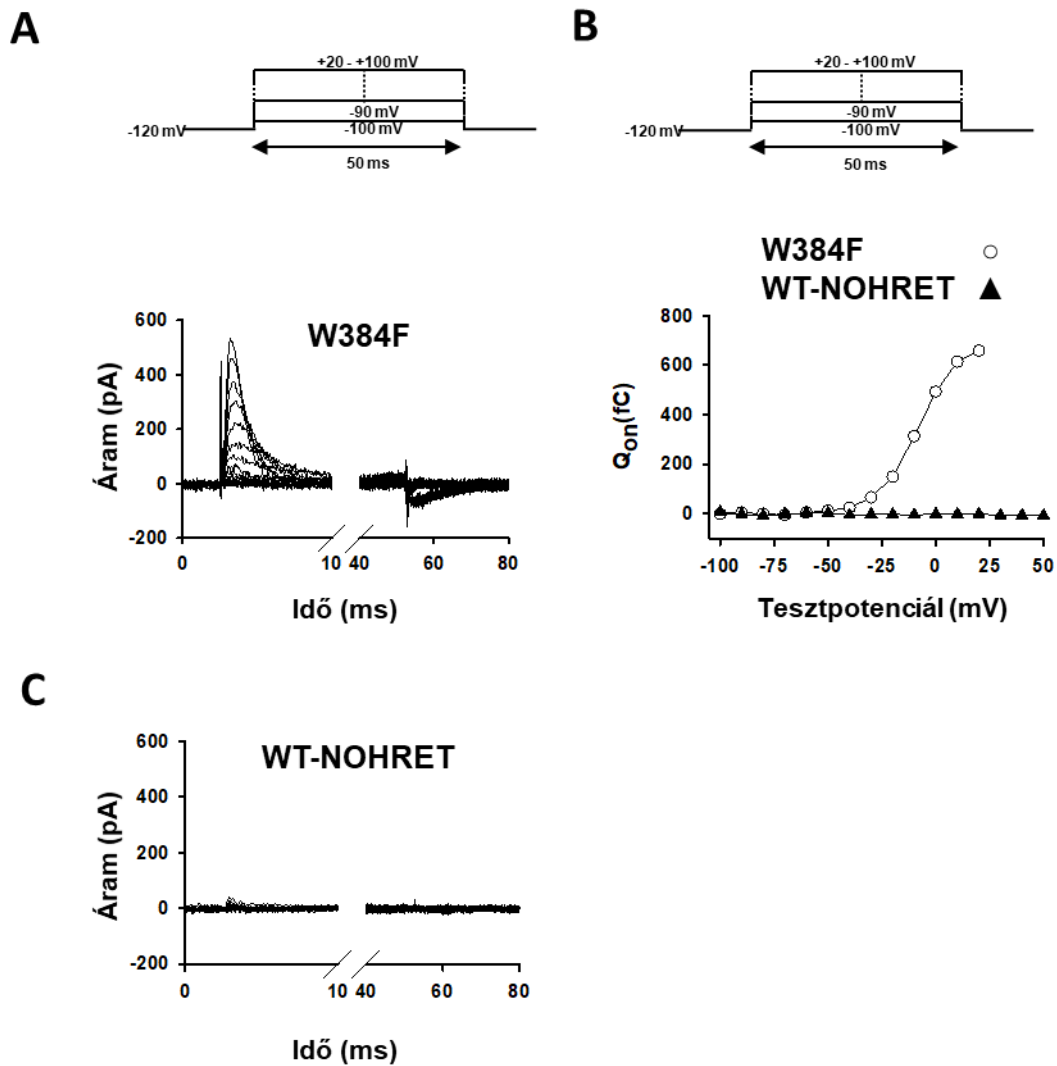


17. ábra A kapuzási áram szemléltetése/magyarázata [102]

A kapuzási áram a Kv1.3 feszültség szenzorában elhelyezkedő pozitív töltésű aminosavak (gyakorlatilag az S4 szegmens) elmozdulásának eredményeképp jön létre a membrán depolarizáció és repolarizáció során.

Pozitív kontrollként a Kv1.3-W384F pontmutáns csatornát fejeztük ki CHO-ban, amely a Kv1.3 nem vezető mutánsa (homológ a Shaker csatorna nem vezető W434F mutánsával) [105-110]. A kísérletek során a Kv1.3-W384F-et stabilan expresszáló CHO-sejteket használtuk, amelyeknél rögzítettük a kapuzási áramokat (mind a 11 sejtben) (18.A ábra). A reprezentatív Q_{on} -V görbe a 18. B ábrán szemlélteti az integrált kapuzási áram (teljes töltésmennyiség a csatornanyitás során) membránpotenciál-függésének szigmoid alakját, amely a feszültség-kapuzott ioncsatornák jellemzője, és rámutat a feszültség-érzékelő funkcionalitására. A WT-NOHRET csatornát expresszáló CHO sejtekben nem tudtunk kapuzási áramot ($n = 9$) mérni, vagy csak minimális kapuzási áramot tudtunk detektálni egy magasabb feszültségre depolarizálva (+50mV vagy magasabb tesztpotenciálon) (18.C ábra). Mindez azt jelzi, hogy ha a C terminálist a HRET szekvenciával együtt távolítjuk el a Kv1.3

csatornában, akkor a csatorna feszültség-szenzora nem képes elmozdulni a depolarizáció hatására.



18.ábra A WT-NOHRET csatornában hiányzik a kapuzási áram (gating-current)

A) Kapuzási áramok a WT-W384F (nem vezető) mutáns esetében CHO sejtekben. A sejteket -120mV-on tartottuk, majd különböző tesztpotenciálokra depolarizáltuk (-100mV-tól +20/100mV-ra, 10mV-os lépésekben) 50 ms-on keresztül. B) Az A) (WT-W384F) és a C) (WT-NOHRET) panelen rögzített sejtek integrált kapuzási áramának (Q_{on} , on-gating) tesztpotenciál-függése. A Q_{on} -t az anyagok és módszerekben leírtak szerint határoztuk meg. C) Kapuzási áram mérések a CHO sejtekbe transzfektált WT-NOHRET csatorna esetében, az A) részben használt protokoll szerint.

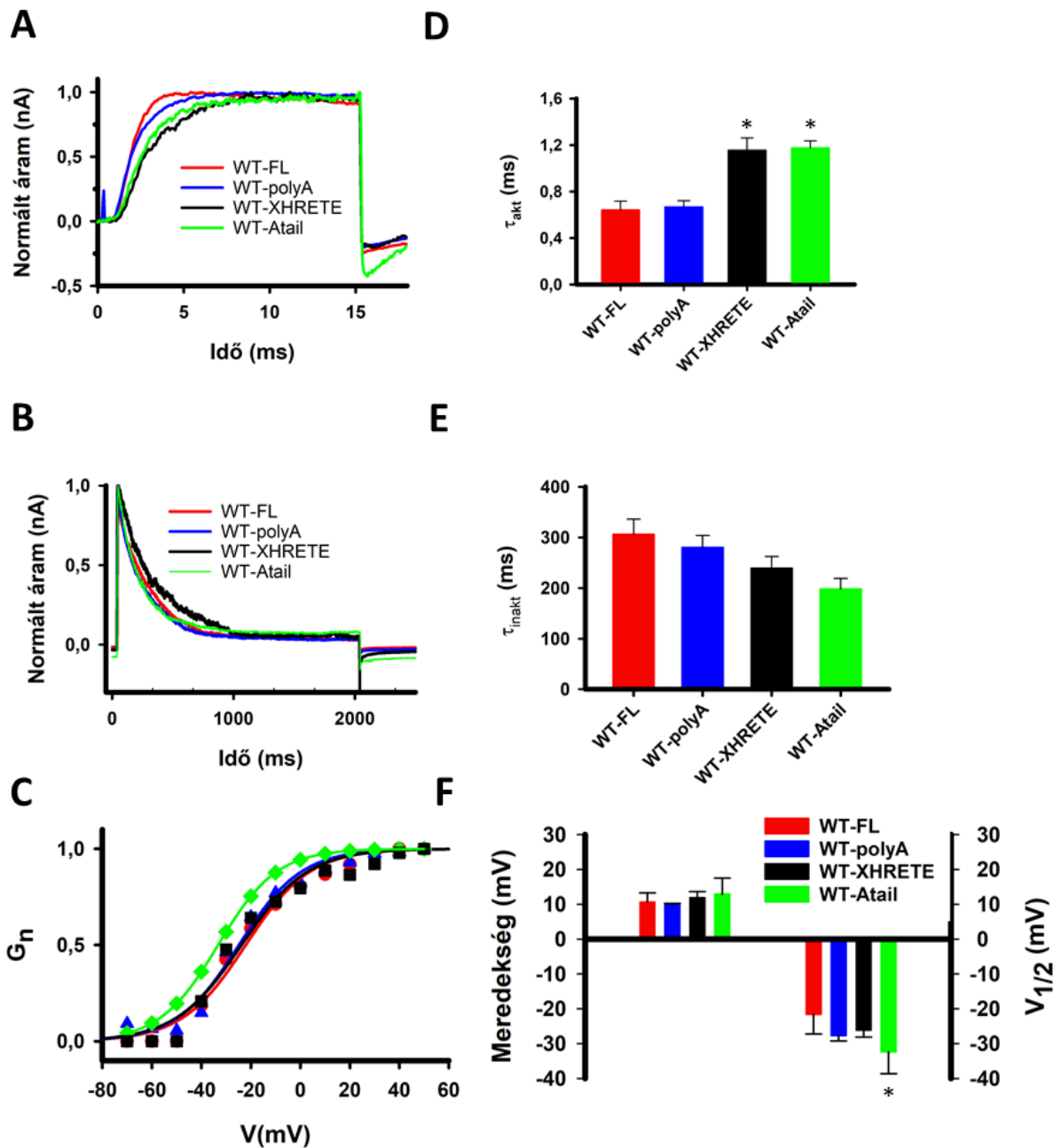
4.1.7 A HRET(E) szekvencia eltávolítása vagy helyettesítése nem befolyásolja a Kv1.3 működését

Ezen eredményektől motiválva - elsősorban a NOHRET konstruktok kapuzási tulajdonságai miatt - a következő mutációkat hajtottuk végre az EGFP-vel jelölt vad típusú Kv1.3-ban (10. ábra):

- 1) a HRET motívum „kiterjesztett” változatát (HRETE) töröltük, a C-terminális többi része megmaradt (WT-XHRETE);
- 2) A HRETE-et öt alaninnal (WT-polyA) helyettesítettük és a C-terminális többi része megmaradt;
- 3) a HRETE szekvenciát 5 alaninnal helyettesítettük a WT- Δ C-ben (WT-Atail), tehát a csatorna C-terminálisának tovább részeit is töröltük (10.B ábra).

Miután transzfektáltuk ezeket a mutánsokat és a teljes hosszúságú vad típusú Kv1.3-at CHO sejtekbe, minden csatornatípus esetében elemeztük az alapvető biofizikai jellemzőket outside-out patch konfigurációban. Eredményeink azt mutatták, hogy a három „HRETE” módosított alegység funkcionális és vezető tetramereket alkotott a CHO sejtmembránban és a kapuzási kinetikában, valamint az egyensúlyi paraméterekben nem találtunk jelentős különbségeket.

Az aktivációs kinetika kissé lassabb volt a WT-XHRETE és a WT-Atail konstrukciónál, összehasonlítva a WT-FL-el ($p < 0,001$ mindkettőnél) (19. ábra A és D), de az inaktivációs kinetika nem változott ($p = 0,13$) (19. ábra B és E). Az egyensúlyi aktiváció félaktivációs feszültsége ($V_{1/2}$) csak a WT-Atail csatornáknál volt különböző ($p = 0,005$, balra tolódott) (19. ábra C és F), de a meredekségi tényező(k) minden HRETE-mutánsnál azonosak voltak (WT-polyA, WT, WT-XHRETE, $p = 0,284$) (19. F ábra).

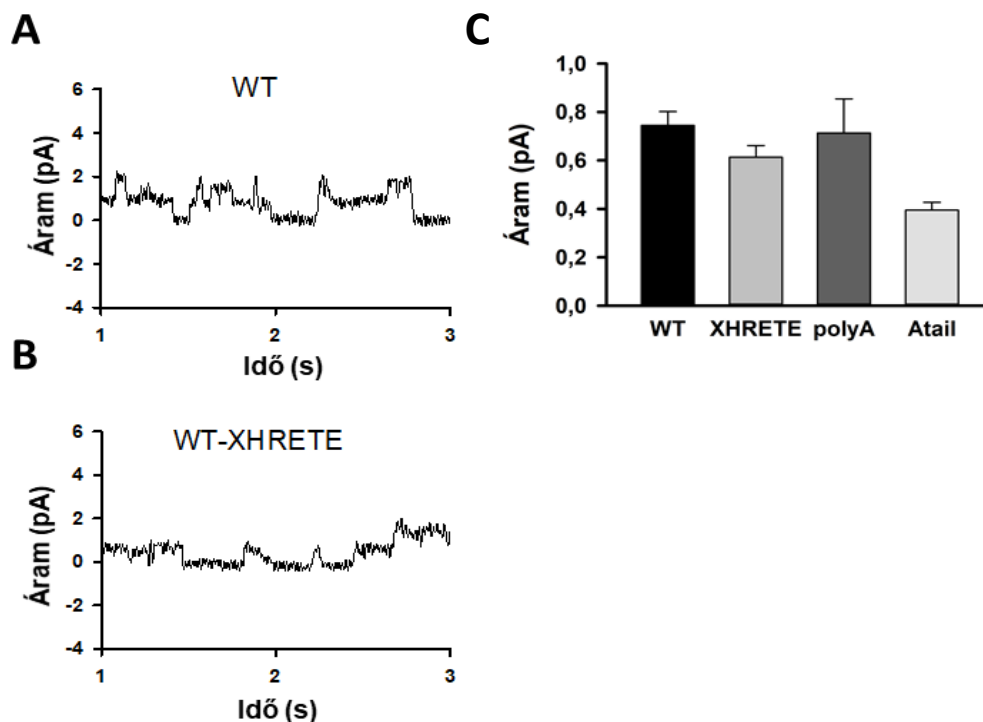


19. ábra A HRETE motívum hiánya vagy módosítása nem befolyásolja a Kv1.3 működését

A) Az áramgörbéket a WT-FL, WT-XHRETE, WT-polyA és WT-Atail csatornák esetében 15ms hosszú, +50mV-ra depolarizáló protokoll segítségével vettük fel az aktivációs kinetika tanulmányozásához (piros: WT-FL, kék: WT-polyA, fekete: WT-XHRETE, zöld: WT-Atail). Az illesztéshez és kiértékeléshez használt módszert az anyagok és módszerek rész tartalmazza. A

holding potenciált -120mV -ra állítottuk, a méréseket outside-out konfigurációban hajtottuk végre, és az áramokat csúcértékére normáltuk. **B)** A WT-FL, WT-polyA, WT-XHRETE és WT-Atail csatornák inaktivációs kinetikáját bemutató tipikus normált áramgörbék. A sejteket 2 másodpercig $+40\text{mV}$ -ra depolarizáltuk a -120mV -os holding potenciálról, az inaktivációs kinetikát az anyagok és módszerek szerint értékeltük ki. **C)** A négy Kv1.3 csatorna fenotípus egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggése: a normált vezetőképesség-tesztpotenciál függését az anyagok és módszerek részben leírtak szerint elemeztük. Az ábrán a normált vezetőképesség látható a WT-FL (piros pont, piros vonal), a WT-polyA (kék háromszögek, kék vonal), a WT-XHRETE (fekete négyzet, fekete vonal) és a WT-Atail (zöld rombusz, zöld vonal) esetében, a Boltzmann-függvénnyel illesztett görbét is feltüntettük. **D)** és **E)** A WT-FL, WT-polyA, WT-XHRETE és WT-Atail csatornák aktivációs és inaktivációs időállandói (átlag \pm SEM, $n \geq 6$). A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik ($p=0,05$). **F)** Az egyensúlyi aktiváció paraméterei (meredekség (k), bal és középpont ($V_{1/2}$), jobb) a négy konstrukciónál (átlag \pm SEM, $n \geq 6$).

Megvizsgáltuk továbbá az egyedi csatorna (single-channel) vezetőképességet mind a négy csatornatípus esetében, és megállapítottuk, hogy a HRETE-motívum eltávolítása/helyettesítése a Kv1.3 csatornában nem befolyásolta az egyedi-csatorna vezetőképességet ($p = 0,085$) (20. ábra).



