

**FESZÜLTSGFÜGGŐ IONCSATORNÁK
ELEKTROFIZIOLÓGIAI VIZSGÁLATA**

SZÉKELY ANDREA



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET**

2007

**FESZÜLTSGFÜGGŐ IONCSATORNÁK
ELEKTROFIZIOLÓGIAI VIZSGÁLATA**

SZÉKELY ANDREA

Témavezető: Dr. Krasznai Zoltán egyetemi docens

Dr. Panyi György egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET

2007

RÖVIDÍTÉSEK

AA	arachidonsav
4-AP	4-amino-piridin
BK _{Ca}	Ca ²⁺ aktivált K ⁺ csatorna
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
ChTx	Charybdotoxin
Con A	concanavalin A
CPA	N ⁶ -ciklopentil-adenozin
CGS 21680	2-[p-(2-karbonil-etil)-feniletilamino]-5'-N-etil-karboxamido-adenozin
CPX	1,3-dipropil-8-ciklopentil-xantin
CSC	8-(3-klórsztiril)-koffein
DHA	dokozahexaénsav
DRM	detergens-rezisztens membrándomén
FBS	foetal bovine serum
F-NECA	5'-N-(2-fluor-etil)-karboxamido-adenozin
G _i	inhibitor G fehérje
G _s	serkentő G fehérje
HPL	humán perifériás limfocita
IL-2	interleukin-2
K _{ATP}	ATP szenzitív K ⁺ csatorna
K _{Ca}	Ca ²⁺ aktivált K ⁺ csatorna
K _V	feszültségkapuzott K ⁺ csatorna
LA	linolsav
Lck	Src típusú foszfortirozin-kináz
MÁH	megmaradó áramhányad
MgTx	Margatoxin
MUFA	egyszeresen telítetlen zsírsav
NECA	5'-N-etil-karboxamido-adenozin
NxTx	Noxiustoxin
OA	olajsav
PA	palmitinsav
PET	pozitron-emissziós tomográfia
PTx	pertussis toxin

PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav
P	purinerg
SA	sztearinsav
SFA	telített zsírsav
Src	szarkóma víusból azonosított tirozin-kináz
TEA ⁺	tetraetil-ammónium ion
TREK-1	2 pórusú K ⁺ csatorna
TRAAK	arachidonsav-stimulált K ⁺ csatorna
TTx	tetrodotoxin
ZM 241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol

1. BEVEZETÉS

A humán limfociták K^+ csatornái és membránpotenciálja fontos szerepet játszanak az immunválaszhoz szükséges jelátviteli folyamatokban, a sejtek membránjának hiperpolarizált állapotban történő folyamatos fenntartásában és ezáltal a mitogén stimuláció elindításához szükséges feltételek biztosításában. A T sejtek specifikus antigének felismerését követően aktiválódnak, ami olyan biokémiai folyamatok kaszkádját foglalja magában, mely végül a T sejtek proliferációjához vezet. A T limfociták membránjában többféle K^+ csatornát azonosítottak, melyek közül a legjelentősebbnek a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák ($K_{Ca}3.1$ vagy $IK_{Ca}1$) és a feszültségfüggő, depolarizációra aktiválódó $K_V1.3$ csatornák bizonyultak. Ezek a csatornák közvetve szabályozzák az intracelluláris Ca^{2+} jeleket, amelyek nélkülözhetetlenek a T sejt-proliferációhoz. A feszültségkapuzott K^+ csatornák blokkolói [tetraetil-ammónium-ion (TEA^+), *Charibdotoxin* (ChTx), *Noxiustoxin* (NxTx), *Margatoxin* (MgTx)] a K^+ áram gátlásán túl a sejtek mitogén-indukált proliferációját is hatékonyan gátolják – ez az egyik bizonyítéka a K^+ csatornák T sejt-aktivációban betöltött kulcsszerepének. A nyugvó T sejt membrán K^+ konduktanciájának növekedése mitogén stimuláció során, valamint a $K_{Ca}3.1$ csatornák expressziós szintjének növekedése a T sejt-aktiváció alatt szintén a K^+ csatornák T sejt-aktivációban és az azt követő proliferációban betöltött szerepét mutatja. Valószínűsíthető, hogy a K^+ csatornák a membrán hiperpolarizációja révén teremtik meg a feltételeket a mitogén válaszhoz szükséges intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedéséhez.