20. ábra Egyedi csatorna vezetőképesség a HRETE mutáns csatornáknál.

Egyedi csatorna áramok a CHO sejtekbe transzfektált **A)** WT és **B)** XHRETE plazmidok esetében outside-out konfigurációban rögzítve. A sejteket -40mV -on tartottuk, majd 0mV -ra depolarizáltuk, 10 másodpercenként. **C)** 0mV -nál mért egyedi csatorna áramok átlagai a WT (fekete), WT-XHRETE (szürke), WT-polyA (sötét szürke), és WT-Atail (világos szürke) esetén, a SEM ábrázolása mellett.

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

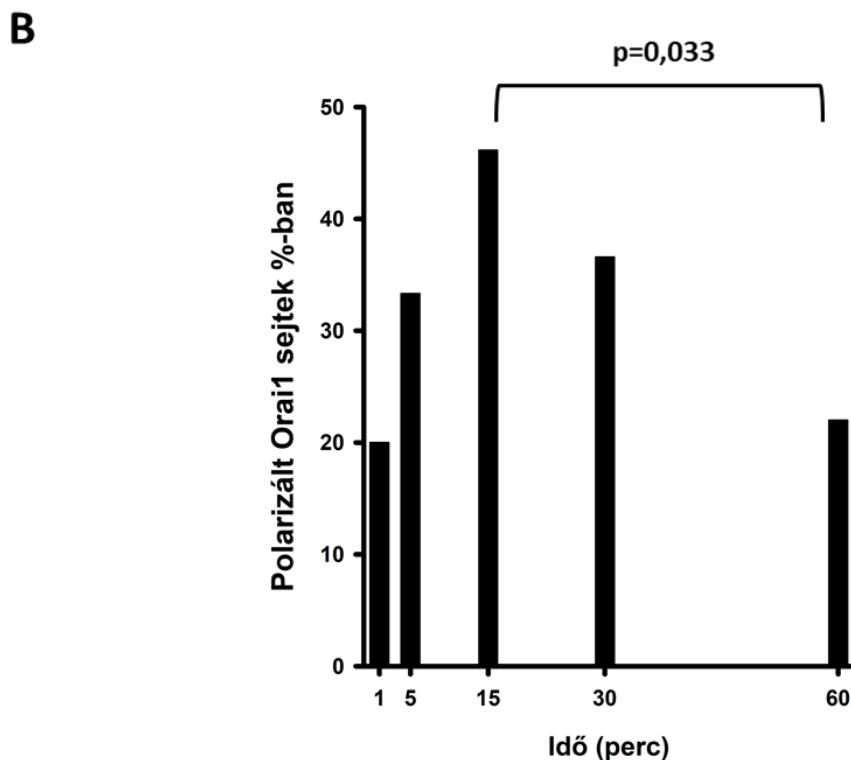
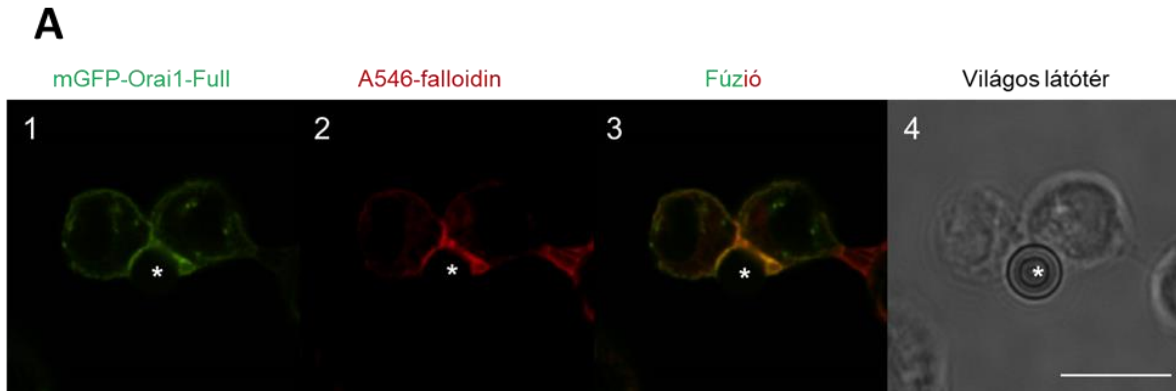
4.2 Az Orai1 IS-beli tartózkodása megváltoztatja a T-sejtek Ca^{2+} -válaszát

4.2.1 Az Orai1 immunológiai szinapszisba történő felhalmozódásának kinetikája

A tudomány jelenlegi állása szerint azt feltételezik, hogy a T-sejtek különböző ioncsatornáinak (Kv1.3, KCa3.1 és Orai1) tartózkodási ideje az immunológiai szinapszisban elengedhetetlen a Ca^{2+} -függő T-sejt aktiváció kialakulásához. Korábban leírták, hogy az Orai1 csatornák a STIM1-gyel együtt berendeződnek az IS-be a T-sejt és APC között kialakult kölcsönhatáskor [14].

Az Orai1 CRAC alegység IS-ben történő felhalmozódási kinetikája tanulmányozásához az Orai1-et stabilan expresszáló sejtvonalat hoztunk létre Jurkat E6-1 sejtekben. Először az Orai1 csatornát fuzionáltuk mGFP-vel, majd retrovirális transzdukcióval (a részletekért lásd: Anyagok és módszerek) Jurkat sejtekben expresszáztattuk az mGFP-Orai1-Full konstrukciót. Immunológiai szinapszist hoztunk létre az anti-CD3 és anti-CD28 antitesttel bevont gyöngyök, mint APC és az mGFP-Orai1-Full-t expresszáló sejtek között, majd meghatároztuk az Orai1-polarizált-sejtek százalékos arányát öt egymást követő időpontban (1, 5, 15, 30 és 60 perc) (21. A ábra). Az IS-képződés kialakulásának megerősítése érdekében az F-aktin polimerizációját Alexa-546 falloidin festéssel detektáltuk, és bevezettük az akkumulációs arányt (AA) annak eldöntésére, hogy egy T-sejt mutat-e Orai1-polarizációt. Az „álpozitív” eredmények csökkentése érdekében az AA küszöbértékét 1,5-re állítottuk, vagyis az 1,5-nél alacsonyabb AA értékű sejteket nem polarizálnak definiáltuk (lásd Szilágyi és mtsai.) [13]. Az analízisbe azokat a sejteket vettük csak bele, amelyek F-aktin polarizációval rendelkeztek (az aktinra/falloidinra számított AA érték magasabb volt, mint 1,5). Minden időponthoz legalább 30 sejtet elemeztünk (melyeket legalább három különböző napon rögzítettünk), és meghatároztuk az IS-ben az Orai1-felhalmozódást mutató sejtek százalékos arányát.

Egy perccel a sejt-gyöngy kölcsönhatás kialakulása után a T-sejtek 20 százaléka mutatott Orai1-felhalmozódást, és az Orai1-polarizált-sejtek aránya a 15. percben volt a legmagasabb (46 %). A későbbi időpontokban (30. és 60. perc) az Orai1 IS-berendeződést mutató sejtek százaléka fokozatosan csökkent (15perc vs. 60perc: $p=0,033$) (21. B ábra). Mindezek alapján azt kívántuk tanulmányozni, hogy az Orai1 IS-beli tartózkodását mely fehérjék szabályozzák Jurkat T-sejtekben.



21. ábra Az mGFP-Orai1-Full berendeződése az immunológiai szinapszisba

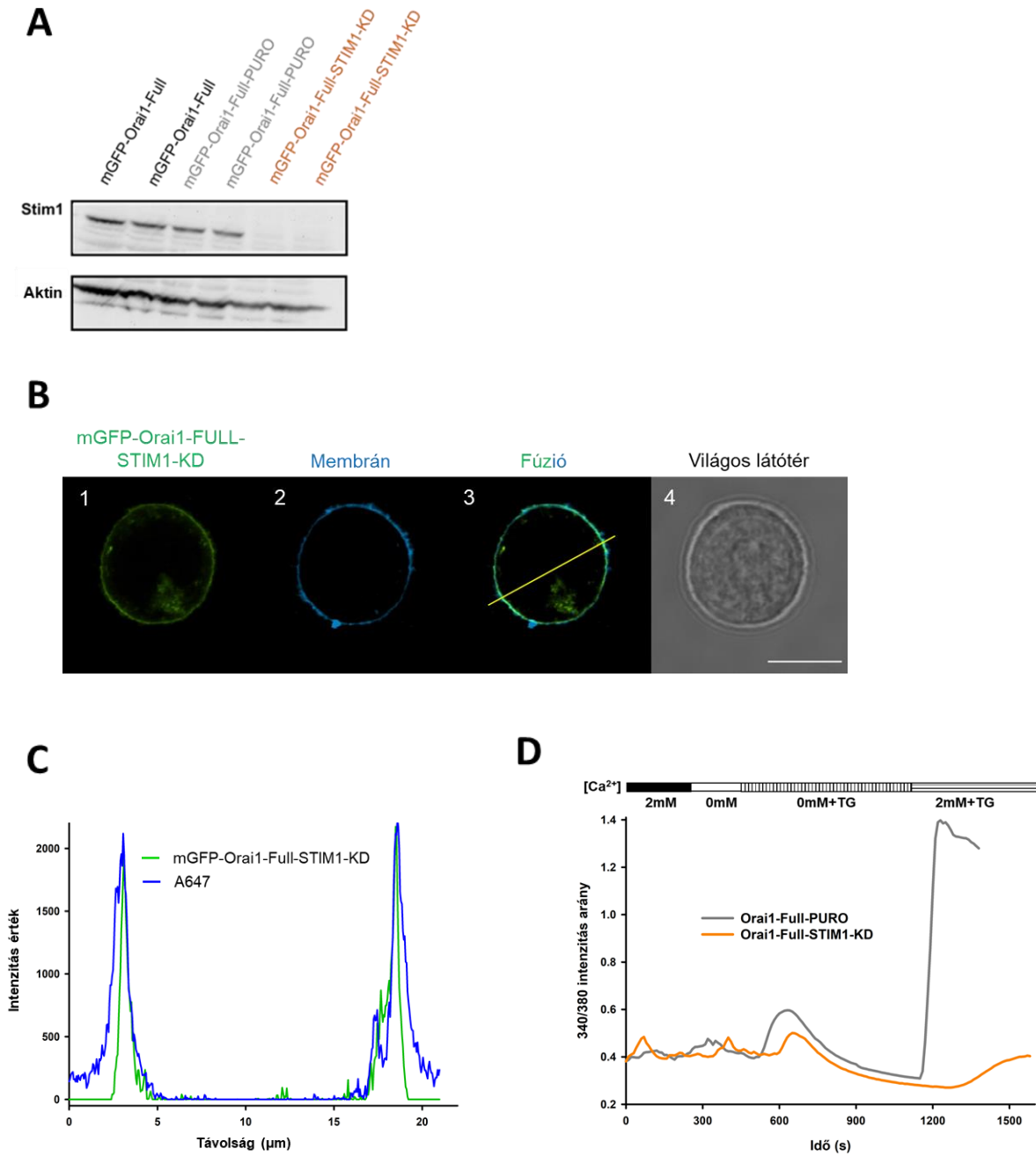
Reprezentatív konfokális képek az mGFP-Orai1-Full-t kifejező Jurkat sejtek és CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakult immunológiai szinapszistról. **A1)** az mGFP-Orai1-Full csatornákat zölddel, **A2)** az Alexa546-falloidin jelölést (IS létrejöttének indikátoraként) pirossal ábrázoltuk. **A3)** Az mGFP-Orai1-Full (zöld) és Alexa546-falloidin (piros) fluoreszcens csatornák fúziója. **A4)** Világos látótér felvétel az mGFP-Orai1-Full csatornát kifejező sejtekről (A1-A3). A gyöngyöket csillaggal jelöltük. A skála 10 μ m-t jelent. **B)** Az Orai1 polarizációt mutató sejtek százalékos aránya a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyökkel alkotott IS-ben 1.,5.,15.,30. és 60. percnél. Minden időpillanat esetén legalább 30 sejtet vontuk be a kísérletbe.

4.2.2 A STIM1 befolyásolja az Orai1 IS-beli tartózkodási idejét

Az Orai1 aktivációjának és működésének szükséges lépése az ER-ben lokalizált STIM1 alegységhez való kapcsolódás. Korábban már beszámoltak róla, hogy a STIM1 felhalmozódik az IS-ben, ami elengedhetetlen feltétele a megfelelő Ca^{2+} jel kialakulásának [36, 111]. Továbbá azt is leírták, hogy a STIM1 az Orai1 alegység plazmamembránhoz való eljutását is irányítja: a STIM1 szuboptimális és supraoptimális expressziója az Orai1 alacsony membrán expressziójához vezetett [112, 113].

A STIM1-Orai1 interakció IS-beli berendeződésben betöltött funkciójának megértése érdekében létrehoztunk egy mGFP-Orai1-Full-t expresszáló sejt vonalat, amelyben csendesítettük a STIM1 gént (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD). A transzdukció kontrolljaként pLKO.1-puro plazmidot alkalmaztunk, ami olyan shRNS-szekvenciát tartalmaz, amely semmilyen ismert gént nem csendesít (mGFP-Orai1-Full-PURO sejt vonal). A STIM1 csendesítés hatékonyságának teszteléséhez a STIM1 expressziós szintet western blottal ellenőriztük. A STIM1-specifikus shRNS-sel transzdukált sejt vonalak esetében, a STIM1-sáv intenzitása jóval alacsonyabb volt, mint a transzdukciós-kontroll (mGFP-Orai1-Full-PURO) és az mGFP-Orai1-Full sejtéké (22.A ábra). Továbbá az mGFP-Orai1-Full alegységek membránba kijutását is megvizsgáltuk: a membránt Alexa-647 szukcinimidil-észterrel jelöltük (nem specifikusan), és a vonalmenti intenzitás profilt (line intensity profile) határoztuk meg a STIM1-et expresszáló és nem expresszáló sejt vonalakban. Az Orai1 alegység jól láthatóan a plazmamembránban lokalizálódott, ugyanis a membránfestés és az mGFP-Orai1-Full fehérjék fluoreszcens jele átfedésben van (22.B és C ábra).