A $K_V1.3$ a feszültségfüggő K^+ csatornák *Shaker* családjába tartozik. A működőképes csatornát négy azonos alegység alkotja (homotetramer), melyek mindegyike hat α -helikális transzmembrán szegmensből épül fel (S1-S6), az egyes szegmenseket intra- és extracelluláris hurkok kapcsolják össze. Az S1-S4 szegmensek alkotják a feszültségkapuzott csatornák feszültség-szenzor doménjeit (minden alegységben egyet, vagyis csatornánként négyet), ezek felelősek a K_V csatornák feszültségfüggő aktivációjáért, míg az S5 és S6 szegmensek és a hozzájuk kapcsolódó extracelluláris hurok (P) (a négy alegység ezen szakaszai együtt) a feszültségérzékelő modulokhoz kapcsolódva alkotják a belső pórusképző komplexet, amelyen keresztül a K^+ ionok átjutnak a membránon.

A feszültségkapuzott K^+ csatornáknak a membrán depolarizációja által kiváltott aktivációját (nyitását) a csatornafehérje első négy szegmensében bekövetkező konformációs változásnak tulajdonítják. A gyors aktivációt követően a *Shaker* K^+ csatornák egy nem vezető, inaktivált állapotba kerülnek. Az inaktiváció kétféle mechanizmus révén valósulhat meg. Az N-típusúnak nevezett gyors inaktiváció néhány ms-ig tart, és az ún. „labda-és-lánc” („ball-and-chain”) mechanizmus következtében alakul ki, amelyben a fehérje N-terminusa blokkolóként viselkedik

úgy, hogy a csatorna citoplazma felőli oldalán bekötődik, ezáltal elzárja a pórust. A C-típusúnak nevezett lassú inaktiváció több s-ig tart, és egy a pórusban, összetett mechanizmussal lejátszódó konformációs változás eredménye, ami alapvetően a szelektivitási filter és a csatorna extracelluláris bejárata környékére korlátozódik, és érzékeny az externális kationokra és a csatornapórus aminosav-összetételére. A C-típusú inaktiváció kialakulásának nem feltétele az N-típusú inaktiváció, de az N-típusú inaktiváció gyorsíthatja a C-típusút. A $K_v1.3$ csatornák inaktivációját kizárólag a lassú, P/C típusú mechanizmus közvetíti.

A plazmamembrán lipidösszetétele számottevően befolyásolja a membránok tulajdonságait, például a fluiditást. A membránok fluiditása vagy szerkezeti rendje alapvetően befolyásolja a membránfolyamatokat és -funkciókat, a membránban kötött fehérjék működését. A membrán dinamikai sajátságai és folyadékkristályos állapota befolyásolhat membránhoz kötött funkciókat, a membránfehérjék konformációját és flexibilitását, a permeabilitási viszonyokat, a citoplazma-membránban található ioncsatornák kinetikai paramétereit és az enzimaktivitásokat. Különböző körülmények között a plazmamembrán lipidösszetétele és rendezettsége megváltozhat. Ez a változás jelentősen módosíthatja a membránfluiditást, megváltoztatva ezzel az alapvető tulajdonságokat a membrán módosított részeiben; és különösképpen megzavarhatja az ioncsatornák működését. Mivel az ioncsatornák transzmembrán fehérjék, a lipid-fehérje kölcsönhatások befolyásolhatják ezek működését is. A csatornák kapuzása fehérjekonformáció-változást jelent, ezért a csatornák lipidkörnyezetének megváltozása módosíthatja például azok aktivációs és inaktivációs kinetikáját.

A plazmamembrán koleszterin-tartalmának a membránfluiditásra, valamint a membránon keresztüli iontranszportra gyakorolt hatása régóta ismert. A koleszterin a membrán kettősréteg mindkét felében megtalálható, elsősorban annak dinamikai paramétereit módosítja. Az élettani értéktől eltérő koncentrációban gátolja a receptorfehérjék megfelelő működését; a membrán koleszterin-tartalmának növelése csökkenti, míg a koleszterin kivonása a membránból növeli az ioncsatornák aktivitását. Ez azzal magyarázható, hogy a membrán koleszterin-koncentrációjának növekedésével a membrán viszkozitása növekszik, s ez egyrészt mechanikai úton, másrészt a lipid-fehérje kölcsönhatások módosításával hat a csatornafehérje intramolekuláris mozgásaira.