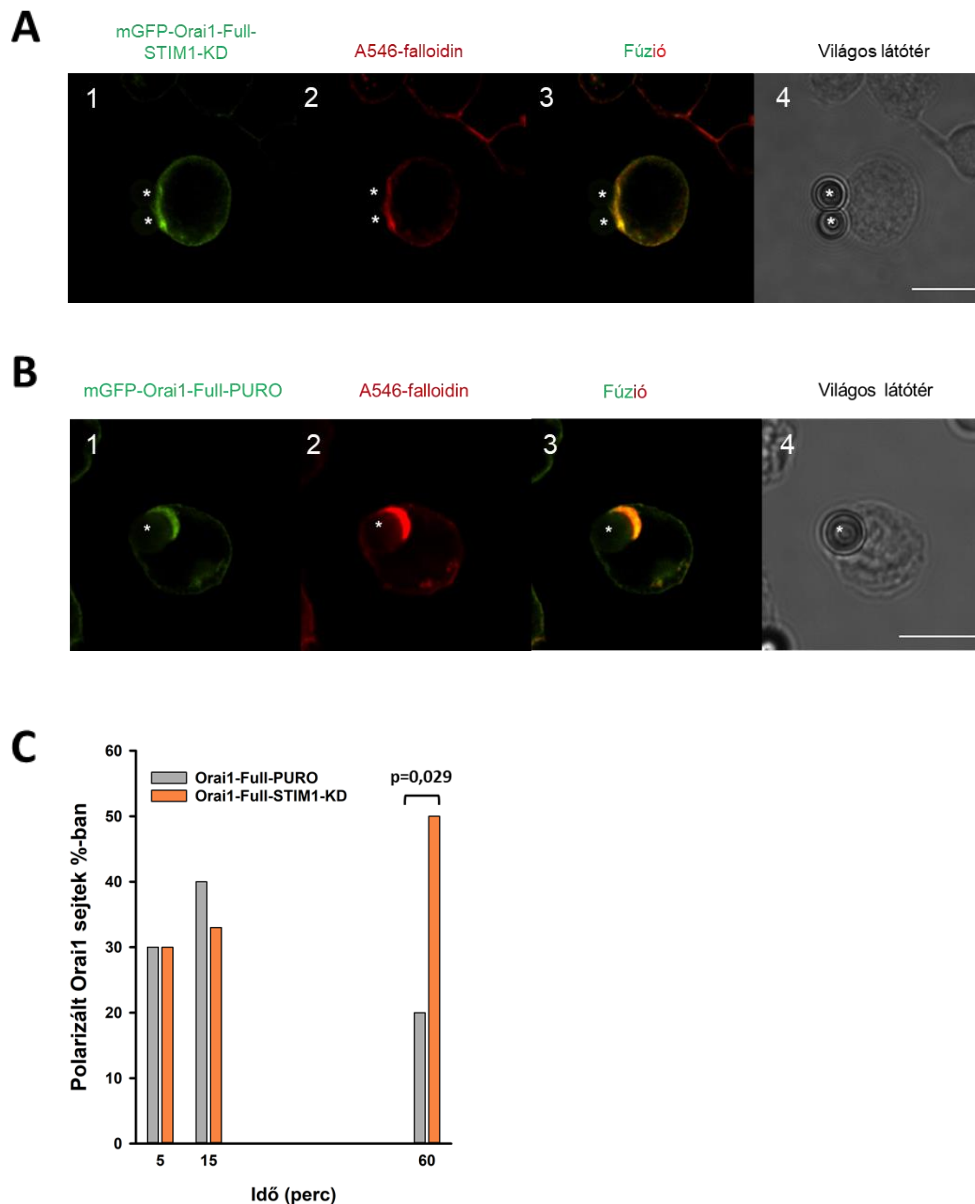
A funkcionális ellenőrzéshez az mGFP-Orai1-Full-PURO és az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD Jurkat sejtek Ca^{2+} jelét a citoszólikus Ca^{2+} változások mérésével jellemeztük, FURA-2 rációmetrikus festék alkalmazásával. A Ca^{2+} mérés jellemző időbeli lefutását a 22.D ábra mutatja: először 2mM Ca^{2+} oldatot engedtünk a sejtekre, majd az extracelluláris oldatot abszolút 0mM Ca^{2+} tartalmú oldatra cseréltük, hogy teszteljük a plazmamembrán integritását és az életképességét. Ezután Ca^{2+} mentes oldatban 1 μM tapsigargin (TG) adtunk a sejtekhez az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürítéséhez, ami indukálta a STIM1 Orai1-hez való kötődését. 2mM Ca^{2+} ismételt hozzáadása után, TG jelenlétében kimutatható volt a Ca^{2+} beáramlás az Orai1 STIM1-által aktivált pórusán keresztül. A kontroll sejtek (mGFP-Orai1-Full-PURO) az mGFP-Orai1-Full sejtékkel azonos Ca^{2+} választ mutattak, és ahogy az várható volt és korábban publikálták, a STIM1 csendesítése teljesen megszüntette a sejtek Ca^{2+} -válaszát a CRAC csatornákon keresztül (22.D ábra) [14, 114, 115].



22.ábra A *STIM1* csendesítése gátolja a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} -beáramlást
 A) Western blot kísérletek az *mGFP-Orai1-Full* csatornát expresszáló Jurkat (fekete), az *mGFP-Orai1-PURO* (szürke) és az *mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD* (narancssárga) sejtek esetén, melynek során specifikus *STIM1* ellenes antitestet (várható méret 85-88kDa) és expressziós kontrollként aktin antitestet (várható méret 42kDa) használtunk (a *STIM1* csendesítés 95%-os hatékonyságú volt).

B) Konfokális felvételek a mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekben. **B1)** Az Orai1-Full csatornák mGFP jele (zöld). **B2)** Az Alexa FluorTM 647 NHS Észter fluoreszcens jele a plazmamembránban (kék). **B3)** A zöld és kék csatornák fúziója, átfedésének ábrázolása. **B4)** Világos látótér az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekről (**B1-B3**). A skála 10µm hosszú. **C)** Az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD „pixel-by-pixel” intenzitás profil analízise a jelölt vonal mentén, a fúziós kép alapján (**B3**: zöld: mGFP-Orai1-Full és kék: membrán az Alexa FluorTM 647 NHS Észterrel jelölve). **D)** Citoszólikus Ca²⁺ mérések FURA-2-vel töltött mGFP-Orai1-Full-PURO (szürke) és mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD (narancssárga) sejtekben. A citoszólikus Ca²⁺ koncentráció meghatározásához a FURA-2 340nm és 380nm-es gerjesztésnél mért intenzitás arányát használtuk. A reprezentatív ábrán 18 sejt (mGFP-Orai1-Full-PURO) és 8 sejt (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD) kiátlagolt Ca²⁺-válasza látható.

Ezt követően meghatároztuk az Orai1 csatornák IS-beli felhalmozódásának időfüggését mGFP-Orai1-Full-PURO és mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejt vonalakban. Amint azt fentebb részleteztük, IS-t generáltunk e két-sejt vonal és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között, majd három időpontban (5., 15. és 60. percenél) fixáltuk őket, és meghatároztuk az Orai1 IS-redistribúciót (és F-aktin polarizációt) mutató sejtek arányát (23.ábra A és B). Az mGFP-Orai1-Full-PURO sejtek (kontroll) Orai1 IS-akkumulációjának időbeli lefolyása hasonló volt az mGFP-Orai1-Full konstrukciót expresszáló sejtekhez: az Orai1-polarizált-sejtek százalékos aránya 15 percenél tetőzött (kb. 40%), majd visszaesett kb. 25 százalékra, csakúgy, mint az mGFP-Orai1-Full (vadtípus) esetében „natív” Jurkat sejtekben. A STIM1 leütés azonban módosította az Orai1 IS-ben történő feldúsulásának kinetikáját: az Orai1 IS-ben való felhalmozódását mutató sejtek frakciója a 60. percig folyamatosan nőtt az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekben (p = 0,029) (23.C ábra).



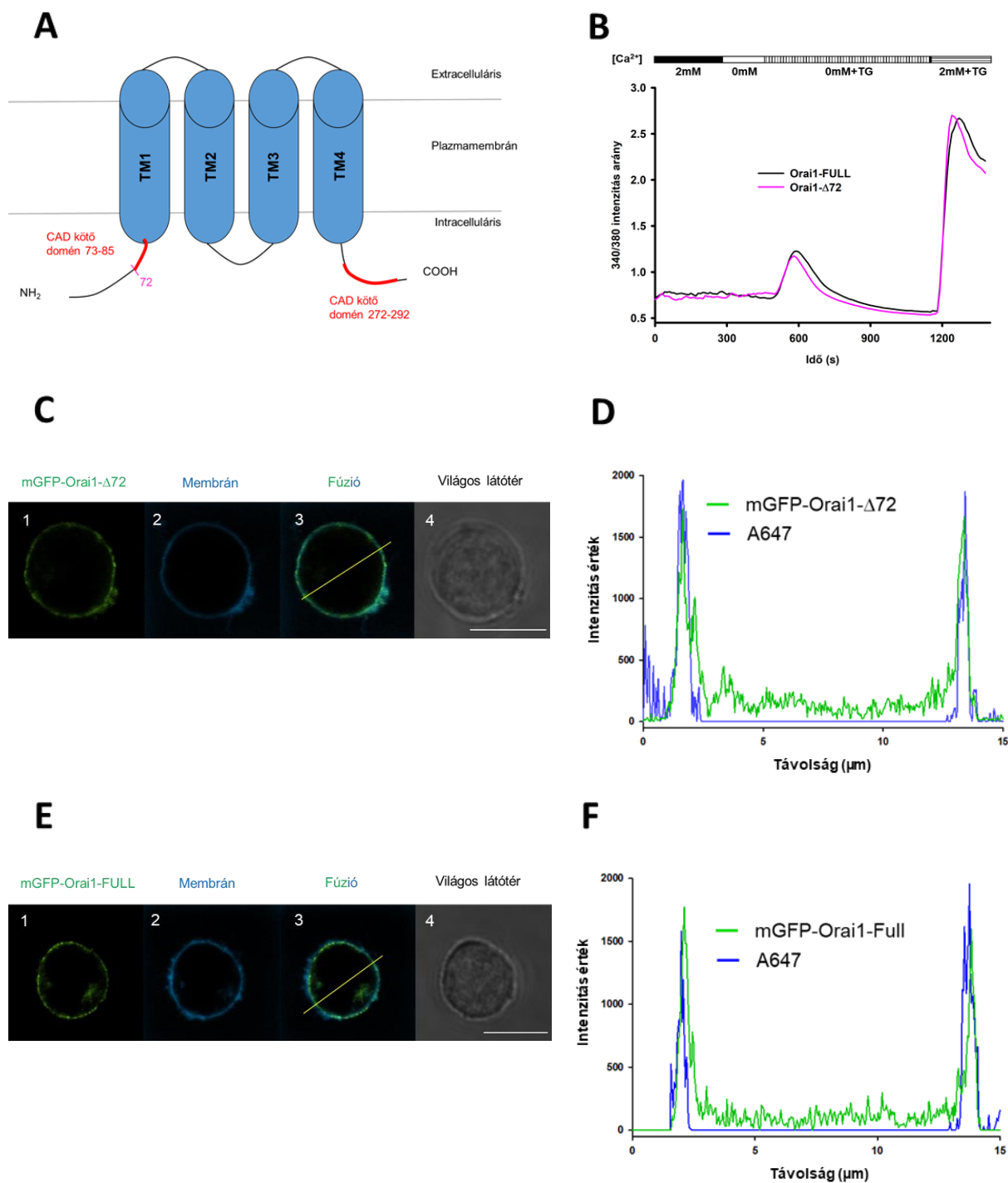
23. ábra A *STIM1* csendesítése az *Orai1-Full* tartós felhalmozódásához vezet IS-ben
 Reprezentatív konfokális képek az *mGFP-Orai1-Full* csatornát kifejező **A)** *STIM1-KD* és **B)** *PURO* Jurkat sejtek és *CD3-CD28* antitesttel bevont gyöngyök között kialakult immunológiai szinapsziszról. **A1)** és **B1)** Az *mGFP*-vel fúzionált *Orai1-Full* csatornák (zöld) a *STIM1-KD* és *PURO* sejtek esetén. **A2)** és **B2)** Alexa546-falloidin jelölést (IS létrejöttének indikátora) pirossal ábrázoltuk. **A3)** és **B3)** Az *Orai1* (zöld) és falloidin (piros) fluoreszcens szignálok fúziója. **A4)** és **B4)** Világos látótér az *mGFP-Orai1-Full* csatornát kifejező *STIM1-KD* (A1-A3) és *PURO* (B1-B3) sejtekről. A gyöngyöket csillaggal jelöltük. A skála 10 μ m-t jelent. **C)** Az *Orai1* polarizációt mutató sejtek százalékos aránya *mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD* (narancs) és *mGFP-Orai1-Full-PURO* (szürke) sejtekben a *CD3-CD28* antitesttel bevont gyöngyökkel alkotott IS-ben 5,15,60 percnél. Minden időpillanat esetén legalább 30 sejtet analizáltunk.

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

Az Orai1 alegység C-terminusa elengedhetetlen a STIM1-hez történő kapcsolódáshoz és a SOCE aktiválásához, az N-terminális régió pedig tartalmaz egy CAD (CRAC aktivációs domén) domént, amely szükséges a Ca^{2+} permeációjához [43, 116-119]. Ezek alapján létrehoztunk egy mGFP-Orai1- Δ 72 nevű N-terminális mutáns (az Orai1 β izoformát utánozva és részben megőrizve a STIM1 N-terminális kötődését), ahol az első 72 aminosavat eltávolítottuk, hogy feltárjuk az intracelluláris N-terminális szerepét az IS-be történő berendeződésben. (24.A ábra)

Számos tanulmány arról számolt be, hogy az Orai1 csatorna N-terminális csonkolása csökkentette, vagy teljesen megszüntette a STIM1-függő CRAC áram aktivációját, ezért az mGFP-Orai1-Full és az mGFP-Orai1- Δ 72 csatornákat stabilan kifejező Jurkat sejtek Ca^{2+} válaszát a már korábban leírtak szerint vizsgáltuk meg [43, 119]. Az mGFP-Orai1-Full és mGFP-Orai1- Δ 72-öt expresszáló sejtek Ca^{2+} válaszána időbeli lefutását a 24.B ábra mutatja: az Orai1- Δ 72 csatorna trunkációja nem volt szignifikáns hatással a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramlásra a Jurkat sejtekben, nem befolyásolta nagymértékben a CRAC csatorna vezetőképességét és aktivációját.

Ezután megnéztük az mGFP-Orai1- Δ 72 konstrukt Jurkat sejtekben való lokalizációját: a plazmamembránt Alexa-647 szukcinimidil-észterrel festettük, és meghatároztuk a mutált csatornát expresszáló sejtek vonalmenti intenzitás profilját. A 24. C és D ábrákon egyértelműen látható az Orai1- Δ 72 csatornakonstruktok plazmamembránbeli lokalizációja: az intenzitásprofil elemzés is azt mutatja, hogy az Alex647 festés (membránjelölés) és az mGFP jel intenzitási csúcsai ugyanúgy átfednek egymással, mint a vad típusú Orai1-nél (24.E és F). Következésképpen az mGFP-Orai1- Δ 72 csatornák képesek kijutni a sejtmembránba.

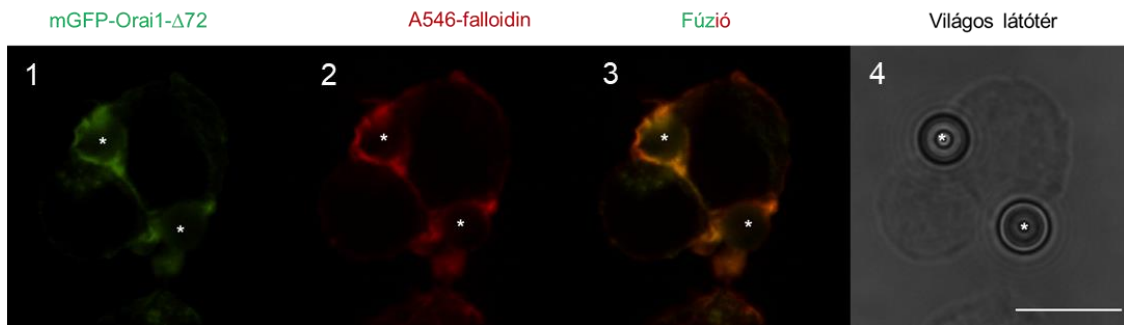
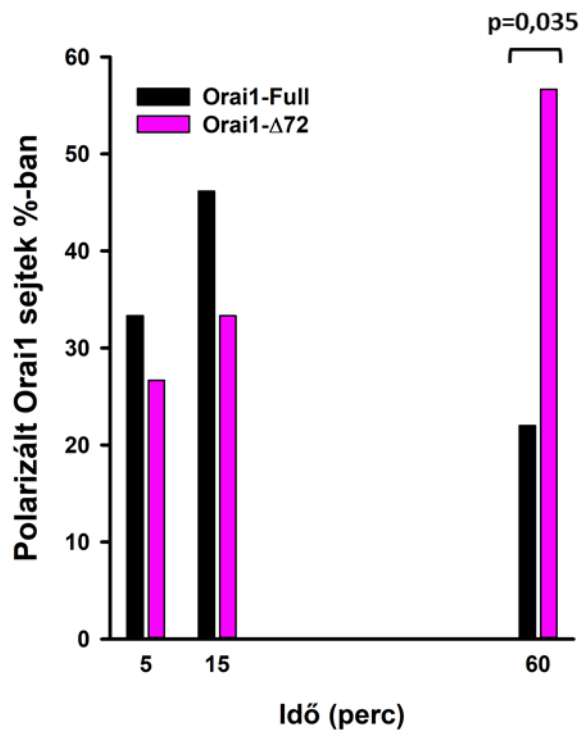


24. ábra Az *Orai1* N-terminálisának eltávolítása (*mGFP-Orai1-Δ72*) nem befolyásolja a csatorna membránexpresszióját és működését

A) A vad típusú *Orai1* csatorna felépítésének sematikus rajza, mely tartalmazza az intracelluláris C- és N-terminálisokat. A CRAC aktivációs doméneket (CAD) pirossal jelöltük az N-terminálison (73-85aa) és a C-terminálison (272-292aa), valamint a 72. aminosavat, amely a deléciós mutánst reprezentálja és rózsaszínnel emeltük ki.

B) Citoszólíkus Ca^{2+} mérések FURA-2-vel töltött mGFP-Orai1-Full (fekete) és mGFP-Orai1- Δ 72 (rózsaszín) sejtekben. A citoszólíkus Ca^{2+} koncentráció meghatározásához a FURA-2 340nm és 380nm-es gerjesztésnél mért intenzitás arányát használtuk. A reprezentatív ábrán legalább 63 sejt kiátlagolt Ca^{2+} válasza látható csatornatípusonként. **C)** és **E)** Reprezentatív konfokális képek az mGFP-Orai1- Δ 72 és mGFP-Orai1-Full csatornákat stabilan expresszáló sejtekről. **C1)** és **E1)** Az mGFP-Orai1- Δ 72 és mGFP-Orai1-Full csatornák mGFP szignálja (zöld). **C2)** és **E2)** Az Alexa FluorTM 647 NHS Észter fluoreszcens jele a plazmamembránban (kék). **C3)** és **E3)** A zöld és kék csatornák fúziója, átfedésének ábrázolása. **C4)** és **E4)** Világos látótér a különböző Orai1 csatornát expresszáló sejtekről. A skála érték mindkét esetben 10-10 μ m. A „pixel-by-pixel” intenzitás profil analízis eredményeit az **D)** mGFP-Orai1- Δ 72 és **F)** mGFP-Orai1-Full esetében is a jelölt vonal mentén, a fuzionált képek alapján kaptuk meg (**C3** és **E3**: zöld: mGFP-Orai1-Full és kék: membrán az Alexa FluorTM 647 NHS Észterrel jelölve).

Ezen kívül IS-t hoztunk létre az N-terminálisán trunkált Orai1 csatornákat stabilan expresszáló Jurkat T-sejtek és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között (5., 15., 60. perc után fixáltuk a sejteket). A reprezentatív konfokális felvételek azt mutatják, hogy az mGFP-Orai1- Δ 72 képes az IS-ben feldúsulni (25.A ábra), azonban az Orai1 alegység IS-beli felhalmozódásának kinetikája különbözött a vad-típustól: a trunkált Orai1-expresszáló mGFP-polarizált-sejtek százaléka fokozatosan emelkedett, és a 60. percben érte el a maximumát 58%-nál ($p = 0,035$ az mGFP-Orai1-Full és az mGFP-Orai1- Δ 72 összevetve), hasonlóan az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekhez (25.B ábra).

A**B**

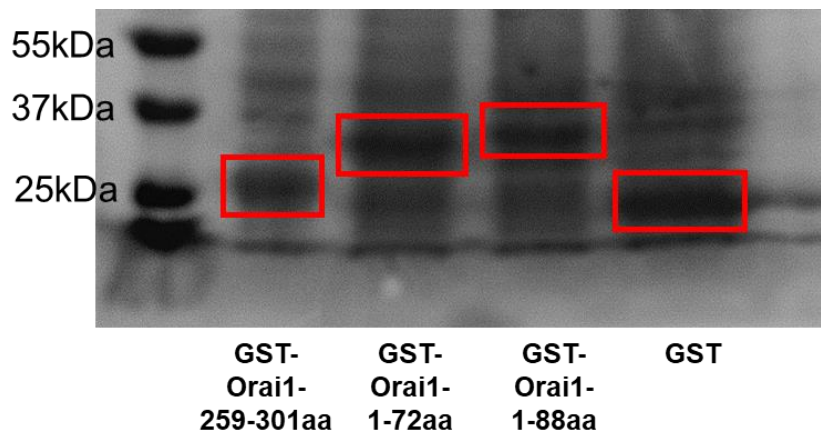
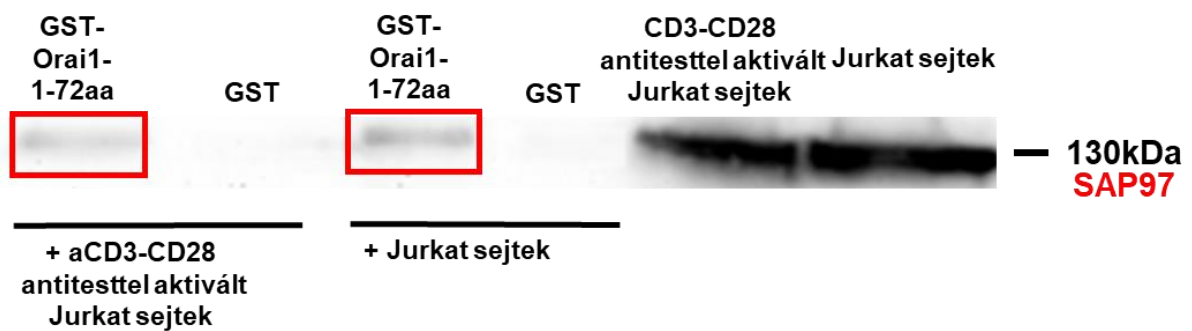
25. ábra Az mGFP-Orai1-Δ72 csatornák a szinapszisban ragadnak

Konfokális képek az mGFP-Orai1-Δ72 csatornát kifejező Jurkat sejtek és CD3-CD28 gyöngyök között kialakult immunológiai szinapszistról. **A1)** Az mGFP-t tartalmazó Orai1-Δ72 csatornák (zöld). **A2)** Alexa-546-falloidin (piros) az IS indikátoraként. **A3)** Az Orai1-Δ72 (zöld) és Alexa-546-falloidin (piros) fluoreszcens szignálok fúziója. **A4)** Világos látótér az mGFP-Orai1-Δ72 csatornát kifejező sejtekről (A1-A3). A gyöngyöket csillaggal jelöltük. A skála 10μm-t jelent. **B)** Az Orai1 polarizációt mutató sejtek százalékos aránya mGFP-Orai1-Full (fekete) és mGFP-Orai1-Δ72 (rózsaszín) sejtek esetén 5,15 és 60 perccel az IS létrejötte után. Minden időpillanat esetén legalább 30 sejtet vontuk be a kísérletbe.

4.2.4 A SAP97 szabályozhatja az Orai1 távozását az immunológiai szinapsziszból

Ezeket az eredményeket, vagyis az Orai1 hasonló akkumulációs kinetikáját két különböző módosításnál (STIM1 csendesítés és mGFP-Orai1- Δ 72 deléció) egy olyan modellel is lehet magyarázni, amely feltételezi, hogy az IS-kialakulása során egy, az Orai1-et és a STIM1-et összekapcsoló harmadik interakciós partner lép a színre, amely az Orai1 szinapszisz-elhagyását segíti elő. Ez az adapterfehérje hidat képezhet az Orai1 N-terminálisa és a STIM1 C-terminusa között, és segíthet az Orai1-nek az immunológiai szinapsziszból történő „kidiffundálásban”.

Korábban már leírták, hogy a SAP97 (szinapszisz-asszociált fehérje 97) vagy hDlg1 adapterfehérje akkumulálódik az IS-ben és kb. 15 perccel a stimuláció után már nem mutat feldúsulást a T-sejt és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök közötti kontakt zónában [92]. A SAP97, a MAGUK család fehérjéinek (Membrane Associated Guanylate Kinases) tagja, amely szerepet játszik az ioncsatornák és a citoszólikus fehérjék membránba való kijutásában [13, 74, 90, 91]. Mivel a vad-típusú mGFP-Orai1-Full csatornák feldúsulásának maximuma 15 percnél volt a immunszinapsziszban (valamint képes fizikai interakció kialakítására az Orai1 N-terminálisával, 26. ábra), azt feltételeztük, hogy a SAP97 irányíthatja az Orai1 szinaptikus régióból való eltávolítását.

A**B**

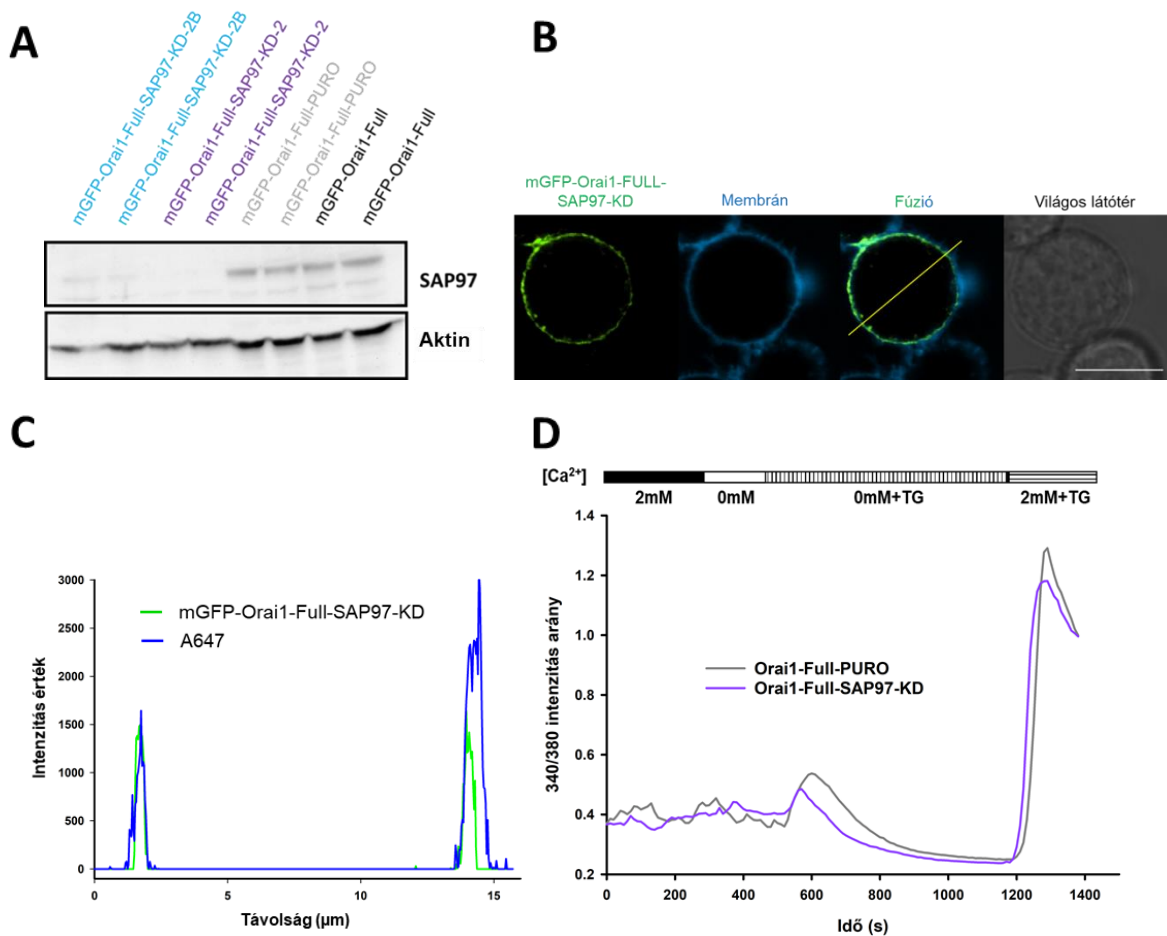
26. ábra A SAP97 képes az Orai1 N-terminálisához kapcsolódni

A) BL21 sejtekben termeltetett glutation-S-transzferáz (GST, negatív kontroll), az Orai1 C-terminálisa (GST-Orai1-259-301aa), egy rövidebb Orai1 N-terminális (GST-Orai1-1-72aa) és egy hosszabb N terminális (GST-Orai1-1-88aa) rész, GST-vel fúzionálva (Coomassie blue festés). B) Jurkat sejtek és CD3-CD28 antitesttel aktivált Jurkat sejtek (pozitív kontroll), valamint a GST affinitás kromatográfia során kinyert GST (negatív kontroll) és GST-Orai1-1-72aa (N-terminális, 1-72 aminosav) fehérjék és Jurkat sejtek fúziójával létrejött lizátumok tesztelése western blottal, specifikus SAP97-ellenes antitest segítségével. Az eluátumokat SDS-PAGE módszerrel elválasztottuk, majd a fehérje expressziót western blottal ellenőriztük.

A SAP97 szerepének kiderítésére a SAP97 expressziós szintjét leszáboályoztuk olyan Jurkat sejtekben, amelyek az mGFP-Orai1-Full csatornát stabilan kifejezik (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD). A transzdukció kontrolljaként ismételten a pLKO.1-puro plazmidot alkalmaztuk, mint azt már korábban is tettük (mGFP-Orai1-Full-PURO sejtvoanal). A SAP97 csendesítés hatékonyságát western blottal ellenőriztük. A SAP97 knock-down sejtvoanalokban (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD-2 vagy mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD-2B) a SAP97 sáv intenzitása jelentősen alacsonyabb volt a transzdukciós kontrollhoz (mGFP-Orai1-Full-PURO), vagy az mGFP-Orai1-Full sejtekhez képest. A blot alapján a továbbiakban az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD2 sejtvoanalat használtuk a kísérletekhez (melyet a továbbiakban mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD néven említünk) (27.A ábra).

Továbbá ellenőriztük az mGFP-Orai1-Full alegységek membrán expresszióját Alexa-647 szukcinimidil-észterrel (membrán) történő jelöléssel. A SAP97-et nem tartalmazó, de az mGFP-Orai1-Full csatornát expresszáló Jurkat sejtek vonalmenti intenzitás-profilja egyértelműen bizonyítja, hogy az Orai1 alegység membrán lokalizációját nem befolyásolja az SAP97 leütése (27.B és C ábra).

Az Orai1 csatornák funkcionálisának teszteléséhez az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben a citoszólikus Ca^{2+} változásokat a rációmetrikus Ca^{2+} indikátor (FURA-2) segítségével határoztuk meg. A 27. D ábra alapján kijelenthetjük, hogy az mGFP-Orai1-Full sejtekben a SAP97 shRNS konstrukcióval történő transzdukció nem gyakorolt szignifikáns hatást a Jurkat sejtek CRAC áramára az mGFP-Orai1-Full-PURO sejtekhez képest.

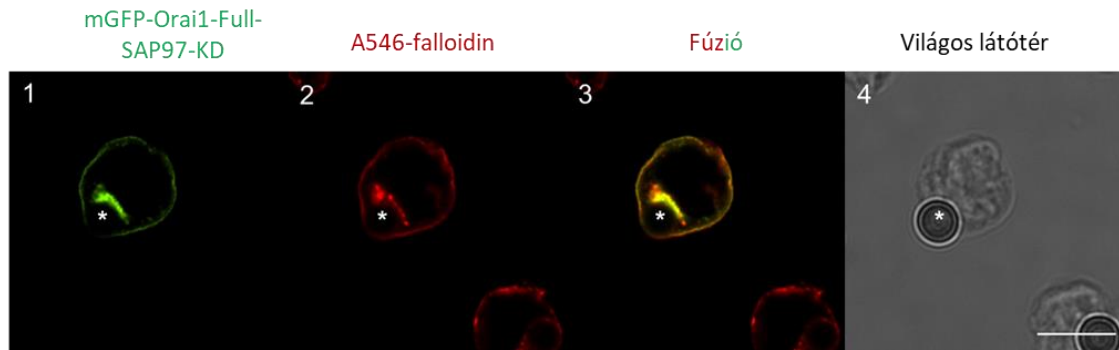
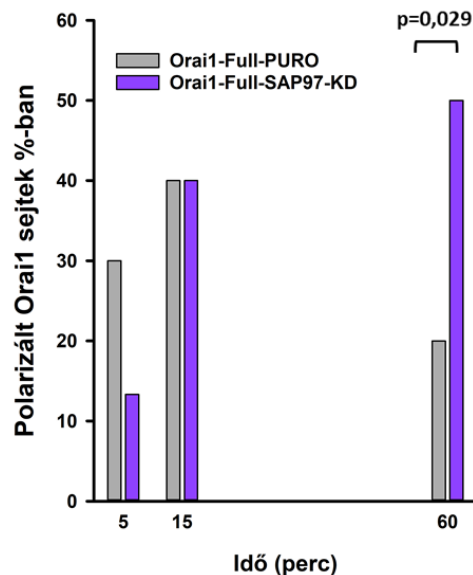


27. ábra A SAP97 leütése Jurkat sejtekben nem befolyásolja a csatorna funkciót és membránexpressziót

A) Western blot kísérletek az mGFP-Orai1-Full csatornát expresszáló Jurkat (fekete), az mGFP-Orai1-PURO (szürke), az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD2 (lila) (a későbbiek során ezt a sejtvonalat használtuk tovább, és mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD-ként hivatkozunk rá) és mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD2B (ciánkék) sejtek esetén, melynek során specifikus SAP97 ellenes antitestet (várható méret 130kDa) és expressziós kontrollként aktin antitestet (várható méret 42kDa) használtunk (a SAP97 csendesítés 96%-os hatékonyságú volt). **B)** Konfokális képek az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekről. **B1)** Az Orai1-Full csatorna mGFP szignálja (zöld) a SAP97-KD sejtekben. **B2)** Az Alexa FluorTM 647 NHS észter fluoreszcens jele a plazmamembránban (kék). **B3)** A zöld és kék csatornák fúziója, és átfedések ábrázolása. **B4)** Világos látótér a mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekről (C1-C3). A skála 10µm-nek felel meg. **C)** Az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD „pixel-by-pixel” intenzitás profil analízise a jelölt vonal mentén, a fúziós kép alapján (B3: zöld: mGFP-Orai1-Full és kék: membrán az Alexa FluorTM 647 NHS Észterrel jelölve).

D) Citoszólikus Ca^{2+} méréseket végeztünk FURA-2-vel töltött mGFP-Orai1-Full-PURO (szürke) transzdukciós kontroll és az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD (lila) sejtekben. A citoszólikus Ca^{2+} koncentráció meghatározásához a FURA-2 340nm és 380nm-es gerjesztésnél mért intenzitás arányát használtuk.. A reprezentatív ábrákon 18 mGFP-Orai1-Full-PURO és 21 mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejt kiátlagolt Ca^{2+} válasza látható.

Ezt követően meghatároztuk az Orai1 IS-akkumulációs kinetikáját olyan Jurkat sejtekben, amelyek expresszálják az mGFP-Orai1-Full csatornákat, de a SAP97 fehérje „hiányzik” belőlük (28.A ábra). A SAP97 leütött-sejtekben az Orai1 csatornák felhalmozódása egészen 60. percig magas volt ($p = 0,029$), ami azt jelenti, hogy a berendeződési kinetikája hasonló az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD és mGFP Orai1- $\Delta 72$ -et expresszáló sejtekhez (28.B ábra).

A**B**

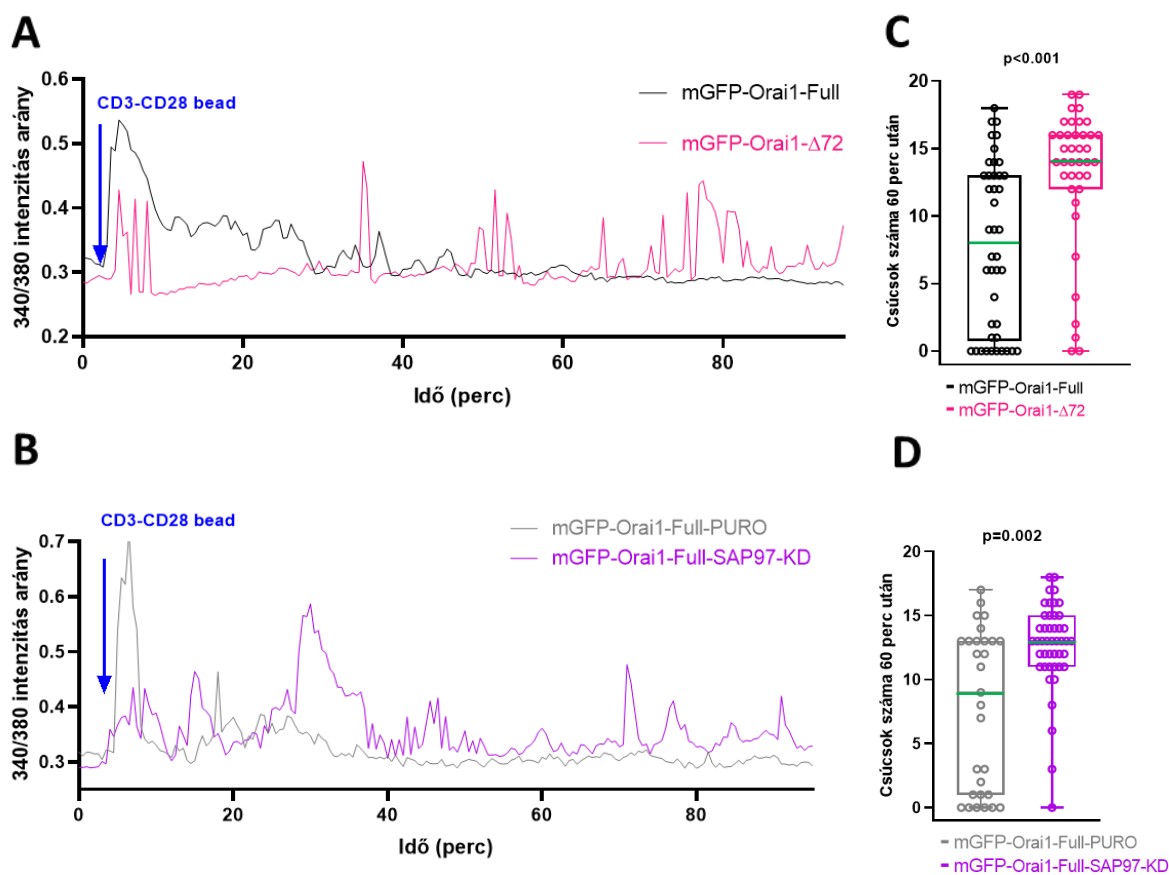
28. ábra Az *mGFP-Orai1-Full* csatornák tartós szinapszisba rendeződést mutatnak a *SAP97* leütött Jurkat sejtekben

A) Konfokális képek az *mGFP-Orai1-Full*-t kifejező *SAP97* leütött Jurkat sejtek és *CD3-CD28* antitesttel bevont gyöngyök között kialakult immunológiai szinapszistról. **A1)** az *mGFP-Orai1-Full* csatornákat zöld színnel, **A2)** az Alexa546-falloidin jelölést (IS létrejöttének indikátoraként) piros színnel ábrázoltuk. **A3)** Az *mGFP-Orai1-Full* (zöld) és Alexa546-falloidin (piros) fluoreszcens szignálok fúziója. **A4)** Világos látótér az *mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD* csatornát kifejező sejtekről (A1-A3). A gyöngyöket csillaggal jelöltük. A skála 10 μ m-nek felel meg. **B)** Az *Orai1* polarizációt mutató sejtek százalékos aránya *mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD* (lila) és *mGFP-Orai1-Full-PURO* (szürke) sejtekben a *CD3-CD28* antitesttel bevont gyöngyökkel alkotott IS-ben 5.,15.,60. percnél. Minden időpillanat esetén legalább 30 sejtet vontuk be a kísérletbe.

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

Az Orai1 csatorna hosszantartó IS-beli tartózkodásának funkcionális következményei kiderítéséhez meghatároztuk a CD3-CD28 antitesttel bevont gyönggyel IS-ben lévő Jurkat sejtek intracelluláris Ca^{2+} változásait. Eredményeink azt mutatták, hogy az mGFP-Orai1- Δ 72 (összehasonlítva a kontroll mGFP-Orai1-Full sejtekkel, $p = 0,016$) és az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben (összevetve az mGFP-Orai1-Full-PURO-val, $p < 0,001$) magasabb volt a kalciumtüskék száma a CD3-CD28 gyönggyel történő interakció kialakulását követő 60 perces időtartam alatt (29. ábra). 60 perc elteltével az N-terminálisán trunkált Orai1, és az Orai1-Full csatornát expresszáló SAP97 csendesítetT-sejtekben a kalcium tüskék továbbra is jelen voltak, ellentétben a kontroll sejtekkel. Analízisünk az mutatta, hogy a Ca^{2+} oszcillációs csúcsok száma szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll sejtekben (mGFP-Orai1- Δ 72 vs. mGFP-Orai1-Full $p < 0,001$; mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD vs mGFP-Orai1-Full-PURO $p = 0,002$) a 60. és a 90. perc között (29. C és D ábra).

Ezen kívül a Ca^{2+} válaszok időbeli megoszlása is különbözött a kontroll és IS-rezidens Orai1-gyet expresszáló sejtek esetében: a 29. A és B ábrák egyértelműen szemléltetik a módosított (mGFP-Orai1- Δ 72 és mGFP-Orai1-Full-SAP97KD) valamint a kontroll (mGFP-Orai1-Full és mGFP-Orai1-Full-PURO) sejtek „oszcillációs karakterisztikájának” különbségét. Míg a kontroll sejtek (mGFP-Orai1-Full, mGFP-Orai1-Full-PURO) Ca^{2+} -koncentráció-csúcsa közvetlenül a gyönggyel való találkozás után volt detektálható, amely idő előre haladtával lecsengett, addig az mGFP-Orai1- Δ 72 mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejteknél számos Ca^{2+} csúcs volt megfigyelhető az IS kialakulását követő 60. percig, sőt a 60. perc után is.



29. ábra Az *Orai1* hosszantartó IS-beli tartózkodása kalcium koncentráció oszcillációt eredményez

Reprezentatív ábrák Jurkat sejtekben, a FURA-2 segítségével végzett citoszólikus Ca^{2+} mérések eredményeit mutatják, melyek stabilan kifejezik **A)** a vad típusú *Orai1* csatornát (mGFP-*Orai1*-Full), az *Orai1*-N-terminálisán trunkált csatornát (mGFP-*Orai1*- $\Delta 72$) valamint **B)** a vad típusú csatornát expresszáló, de a SAP97 fehérjét nem tartalmazó (mGFP-*Orai1*-Full-SAP97-KD) vagy transzdukciós kontroll shRNS-sel transzfektált (mGFP-*Orai1*-Full-PURO) Jurkat sejtekről, melyek immunológiai szinapszist képeztek CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyökkel. A nyilak a CD3-CD28 gyöngyök hozzáadásának időpontját jelölik. **C)** és **D)** A kalcium válaszok a különböző sejt típusokban a CD3-CD28 gyöngyökkel formált szinapszis létrejöttét követő 60. és 90. perc között (lásd: Anyagok és módszerek). Ehhez a kísérlethez 42 mGFP-*Orai1*-Full, 39 mGFP-*Orai1*- $\Delta 72$, 45 mGFP-*Orai1*-Full-SAP97-KD és 29 mGFP-*Orai1*-Full-PURO sejt lett elemezve, 3 különböző nap mérései alapján. A pontok a kalcium csúcsok egyedi sejten meghatározott számát jelöli (60. és 90. perc között). A zöld vonal a mediánt mutatja.

5 Eredmények megbeszélése

5.1 A Kv1.3 csatorna membránbeli expressziója

A Kv-csatornák membránba történő jutását több csoport is tanulmányozta, mivel kulcsfontosságú szereplők a különféle sejtes folyamatok szabályozásában, ideértve az akciós potenciált, vagy akár az immunválaszt is [120]. Annak érdekében, hogy megfelelő következtetéseket tudjunk levonni a membránexpresszióról, kritikus fontosságú egyértelműen bizonyítani, hogy a rögzített áramok a sejtekbe transzfektált ioncsatorna gének következményei, és az expressziós rendszer endogén K^+ csatorna alegységei nem befolyásolják azt. Ehhez kinetikailag vagy farmakológiailag jelölt Kv1.3 alegységeket használtunk olyan tulajdonságokkal, amelyek egyedülálló módon különböztetik meg a transzfektált alegységek által létrehozott homotetramer csatornákat az endogén K^+ csatornáktól, vagy az endogén és transzfektált csatornák alegységei által alkotott heteromultimerektől. Ha az A413V- ΔC alegységek eljutnak a plazmamembránba, mert a HEK sejtekben heterotetramereket képezhetnek az endogén WT Kv1.3-mal, akkor a teljes sejt áram inaktivációs kinetikáját több exponenciális függvény összegével kellene megilleszteni. Ezzel ellenkezőleg, mi azt kaptuk, hogy az A413V-FL τ_{inakt} értéke ($4,1 \pm 0,6$ ms) megegyezik az A413V- ΔC τ_{inakt} értékével ($5,7 \pm 0,5$ ms, $p = 0,15$), és az áramgörbék leszálló ága egy-exponenciális függvénnyel illeszthető (az adatokat a dolgozatban nem mutatjuk be). Az A413V- ΔC áram expressziója CHO sejtekben, amelyek nem fejeznek ki feszültségfüggő K^+ konduktanciát, azt is alátámasztja, hogy a ΔC -csonkolt mutánsok a plazmamembránba irányulnak anélkül, hogy azok kombinálódna teljes hosszúságú Kv1.x alegységekkel.

A H399K mutánssal végzett kísérlet eredményei szintén alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a „HRET” régió után eső C-terminális eltávolítása nem akadályozza a Kv1.3 sejtmembránba történő kijutását. A H399K- ΔC és a H399K-FL esetében a 100mM TEA általi gátlás elhanyagolható volt, ami igazolja, hogy a H399K- ΔC és a WT Kv1.3 alegységek nem keveredtek az ER-ban (itt is CHO sejteket használtunk, amelyekben nincs endogén Kv1.x alegység), különben látnunk kellett volna a TEA általi blokkolását [100, 102]. Ezen kívül mind az A413V- ΔC , mind a H399K- ΔC alegységek FLAG epitópjait immuncitokémiával sikerült detektálnunk transzfektált, nem permeabilizált-sejtekben (CHO), ami további bizonyítékul szolgál a plazmamembránbeli lokalizációjukhoz. Érdekes módon azt is megállapítottuk, hogy az FLAG-epitópot hordozó A413V-NOHRET vagy H399K-NOHRET is membrán jelet

mutatott az anti-FLAG jelöléskor, habár a patch-clamp kísérletek azt mutatták, hogy ezeken a deléciós mutánsokon nincs mérhető áram.

Eredményeink némileg ellentmondanak a korábbi vizsgálatok eredményeinek, amelyek a „HRET” motívum utáni C-terminális régió jelentőségét hangsúlyozták a membránba jutás szabályozásában (Kv1.3, Kv1.2 és Kv1.1) [63, 75]. Azt javasolták, hogy a Kv1.3 C-terminálisának diacidikus része (E483/E484) fontos lehet a membránexpresszió szabályozásában a SEC24-el (vezikuláris transzport fehérje) való kölcsönhatás során [63]. Egy másik tanulmány kimutatta, hogy a glutamátok 438/440/442-es pozícióban (a mi konstruktunkban) végzett alaninra történő mutációja kis mértékben fokozta az ER-retenciót a hármas mutánsoknál, és a SEC24a és SEC24b leütése gátolta az ER-ből Golgiba történő transzportot [75]. Ezen kívül a mi konstruktunkhoz képest egy sokkal rövidebb frakció eltávolítása a C-terminálisból elegendő volt a Kv1.3 anterográd transzportjának leállításához [63]. Ezzel ellenkezőleg, a mi Kv1.3 csatornánk a szinte a teljes C-terminális hiányában (amely magában foglalja a HRET szekvenciát) is képes a plazmamembránban expresszálni, bár a trunkált csatornák esetében a csatornafehérje intracelluláris retenciójának növekedését figyelhettük meg.

Feltételezzük, hogy a különféle Kv1.3 gének (ebben a vizsgálatban humán, míg másoknál patkány és egér) használata több okból sem magyarázhatja a különbséget: 1) Korábban munkacsoportunk tagjai beszámoltak arról, hogy a különböző C-terminális deléciós mutáns patkány Kv1.3 csatornák magas membrán expresszióval rendelkeznek ; 2) az egér, a patkány és az emberi Kv1.3 gének nagy homológiát mutatnak; 3) munkacsoportunk nemrégiben megjelent cikkében megmutatta, hogy a WT hKv1.3 (stop kodon a HRET motívum után) C-terminális deléciója a teljes hosszúságú WT Kv1.3 áramával összehasonlítható áramokat eredményezett [13, 70]. Úgy gondoljuk, hogy a mások által észlelt C-terminálisán csonka konstruktok nagyon alacsony, vagy gyakorlatilag nulla expressziója a plazmamembránban a felhasznált-sejtvonalaknak tulajdonítható [63, 68, 93]. Például a glikozilációs vagy más poszt-transzlációs módosítás befolyásolhatja a Kv1.x csatornák membránfelszíni expressziós szintjét; vagy az ezekben a sejtekben endogén módon jelen lévő más Kv-alegységek heteromerizációja a Kv1.3-mal megakadályozhatja a plazmamembránhoz való eljutást [93, 121-127]. Amint itt látható, kizártuk a sejtvonal specifikus következtetéseket a CHO sejtvonal (egyéb Kv.x csatornát nem expresszáló) és a mutációspecifikus hatások alkalmazásával a két pont-mutáns segítségével, melyek egyedi karakterisztikával rendelkeznek.

Másrészt eredményeink összhangban vannak azokéval, akik szintén azt kapták, hogy a HRET szekvencia hiánya vagy módosítása nem befolyásolja a Kv1.1 vagy a Shaker-csatorna sejtfelszíni expresszióját, hasonlóan a Kv1.3-hoz a mi esetünkben [68, 69]. A membránba jutás mellett a HRET(E) szekvenciának a különféle csatornák vezetőképességének szabályozásában lehet szerepe. Például a Kv1.1 HRET(E) szekvenciájában szereplő arginin (R) kritikus a vezetőképes csatorna kialakításához, és a HRE-szekvenciát nem tartalmazó Shaker-csatorna egyensúlyi (steady-state) aktivációs kapuzása megváltozik [68, 69]. Eredményeink részben egyezést mutatnak ezekkel a tanulmányokkal: a C-terminálisán csonka Kv1.3, amelyből hiányzik a HRET szekvencia sejtfelszíni expressziót mutat, azonban nem vezet K^+ áramot.

Ennek a tisztázásához számos kísérletet végeztünk. Először is kimutattuk, hogy a WT Kv1.3 nem tudta helyreállítani az A413V-NOHRET alegységek vezetőképességét CHO sejtekben, ugyanis a kétféle alegység ko-transzfekeciója tiszta homotetramer WT áramokat eredményezett. A fluoreszcens mikroszkópos mérések eredményei egyértelműen kimutatták mindkét alegység jelenlétét a plazmamembránban, ezért ezek értelmezése szerint a WT Kv1.3 és az A413V-NOHRET alegységek vagy nem képeznek heterotetramereket, vagy az A413V-NOHRET alegységek jelenléte a heterotetramerben a csatorna fenotípusát domináns negatív módon befolyásolja, azaz nem-vezetővé teszi. Az a tény, hogy azok a sejtek, amelyek a WT-Kv1.3-mal voltak csak transzfekektálva sokkal nagyobb áramsűrűséget mutattak, mint a mindkét alegységet (WT és A413V-NOHRET) expresszáló sejtekben volt mérhető, alátámasztja a nem-vezető heteromerek képződését a sejtmembránban. Mivel a Kv1.3 csatorna tetramerizációját az N-terminális tetramerizációs domén, és nem a C-terminus irányítja, szintén alátámasztja a hipotézisünket, miszerint az A413V-NOHRET alegységek domináns-negatív hatással rendelkeznek a heterotetramerek képződése során [25, 128-130].

A HRET(E) szekvencia a C-terminális azon részén helyezkedik el, amely az aktivációs kapuhoz közel van, vagy annak része is lehet. Tehát az ezen régióban történő mutáció nagymértékben megváltoztathatja a csatornák aktivációs kapuzását, vagy a feszültség-szenzor mozgásának csatolását az aktivációs kapuhoz, vagy akár mindkettőt is, miközben a feszültség-szenzor mozgása nem módosul. Ennek a feltételezésnek a teszteléséhez meghatároztuk a WT-NOHRET csatornák kapuzási áramát. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy ezen csatornát expresszáló sejtek többsége nem mutatott olyan kapuzási áramokat, amelyek hasonlítanak a nem-vezető W384F mutáns kapuzási áramához. Mivel a mikroszkópos kísérletek megerősítik a NOHRET konstruktok felületi expresszióját, ez az eredmény arra utal, hogy a feszültség-szenzor mozgása sérült a NOHRET Kv1.3-ban, amelyből hiányzik a teljes C-terminális,

beleértve a HRET szekvenciát is. Ennek a „reverz csatolásnak” az eredete (vagyis a feszültségérzékelő mozgásának elmaradása az aktivációs kapu régiójának módosítása miatt) ismeretlen, de úgy tűnik, hogy nem specifikus a HRET szekvenciára. Amikor csak a HRETE szekvenciát (WT-XHRETE) vágtuk ki, vagy alaninnal helyettesítettük (WT-polyA), és a karboxil-vég többi részét épen hagytuk, vagy a HRETE-t öt alaninra cseréltük a WT-Atail konstrukcióban (és a C-terminus többi részét eltávolítottuk) a Kv1.3 vezetőképessége helyreállt. Tehát úgy tűnik, hogy egy peptidlánc hiánya a C-terminálison, az aktivációs kapunál a csatornákat nem vezetőképes csatornákká teszi, de bármilyen aminosav szekvencia motívum pótolhatja a HRETE szekvenciát, legalábbis a Kv1.3-ban.

5.2 Ca^{2+} -válasz Orai1 IS-lokalizáció függése T-sejtekben

Másodsorban, munkánk során az Orai1 csatorna IS-be történő felhalmozódási kinetikáját és molekuláris hátterét tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy az Orai1 csatornák felhalmozódása az IS kialakulása után 15 perccel érte el maximumát, majd az Orai1 polarizációt mutató sejtek frakciója a 60. percig csökkent. Ezzel ellentétben, az N-terminális deléciót tartalmazó mGFP-Orai1- Δ 72 Orai1 natív Jurkat sejtekben, valamint az mGFP-Orai1-Full csatornát kifejező, de a STIM1 ill. a SAP97 fehérjét nem expresszáló T-sejtekben magas volt az Orai1-polarizált sejtek frakciója a CD3-CD28 gyöngyökkel alkotott szinapszisban még a 60. percnél is. Az Orai1 N-terminális régió (mGFP-Orai1- Δ 72) levágása és a SAP97 leütése az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben nem volt szignifikáns hatással a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} áramra. A STIM1 leütése azonban megszüntette a Ca^{2+} -választ Jurkat sejtekben. Az mGFP-Orai1- Δ 72 és mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben a CD3-CD28 gyöngy által kiváltott Ca^{2+} -jel különbözött a (megfelelő) kontroll sejtektől, mivel ezeknél a 60. perc után is Ca^{2+} oszcillációkat láthattunk.

Számos munkacsoport beszámolt arról, hogy különféle ioncsatornák (Kv1.3, KCa3.1, Orai1, STIM1, P2X7, pannexin stb.) transzlokálódnak a T-sejt és APC között kialakuló immunszinapszisba [13-15, 131]. A T-sejt aktivációja során, a CRAC csatornák jelenléte elengedhetetlen a kalcium beáramlás útvonalának biztosításához, a kálium csatornák pedig fenntartják a negatív membránpotenciált, és létrehozzák ezzel a kalcium bejutásának mozgatórugóját, ami a T-sejtek proliferációját eredményezi [12, 14, 15, 86]. E különböző ioncsatornák IS-beli felhalmozódása elengedhetetlen a Ca^{2+} -függő aktivációhoz, amint azt Nicolaou és munkatársai is kimutatták a feszültségfüggő kálium csatorna esetében: a Kv1.3 csatornák korai távozása az SLE-s (szisztémás lupusz eritematózus) T-sejtek esetében

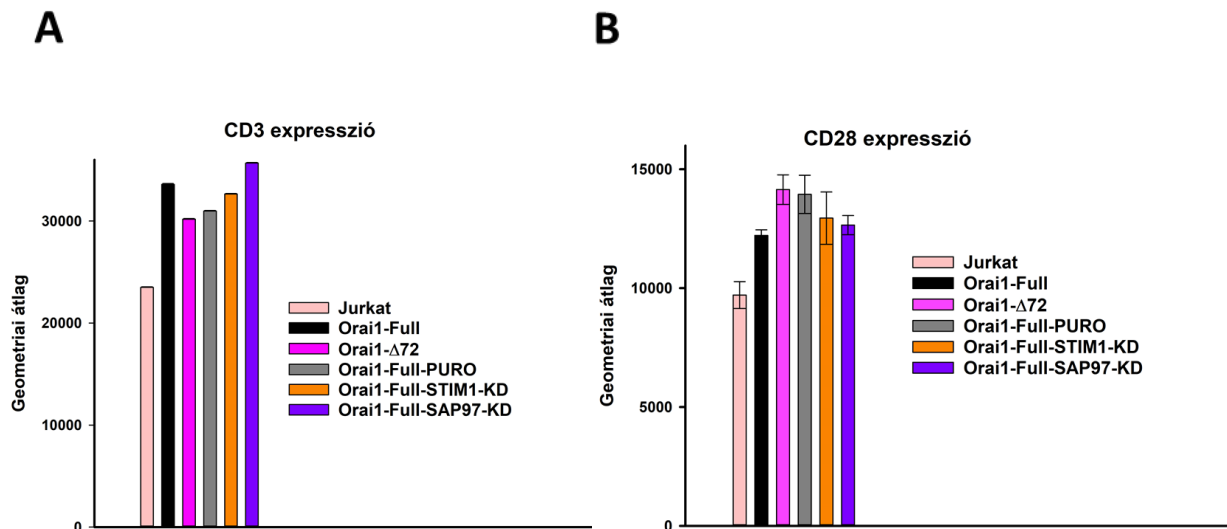
hozzájárulhat a megváltozott Ca^{2+} jelátvitelhez [84]. Kísérleteink során mi mutattuk ki először, hogy a CRAC csatornák Orai1 alegysége „kétfázisú” felhalmozódást mutat. Ez a kinetika szükséges lehet az NFAT-sejtmagba történő tartós transzlokációja és az állandó aktiváció elkerülése érdekében, ami könnyen a T-sejtek hiperaktivitásához vezethet.

Az Orai1 eloszlásának meghatározásához és a Ca^{2+} -jel alakulásának megfigyelésére az immunológiai szinapszisban, APC sejtek, kereszt-kötött antitestek vagy antitesttel bevont fedőlemezek helyett CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyöket használtunk APC-ként. Ezt a módszert általánosan használják és elfogadják az immunszinapszis létrehozásához [84, 96, 131]. Továbbá, több csoport is kimutatta, hogy a T-sejtek Ca^{2+} -válasza eléggé eltérő lehet antitest-kereszt-kötés vagy gyöngy-konjugáció hatására [84, 132]. Emiatt úgy gondoljuk, hogy pusztán az antitestek hozzáadása a sejtekhez vagy a sejteknek az antitesttel bevont síkfelülethez való rögzítése nem elegendő. A T-sejtek jellegzetes Ca^{2+} -válaszához szükség van a sejthez rögzített CD3-CD28 gyöngyök jelenlétére, fizikai interakciójára. Az IS kialakulása különböző sejtkomponensek átszervezéséhez, sejt polarizációhoz és a sejt alakjának (geometriájának) megváltozásához vezethet, ami nem valószínű, hogy megtörténik, ha antitesteket adunk hozzá, vagy a sejteket antitesttel bevont síkfelületre rögzítjük.

Az Orai1 IS-beli felhalmozódásának értékeléséhez pillanatfelvételeket készítettünk a különböző időpontokban, ahelyett, hogy élő-sejtes képalkotó kísérleteket végeztünk volna. Quintana és mtsai. munkája alapján (ahol az élő-sejtes képalkotás és a rögzített felvételek a sejtekről hasonló Orai1 eloszlási dinamikát mutattak az IS-ben) úgy gondoljuk, hogy a fixált képek alkalmazásával jól kontrollált időintervallumokat és megfelelően orientált T-sejt-gyöngy komplexeket vehetünk fel lényegesen jobb felbontásban, mint a teljes látómező élő-sejtes képalkotása során. Ezen kívül statisztikailag a pillanatfelvételek elemzésének ugyanolyan Orai1 eloszlást kell eredményeznie a szinapszisban, mint a folyamatos képalkotásnak.

A módszer, amelyet annak eldöntésére alkalmaztunk, hogy egy sejt mutat-e Orai1 polarizációt/akkumulációt, több csoport is alkalmazta [13, 84, 133]. Másrészt egy kontroll kísérleti sorozatban (az mGFP-t jelző Kv1.3 fehérjéket expresszáló CHO sejtekben, ahol nincs IS képződés, tehát egyedülálló sejteket mérünk) azt kaptuk az AA értékeknél (ez határozza meg, hogy az IS területén hányszor nagyobb az mGFP intenzitás, mint a „nem-IS” területén), hogy az egyes sejteknél az AA magasabb lehet, mint 1,0. A hamis pozitív esetek észlelésének elkerülése érdekében az AA számára a küszöbértéket 1,5-re állítottuk. Ezzel a küszöbértékkel alábecsüljük az Orai1 polarizált T-sejtek számát, amelyekben az Orai1 az IS-ben akkumulálódik, de kizárjuk a hamis pozitív detektálást.

Természetesen munkánk során meghatároztuk a CD3 és CD28 expressziós szinteket minden sejtvonalban (natív Jurkat E6-1, mGFP-Orai1-Full, mGFP-Orai1- Δ 72, mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD és mGFP-Orai1-Full-PURO), amelyeket a vizsgálatok során használtunk, és megállapítottuk, hogy közel azonos mértékben fejeződnek ki (30. ábra). Ez alapján biztosak vagyunk abban, hogy a fent leírt változások nem a natív Jurkat sejtek „manipulációjának” köszönhetők, hanem az Orai1 funkció és eloszlás változásához kapcsolódó specifikus hatásnak.



30. ábra A CD3 és CD28 expresszió a különböző sejtvonalakban.

A különböző Jurkat sejteket immunfestettük Alexa Fluor 647-tel konjugált **A)** anti-humán CD3 vagy **B)** CD28 antitestekkel. A sejtek analízisét Novocyté áramlási citométer és NovoExpress szoftver segítségével végeztük (legalább 200000 sejt/minta). A NovoExpress-ben történő kiértékelés alapján az átlag és CV értékeket (amelyet az áramlási citometriás mérések karakterizálására és összegzésére, valamint a statisztikai elemzések során az egyének kísérleti csoportjainak összehasonlítására is használnak, (CV:variációs koefficiens= $SD/átlag$ csatorna szám) ábrázoltuk a CD3 és a CD28 esetében a különböző sejtvonalaknál. (Az **A)** rész esetén az CV értékeket feltüntettük, de a túl alacsony értékek miatt nem látszódnak az ábrán.) Csak a GFP pozitív, élő sejteket vettük bele a kísérletbe.

A T-sejt aktivációja során a TCR/CD3 komplexhez kötődő specifikus antigén hatására az IP₃ az endoplazmatikus retikulum (ER) felületén lévő IP₃ receptorhoz kötődik, amely a Ca²⁺ felszabadulását eredményezi. Az ER kalcium raktárak kiürülését az ER-rezidens STIM1

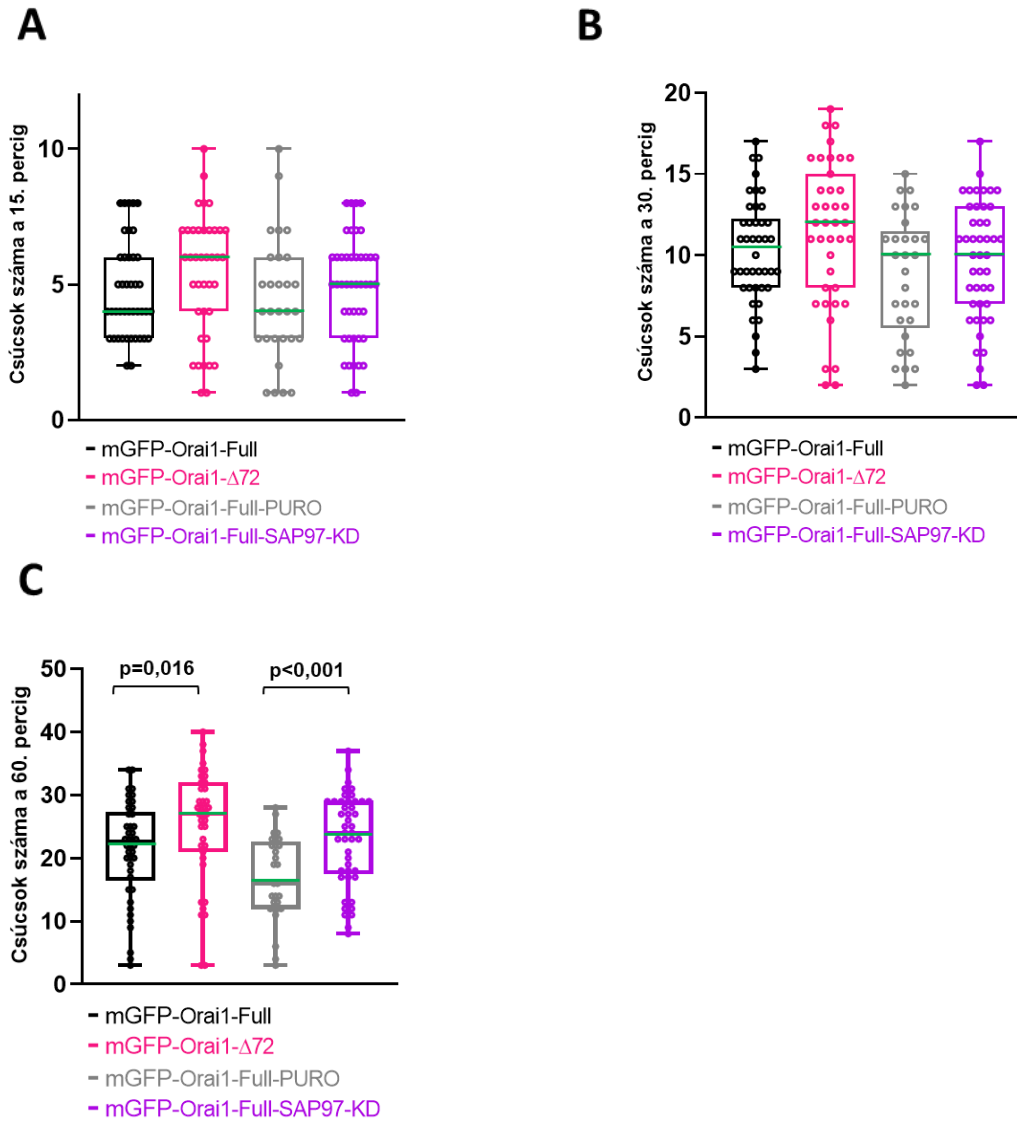
érzékel, amely aktiválja a pórusképző alegységet, az Orai1-et, előidézve így a kalcium beáramlását CRAC csatornákon keresztül. Korábban beszámoltak arról is, hogy a STIM1 az Orai1-gyel együtt halmozódik fel az IS-ben [14, 86]. A STIM1 fehérje szinapszisban (és az Orai1 elhelyezkedésében) betöltött funkciójának megértése érdekében az Orai1-Full csatornákat expresszáló Jurkat T-sejtekben leütöttük a STIM1-et (mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD). A várakozásoknak megfelelően a STIM1 leütés teljesen megszüntette a sejtek Ca^{2+} -válaszát a CRAC csatornákon keresztül. Az mGFP-Orai1-Full csatornát kifejező STIM1 leütött Jurkat sejtekben az Orai1 IS-beli felhalmozódását vizsgálva azt kaptuk, hogy az Orai1 képes STIM1 nélkül is akkumulálódni a szinapszisban, ahogyan ezt Quintana és munkatársai is kimutatták már korábban (a túl-expresszált Orai1 akkumulálódott az IS-ben az exogén STIM1 ko-expressziója nélkül is) [95]. Az Orai1 berendeződés kinetikája az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekben különbözött az mGFP-Orai1-Full sejtektől: az Orai1 polarizált T-sejtek százalékos aránya az IS kialakulása után a 60. percben mutatott maximális értéket, jelezve az Orai1 csatornák elnyújtott berendeződését a Jurkat sejtek és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakult szinapszisban. Ezek a megállapítások, melyek azt sugallják, hogy az Orai1 IS-be történő felhalmozódásához nem szükséges az Orai1-en keresztüli kalcium fluxus, valamint az Orai1 a STIM1 hiányában is képes eljutni a szinapszisba összhangban vannak Lioudyno és társai munkájával, ahol leírták, hogy a nem-funkcionális CRAC csatorna nem befolyásolja a szinapszis kialakulását, valamint az Orai1, a STIM1, a TCR, a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} nélkül is képes berendeződni az immunológiai szinapszis kontakt zónájába [14].

Ezen kívül kimutatták, hogy az Orai1 két izoformával rendelkezik. A rövidebbnek (vagy béta) szinte hiányzik a teljes N terminális régiója, pont az Orai1 vezetőképességéhez és aktiválásához szükséges ETON régió előtt [7, 38, 132]. A rövidebb izoforma expressziójának egyetlen, de fontos fiziológiai következményét találták eddig, miszerint a béta izoforma nem képes aktiválni az NFAT nukleáris transzlokációját, azonban a két izoformának (α és β) ugyanaz a thapsigargin stimulációra adott Ca^{2+} -válasza [39]. Az mGFP-Orai1- Δ 72 mutáns alkalmazásával kimutattuk, hogy az N-terminális eltávolítása drámai hatást gyakorol az Orai1 IS-akkumulációjára, ami valószínűleg befolyásolja a T-sejt aktiválódását. Ez alapján feltételezzük, hogy a béta izoforma képes lehet a T-sejt aktivációt befolyásolni az NFAT transzlokáció megváltoztatásán keresztül.

Az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD és mGFP-Orai1- Δ 72 sejtekben az Orai1 alegységek hasonló akkumulációs kinetikájából adódóan teszteltük azt a hipotézist, miszerint a SAP97

(vagy hDlg1) , amelyről kimutatták, hogy bemegy az IS-be és 15 perccel a szinapszis képződése után elhagyja az IS-t, szerepet játszik-e az Orai1 IS-ből történő kivándorlásában [134]. A SAP97 csendesítése során megfigyelhettük (csakúgy, mint az mGFP-Orai1- Δ 72 és az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD Jurkat sejtekben) az mGFP-Orai1-Full fehérjék folyamatos (tartós) berendeződését az IS-be egészen a 60. percig: ennél a pontnál megállapíthatjuk, hogy a SAP97 és a STIM1 kulcsfontosságú szerepet tölthetnek be az Orai1 szinapszisban való tartózkodásának szabályozásában.

Fentebb említettük, hogy az mGFP-Orai1- Δ 72 és mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtvonalak esetében az Orai1 IS-beli felhalmozódását mutató sejtek aránya a 60. percnél nagyobb volt, mint 15 percnél a (24.B és 27.B ábra). Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a Ca^{2+} -válasz időbeli eloszlása különbözött az mGFP-Orai1- Δ 72, mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben a kontroll (mGFP-Orai1-Full és mGFP-Orai1-Full-PURO) sejtekhez képest. Bár az első 15. és 30. percben nem találtunk különbséget a különböző sejtvonalak Ca^{2+} -válaszában, azonban a 60. percnél vagy azon túl szignifikáns különbség volt a kontroll és manipulált sejtek (mGFP-Orai1-Full vs. mGFP-Orai1- Δ 72, mGFP-Orai1-Full-PURO vs. mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD) között (31.ábra).



31. ábra A Ca^{2+} -válaszok a különböző sejtípusokban a CD3-CD28 gyöngyökkel való szinapszis kialakítása után

IS-ben mért kalcium csúcsok a Jurkat sejtek és a CD3-CD28 gyöngyök között kialakult szinapszis utáni **A**) 15. percig, **B**) 30. percig és **C**) 60. percig (lásd anyagok és módszerek). A kísérletek során összesen 42db mGFP-Orai1-Full, 39db mGFP-Orai1-Δ72, 45db mGFP-Orai1-SAP97-KD és 29db mGFP-Orai1-Full-PURO sejtet használtunk, 3 független mérés során. A pontok az egyes sejtek kalcium csúcsainak számát jelzik. A zöld vonal a mediánt jelöli.

Tehát vagy a SAP97 fehérje, vagy az N-terminális rész nélkül az Orai1 csatorna továbbra is működőképes marad, és képes az immunológiai szinapszisba bejutni és felhalmozódni. Ezen túlmenően ezek a módosítások, amelyek hosszabb tartózkodási időt eredményeznek, megváltoztatják a Ca^{2+} jel időbeli eloszlását, és magasabb és nagyobb számú kalcium oszcillációhoz vezetnek. A T-sejt és az APC között kialakult IS akár több óráig is fennmaradhat (amint azt a Mark Davis Immunology Review leírja): ekkor a sejtek közti összekapcsolódás időtartama alatt különféle citokinek és egyéb faktorok szekréciója megy végbe, amelyet szintén a citoszólikus Ca^{2+} koncentráció szabályoz [78]. Az Orai1 IS-ben való bennmaradása tartós kalcium-oszcillációkat idézhet elő a T-sejtekben, és ezáltal patológiás jelátviteli útvonalakat indukálhat.

Végezetül úgy véljük, hogy a SAP97, amely elősegítheti a fehérjék közötti kölcsönhatásokat, és szerepet játszhat az ioncsatornák endocitózisában, része lehet egy molekuláris komplexnek: az Orai1, a STIM1 és a SAP97 kölcsönható partnerek segítségével hagyja el a szinapszis kontaktzónáját [134]. Ez a feltételezés összhangban van a Jurkat sejtekben lévő N-terminálisán csonka Orai1 (mGFP-Orai1- Δ 72) és a STIM1- és SAP97-hiányos mGFP-Orai1-Full sejtek hasonló Orai1 felhalmozódási kinetikájával, valamint az mGFP-Orai1- Δ 72 és az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtek hasonló Ca^{2+} mintázatával CD3-CD28 bead hatására létrejött immunológiai szinapszisban.

A dolgozatban bemutatott módszerek és eredmények saját munkából származnak.

6 Összefoglalás

A tézis első felében bebizonyítottuk, hogy a plazmamembránba irányuló Kv1.3 csatorna kijutás akkor is megmarad, ha a teljes C-terminust, beleértve a HRET szekvenciát is eltávolítottuk. Ez a megállapítás kiemeli, hogy a membránban történő kifejeződés motívumai nem feltétlenül univerzálisak, és fontosságukat minden egyes csatorna/expressziós rendszer esetében meg kell vizsgálni. Hasonló következtetés vonható le a HRET(E) szekvencia szerepéről a csatorna vezetőképességének szabályozásában: a Kv1.3 esetén még a HRETE szekvencia alanin szubsztitúciója is helyreállította a csatorna funkcióját [68, 135]. Ezen és más közelmúltbeli tanulmányok alapján a Kv1.3 C-terminálisán lévő aminosavak, amelyek közel vannak az aktivációs kapuhoz, fontos szerepet töltenek be az ionvezetés fenntartásában, míg a távoli C-terminális aminosavak a más fehérjékkel való kölcsönhatást szabályozzák, vagy koleszterin-érzékenységet kölcsönöznek a Kv1.3 csatornának [136].

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

7 Summary

In the first part of the thesis, we demonstrated that Kv1.3 channel trafficking to the plasma membrane is preserved even if the whole C-terminus, including the HRET sequence is deleted. This finding highlights that trafficking motifs may not be universal and their importance must be tested for each channel/expression system combination. A similar conclusion can be drawn about the role of the HRET sequence in regulation of Kv1.3 channel conductance: even alanine substitution of the HRETE sequence restored channel function. Based on this and other recent papers the presence of the C-terminal amino acids adjacent to the activation gate in Kv1.3 are important for maintaining ion conductance, whereas distant C-terminal amino acids govern interactions with other proteins or confer cholesterol sensitivity to the Kv1.3.

In the second part of the thesis, we could show that the Orai1 subunit of CRAC channels have a unique accumulation kinetics in the IS. The knockdown of SAP97 and STIM1, and deletion of the putative binding site for SAP97 on Orai1 N-terminus demonstrated that SAP97 and STIM1 may be essential in the regulation of Orai1 IS-residence. Arrest of Orai1 in the IS modify the Ca^{2+} response of Jurkat T cells upon CD3-CD28 activation, which possibly contributes to T cell hyperactivity. We suppose that existence of two Orai1 isoforms could have role in regulation of T cells' Ca^{2+} -dependent activation, however, this should be elucidated. We believe that learning the molecular background of Orai1 rearrangement to the IS can facilitate the understanding the mechanism of autoimmune diseases.

8 Referenciák

1. Dustin, M.L., *The immunological synapse*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S119-25.
2. Cemerski, S. and A. Shaw, *Immune synapses in T-cell activation*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 298-304.
3. Krummel, M.F. and M.D. Cahalan, *The immunological synapse: a dynamic platform for local signaling*. J Clin Immunol, 2010. **30**(3): p. 364-72.
4. Gascoigne, N.R., T. Zal, and S.M. Alam, *T-cell receptor binding kinetics in T-cell development and activation*. Expert Rev Mol Med, 2001. **2001**: p. 1-17.
5. Janeway Jr, C.A., *Immunobiology*. 2020, Abingdon: Taylor and Francis.
6. Yeung, P.S., M. Yamashita, and M. Prakriya, *Pore opening mechanism of CRAC channels*. Cell Calcium, 2017. **63**: p. 14-19.
7. Lunz, V., C. Romanin, and I. Frischauf, *STIM1 activation of Orai1*. Cell Calcium, 2019. **77**: p. 29-38.
8. Shim, A.H., L. Tirado-Lee, and M. Prakriya, *Structural and functional mechanisms of CRAC channel regulation*. J Mol Biol, 2015. **427**(1): p. 77-93.
9. Lin, C.S., et al., *Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation*. J Exp Med, 1993. **177**(3): p. 637-45.
10. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy, *The functional network of ion channels in T lymphocytes*. Immunol Rev, 2009. **231**(1): p. 59-87.
11. Rader, R.K., et al., *T cell activation is regulated by voltage-dependent and calcium-activated potassium channels*. J Immunol, 1996. **156**(4): p. 1425-30.
12. Panyi, G., et al., *Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1285-90.
13. Szilágyi, O., et al., *The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2013. **465**(9): p. 1341-1353.
14. Lioudyno, M.I., et al., *Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2011-6.
15. Nicolaou, S.A., et al., *The Ca(2+)-activated K(+) channel KCa3.1 compartmentalizes in the immunological synapse of human T lymphocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(4): p. C1431-9.
16. Panyi, G., et al., *Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling*. Trends Immunol, 2004. **25**(11): p. 565-9.
17. Feske, S., et al., *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 179-85.
18. Kim, K.D., et al., *ORAI1 deficiency impairs activated T cell death and enhances T cell survival*. J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3620-30.
19. Whitacre, J.M., J. Lin, and A. Harding, *T Cell Adaptive Immunity Proceeds through Environment-Induced Adaptation from the Exposure of Cryptic Genetic Variation*. Front Genet, 2012. **3**: p. 5.
20. Yam-Puc, J.C., et al., *Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation*. F1000Res, 2018. **7**: p. 429.
21. Treanor, B., *B-cell receptor: from resting state to activate*. Immunology, 2012. **136**(1): p. 21-7.

22. Weissman, I.L., *Thymus cell migration*. J Exp Med, 1967. **126**(2): p. 291-304.
23. Davies, A.J., et al., *The morphology of immune reactions in normal, thymectomized and reconstituted mice. I. The response to sheep erythrocytes*. Immunology, 1969. **16**(1): p. 57-69.
24. Hille, B., *Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches*. Biophys J, 1978. **22**(2): p. 283-94.
25. Deutsch, C., *The birth of a channel*. Neuron, 2003. **40**(2): p. 265-76.
26. Deutsch, C., *Potassium channel ontogeny*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 19-46.
27. Sewing, S., J. Roeper, and O. Pongs, *Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits*. Neuron, 1996. **16**(2): p. 455-63.
28. Liman, E.R., et al., *Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel*. Nature, 1991. **353**(6346): p. 752-6.
29. Lai, H.C. and L.Y. Jan, *The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(7): p. 548-62.
30. Burke, N.A., et al., *Distinct structural requirements for clustering and immobilization of K⁺ channels by PSD-95*. J Gen Physiol, 1999. **113**(1): p. 71-80.
31. Kim, E., et al., *Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 85-8.
32. Kim, E. and M. Sheng, *Differential K⁺ channel clustering activity of PSD-95 and SAP97, two related membrane-associated putative guanylate kinases*. Neuropharmacology, 1996. **35**(7): p. 993-1000.
33. Gong, J., et al., *Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2*. Science, 1999. **285**(5433): p. 1565-9.
34. Luik, R.M., et al., *The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions*. J Cell Biol, 2006. **174**(6): p. 815-25.
35. Chen, Y.F., L.H. Chen, and M.R. Shen, *The distinct role of STIM1 and STIM2 in the regulation of store-operated Ca(2+) entry and cellular function*. J Cell Physiol, 2019. **234**(6): p. 8727-8739.
36. Yamashita, M., et al., *STIM1 activates CRAC channels through rotation of the pore helix to open a hydrophobic gate*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14512.
37. Prakriya, M., et al., *Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 230-3.
38. Fukushima, M., et al., *Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 18): p. 4354-61.
39. Kar, P., et al., *The N terminus of Orai1 couples to the AKAP79 signaling complex to drive NFAT1 activation by local Ca(2+) entry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(19).
40. Cai, X., et al., *The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer*. J Biol Chem, 2016. **291**(50): p. 25764-25775.
41. Yen, M., L.A. Lokteva, and R.S. Lewis, *Functional Analysis of Orai1 Concatemers Supports a Hexameric Stoichiometry for the CRAC Channel*. Biophys J, 2016. **111**(9): p. 1897-1907.
42. Hou, X., et al., *Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai*. Science, 2012. **338**(6112): p. 1308-13.
43. Derler, I., et al., *The extended transmembrane Orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for Orai1 activation by STIM1*. J Biol Chem, 2013. **288**(40): p. 29025-34.

44. Zhou, Y., et al., *The STIM-Orai coupling interface and gating of the Orai1 channel*. Cell Calcium, 2017. **63**: p. 8-13.
45. Shuttleworth, T.J., *Orai3--the 'exceptional' Orai?* J Physiol, 2012. **590**(2): p. 241-57.
46. Mercer, J.C., et al., *Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24979-90.
47. Trebak, M., *STIM/Orai signalling complexes in vascular smooth muscle*. J Physiol, 2012. **590**(17): p. 4201-8.
48. Motiani, R.K., et al., *Emerging roles of Orai3 in pathophysiology*. Channels (Austin), 2013. **7**(5): p. 392-401.
49. Vaeth, M., et al., *ORAI2 modulates store-operated calcium entry and T cell-mediated immunity*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14714.
50. Alansary, D., I. Bogeski, and B.A. Niemeyer, *Facilitation of Orai3 targeting and store-operated function by Orai1*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(7): p. 1541-50.
51. Moccia, F., et al., *Stim and Orai proteins in neuronal Ca(2+) signaling and excitability*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 153.
52. Potier, M. and M. Trebak, *New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway*. Pflugers Arch, 2008. **457**(2): p. 405-15.
53. Bird, G.S., et al., *STIM1 is a calcium sensor specialized for digital signaling*. Curr Biol, 2009. **19**(20): p. 1724-9.
54. Soboloff, J., et al., *STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry*. Curr Biol, 2006. **16**(14): p. 1465-70.
55. Brandman, O., et al., *STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels*. Cell, 2007. **131**(7): p. 1327-39.
56. Parvez, S., et al., *STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation*. FASEB J, 2008. **22**(3): p. 752-61.
57. Zhou, Y., et al., *The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels*. J Biol Chem, 2009. **284**(29): p. 19164-8.
58. Soboloff, J., et al., *Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20661-20665.
59. Picard, C., et al., *STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity*. N Engl J Med, 2009. **360**(19): p. 1971-80.
60. Chou, J., et al., *A novel mutation in ORAI1 presenting with combined immunodeficiency and residual T-cell function*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(2): p. 479-482 e1.
61. Feske, S., C. Picard, and A. Fischer, *Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1*. Clin Immunol, 2010. **135**(2): p. 169-82.
62. Lacruz, R.S. and S. Feske, *Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1356**: p. 45-79.
63. Martinez-Marmol, R., et al., *A non-canonical di-acidic signal at the C-terminus of Kv1.3 determines anterograde trafficking and surface expression*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 24): p. 5681-91.
64. Manganas, L.N. and J.S. Trimmer, *Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29685-93.
65. Zhu, J., et al., *Trafficking of Kv1.4 potassium channels: interdependence of a pore region determinant and a cytoplasmic C-terminal VXXSL determinant in regulating cell-surface trafficking*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 761-8.
66. Levitan, E.S. and K. Takimoto, *Surface expression of Kv1 voltage-gated K⁺ channels is governed by a C-terminal motif*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(7): p. 317-20.

67. Misonou, H. and J.S. Trimmer, *Determinants of voltage-gated potassium channel surface expression and localization in Mammalian neurons*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2004. **39**(3): p. 125-45.
68. Zhu, J., et al., *Kv1 potassium channel C-terminus constant HRETE region: arginine substitution affects surface protein level and conductance level of subfamily members differentially*. Mol Membr Biol, 2007. **24**(3): p. 194-205.
69. Lu, Z., A.M. Klem, and Y. Ramu, *Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels*. J Gen Physiol, 2002. **120**(5): p. 663-76.
70. Cheng, L., et al., *Cortactin is required for N-cadherin regulation of Kv1.5 channel function*. J Biol Chem, 2011. **286**(23): p. 20478-89.
71. Herrmann, S., et al., *Cortactin controls surface expression of the voltage-gated potassium channel K(V)10.1*. J Biol Chem, 2012. **287**(53): p. 44151-63.
72. Williams, M.R., et al., *An essential role for cortactin in the modulation of the potassium channel Kv1.2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(44): p. 17412-7.
73. Jugloff, D.G., et al., *Internalization of the Kv1.4 potassium channel is suppressed by clustering interactions with PSD-95*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 1357-64.
74. Tiffany, A.M., et al., *PSD-95 and SAP97 exhibit distinct mechanisms for regulating K(+) channel surface expression and clustering*. J Cell Biol, 2000. **148**(1): p. 147-58.
75. Spear, J.M., et al., *Kv1.3 contains an alternative C-terminal ER exit motif and is recruited into COPII vesicles by Sec24a*. BMC Biochem, 2015. **16**: p. 16.
76. Panyi, G. and C. Deutsch, *Cross talk between activation and slow inactivation gates of Shaker potassium channels*. J Gen Physiol, 2006. **128**(5): p. 547-59.
77. Huang, Y. and J.K. Burkhardt, *T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 5): p. 723-30.
78. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 973-83.
79. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
80. Bachmann, M.F., et al., *Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 549-57.
81. Brossard, C., et al., *Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1741-53.
82. Espagnolle, N., et al., *CD2 and TCR synergize for the activation of phospholipase Cgamma1/calcium pathway at the immunological synapse*. Int Immunol, 2007. **19**(3): p. 239-48.
83. Fooksman, D.R., et al., *Functional anatomy of T cell activation and synapse formation*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 79-105.
84. Nicolaou, S.A., et al., *Altered dynamics of Kv1.3 channel compartmentalization in the immunological synapse in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 346-56.
85. Nicolaou, S.A., et al., *Localization of Kv1.3 channels in the immunological synapse modulates the calcium response to antigen stimulation in T lymphocytes*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6296-302.
86. Hartzell, C.A., et al., *Calcium influx through CRAC channels controls actin organization and dynamics at the immune synapse*. Elife, 2016. **5**.
87. Funke, L., S. Dakoji, and D.S. Bredt, *Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 219-45.
88. Oliva, C., et al., *Role of the MAGUK protein family in synapse formation and function*. Dev Neurobiol, 2012. **72**(1): p. 57-72.

89. Wu, H., et al., *Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP*. 2000. **19**(21): p. 5740-5751.
90. Fourie, C., D. Li, and J.M. Montgomery, *The anchoring protein SAP97 influences the trafficking and localisation of multiple membrane channels*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(2): p. 589-94.
91. Cai, C., et al., *Interaction between SAP97 and PSD-95, two Maguk proteins involved in synaptic trafficking of AMPA receptors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(7): p. 4267-73.
92. Xavier, R., et al., *Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation*. *J Cell Biol*, 2004. **166**(2): p. 173-8.
93. Bartok, A., et al., *Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels*. *Toxicon*, 2014. **87**: p. 6-16.
94. Helms, L.M., et al., *Margatoxin binds to a homomultimer of K(V)1.3 channels in Jurkat cells. Comparison with K(V)1.3 expressed in CHO cells*. *Biochemistry*, 1997. **36**(12): p. 3737-44.
95. Quintana, A., et al., *Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation*. *EMBO J*, 2011. **30**(19): p. 3895-912.
96. Castro-Ochoa, K.F., I.M. Guerrero-Fonseca, and M. Schnoor, *Hematopoietic cell-specific lyn substrate (HCLS1 or HS1): A versatile actin-binding protein in leukocytes*. *J Leukoc Biol*, 2019. **105**(5): p. 881-890.
97. Panyi, G., Z. Sheng, and C. Deutsch, *C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism*. *Biophys J*, 1995. **69**(3): p. 896-903.
98. Panyi, G. and C. Deutsch, *Assembly and suppression of endogenous Kv1.3 channels in human T cells*. *J Gen Physiol*, 1996. **107**(3): p. 409-20.
99. Heginbotham, L. and R. MacKinnon, *The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels*. *Neuron*, 1992. **8**(3): p. 483-91.
100. Yellen, G., et al., *Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel*. *Science*, 1991. **251**(4996): p. 939-42.
101. Balajthy, A., et al., *7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell function in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. *Pflugers Arch*, 2016. **468**(8): p. 1403-18.
102. MacKinnon, R. and G. Yellen, *Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels*. *Science*, 1990. **250**(4978): p. 276-9.
103. Somodi, S., et al., *pH-dependent modulation of Kv1.3 inactivation: role of His399*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(4): p. C1067-76.
104. Bezanilla, F., *The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels*. 2000. **80**(2): p. 555-592.
105. Perozo, E., et al., *Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels*. *Neuron*, 1993. **11**(2): p. 353-8.
106. Yang, Y., Y. Yan, and F.J. Sigworth, *How does the W434F mutation block current in Shaker potassium channels?* *J Gen Physiol*, 1997. **109**(6): p. 779-89.
107. Starkus, J.G., et al., *Macroscopic Na⁺ currents in the "Nonconducting" Shaker potassium channel mutant W434F*. *J Gen Physiol*, 1998. **112**(1): p. 85-93.
108. Varga, Z., M.D. Rayner, and J.G. Starkus, *Cations affect the rate of gating charge recovery in wild-type and W434F Shaker channels through a variety of mechanisms*. *J Gen Physiol*, 2002. **119**(5): p. 467-85.
109. Kubota, T., A.M. Correa, and F. Bezanilla, *Mechanism of functional interaction between potassium channel Kv1.3 and sodium channel NavBeta1 subunit*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 45310.

110. Eil, R., et al., *Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function*. *Nature*, 2016. **537**(7621): p. 539-543.
111. Yeung, P.S., M. Yamashita, and M. Prakriya, *Molecular basis of allosteric Orai1 channel activation by STIM1*. *J Physiol*, 2019.
112. Calloway, N., et al., *Molecular clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the plasma membrane depends dynamically on depletion of Ca²⁺ stores and on electrostatic interactions*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(1): p. 389-99.
113. Hodeify, R., et al., *A STIM1-dependent 'trafficking trap' mechanism regulates Orai1 plasma membrane residence and Ca(2)(+) influx levels*. *J Cell Sci*, 2015. **128**(16): p. 3143-54.
114. Numaga-Tomita, T. and J.W. Putney, *Role of STIM1- and Orai1-mediated Ca²⁺ entry in Ca²⁺-induced epidermal keratinocyte differentiation*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 2): p. 605-12.
115. Jousset, H., M. Frieden, and N. Demaurex, *STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca²⁺ channels located close to sarco/endoplasmic Ca²⁺ ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(15): p. 11456-64.
116. Park, C.Y., et al., *STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1*. *Cell*, 2009. **136**(5): p. 876-90.
117. McNally, B.A., et al., *The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels*. *J Physiol*, 2013. **591**(11): p. 2833-50.
118. Abdelazeem, K.N.M., et al., *Upregulation of Orai1 and STIM1 expression as well as store-operated Ca(2+) entry in ovary carcinoma cells by placental growth factor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. **512**(3): p. 467-472.
119. Butorac, C., et al., *A novel STIM1-Orai1 gating interface essential for CRAC channel activation*. *Cell Calcium*, 2019. **79**: p. 57-67.
120. Hu, L., et al., *Functional blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 mediates reversion of T effector to central memory lymphocytes through SMAD3/p21cip1 signaling*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(2): p. 1261-8.
121. Zhao, L.L., et al., *Regulatory role of the extreme C-terminal end of the S6 inner helix in C-terminal-truncated Kv1.2 channel activation*. *Cell Biol Int*, 2010. **34**(5): p. 433-9.
122. Hajdu, P., et al., *The C-terminus SH3-binding domain of Kv1.3 is required for the actin-mediated immobilization of the channel via cortactin*. *Mol Biol Cell*, 2015. **26**(9): p. 1640-51.
123. Sutachan, J.J., et al., *Effects of Kv1.1 channel glycosylation on C-type inactivation and simulated action potentials*. *Brain Res*, 2005. **1058**(1-2): p. 30-43.
124. Watanabe, I., et al., *Glycosylation affects rat Kv1.1 potassium channel gating by a combined surface potential and cooperative subunit interaction mechanism*. *J Physiol*, 2003. **550**(Pt 1): p. 51-66.
125. Watanabe, I., et al., *Glycosylation affects the protein stability and cell surface expression of Kv1.4 but Not Kv1.1 potassium channels. A pore region determinant dictates the effect of glycosylation on trafficking*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 8879-85.
126. Watanabe, I., et al., *The degree of N-glycosylation affects the trafficking and cell surface expression levels of Kv1.4 potassium channels*. *J Membr Biol*, 2015. **248**(2): p. 187-96.
127. Watanabe, I., et al., *The glycosylation state of Kv1.2 potassium channels affects trafficking, gating, and simulated action potentials*. *Brain Res*, 2007. **1144**: p. 1-18.

128. Zhu, J., et al., *The Kv1.2 potassium channel: the position of an N-glycan on the extracellular linkers affects its protein expression and function*. Brain Res, 2009. **1251**: p. 16-29.
129. Zhu, J., J. Yan, and W.B. Thornhill, *N-glycosylation promotes the cell surface expression of Kv1.3 potassium channels*. FEBS J, 2012. **279**(15): p. 2632-44.
130. Sanguinetti, M.C., *Dysfunction of delayed rectifier potassium channels in an inherited cardiac arrhythmia*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **868**: p. 406-13.
131. Woehrle, T., et al., *Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse*. Blood, 2010. **116**(18): p. 3475-84.
132. Yeung, P.S., et al., *Mapping the functional anatomy of Orai1 transmembrane domains for CRAC channel gating*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(22): p. E5193-E5202.
133. Nyakeriga, A.M., et al., *Engagement of the CD4 receptor affects the redistribution of Lck to the immunological synapse in primary T cells: implications for T-cell activation during human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1193-200.
134. Round, J.L., et al., *Dlgh1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells*. J Exp Med, 2005. **201**(3): p. 419-30.
135. Chiang, C.E. and D.M. Roden, *The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(1): p. 1-12.
136. Li, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel*. Science, 1992. **257**(5074): p. 1225-30.

9 Tárgyszavak

T-sejt aktiváció

immunológiai szinapszis

T-sejtek

ioncsatornák

Kv1.3

Orai1

membránexpresszió

kapuzás

kalcium

HRET(E)

SAP97

felhalmozódás

10 Keywords

T-cell activation

immunological synapse

T-cells

ionchannels

Kv1.3

Orai1

membrane expression

gating

calcium

HRET(E)

SAP97

accumulation

11 Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Hajdu Péter Bélának, aki szakmai tudásával és tapasztalataival irányította tudományos munkámat. Megtanította a tézisem során használt, főleg molekuláris biológiai módszereket, illetve időt és energiát nem sajnálva segített az elektrofiziológiai mérések elsajátításában és megértésében. ☺

Köszönetem fejezem ki Prof. Dr. Panyi Györgynek, aki munkacsoportunk vezetőjeként és a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi intézetigazgatójaként lehetővé tette, hogy munkámat ebben a munkacsoportban és intézetben végezhessem, valamint korábbi intézetigazgatónak, Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak is, hogy lehetővé tette, hogy munkámat a BSI-ben kezdjem el.

Köszönetemet szeretném kifejezni Bagosi Adriennek és Nagy Cecíliának a kísérletek és mérések előkészítésénél nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni a munkacsoportunk tagjainak, hogy mindig készségesen segítettek munkámat, valamint a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának.

És nem utolsó sorban, szeretném megköszönni Férjemnek és családomnak, akik mindenben támogattak.



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,484

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

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

Debrecen, 2021.12.21.