Az utóbbi időben figyelemre méltó érdeklődésre tettek szert a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA-k), amelyeket mint természetes ágenseket az ártalmas gyulladáscsökkentő válaszok és az autoimmunitás legyőzésére használják. A legnagyobb érdeklődésre az n-3 PUFA-k tartanak számot. Számos tanulmány számol be az n-3 PUFA-k *in vivo* és *in vitro* gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatásáról. Ezek a zsírsavak a szerzett és a természetes immunitás celluláris alkotóelemeit egyaránt befolyásolják. A PUFA-k dóziszfüggően gátolják a jelátvitelt T sejteken, míg telített (SFA) és egyszeresen telítetlen (MUFA) zsírsavak nem

változtatják meg a Ca^{2+} választ. A sejtmembrán PUFA-val történő dúsítása szelektíven módosítja a detergens-rezisztens membrándomének (DRM) citoplazma felőli rétegét. Hasonlóképpen dózisfüggő módon elnyomják a Concanavalin A (Con A)-stimulált limfocita-proliferációt a PUFA-tartalmú triacil-glicerinek patkányban, míg az SFA-kat vagy olajsavat (OA) tartalmazó triacil-glicerinek nem gátolják az említett sejtválaszt.

Az eikozanoidok szintén hatékony modulátorai a limfocita-funkciónak. A sejtmembránban megjelenő eikozanoidok mennyiségét és fajtáját a táplálékkal felvett zsír típusa befolyásolhatja. Feltételezések szerint a zsírsavaknak a sejtproliferációra kifejtett gátló hatása nem más metabolitokká történő átalakulás eredménye, hanem közvetlen hatás.

A membránban található zsírsavak módosítása befolyásolja számos membránbeli enzim és ioncsatorna funkcióját, beleértve a K^+ csatornákat [pl. ATP-szenzitív K^+ (K_{ATP}) csatorna, TREK-1 (2 pórúsú K^+ csatorna), TRAAK (arachidonsav-stimulált K^+ csatorna), Ca^{2+} aktivált K^+ (BK_{Ca}) csatorna, ATP-aktivált K_1 háttércsatorna és foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP_2) aktivált K_{ATP} csatorna] is. A csatornák zsírsavakkal vagy más töltött lipidekkel történő módosítása valószínűleg azoknak közvetlenül magával a csatornafehérjével vagy néhány más csatorna-asszociált komponenssel kialakított kölcsönhatása révén valósul meg.

A táplálékkal felvett zsírsavak bekerülnek a vérkeringésbe, ahol a keringő limfociták fel tudják venni őket. Ha beépülnek a limfocitamembránba, megváltoztathatják a membrán kettős réteg szerkezetét és fluiditását, és – következésképpen – a membránfehérjék, így az ioncsatornák funkcióját. A perifériás limfociták ioncsatornái funkciójának megváltozása magával vonhatja a sejtes immunválasz megváltozását. Mivel a táplálékkal elfogyasztott zsírsavak beépülhetnek a sejtmembránba, az étrendnek fontos szerepe lehet a megfelelő membrán-lipidösszetétel kialakításában.

A sejtek közötti kommunikációt különböző extracelluláris szignálmolekulák (pl. neurotranszmitterek, hormonok, növekedési faktorok) közvetítik. Ezek a molekulák külső kémiai ingerként viselkednek a jelátviteli folyamatok során, és az intracelluláris térben bekövetkező anyagcsere-változások indukálása révén valamilyen sejtválaszt váltanak ki. A hírvivő molekulák általában receptorokhoz specifikusan kötődnek, ily módon azoknak természetes ligandumai. A receptorok hatását sok esetben G fehérjék közvetítik, amelyek a sejtmembrán belső rétegében helyezkednek el, és összeköttetést jelentenek a receptorok és azon enzimek között, amelyek a másodlagos hírvivők szintézisét katalizálják.

A másodlagos hírvivők közé tartozó ciklikus adozin-monofoszfát (cAMP) szintjét meghatározó adenilát-cikláz enzimet a G_s (serkentő) fehérje stimulálja, míg a G_i (inhibitor) gátolja. Az előbbit a koleratoxin permanensen aktiválja, az utóbbit a *pertussis* toxin (PTx) inaktiválja, így

mindkét toxin a cAMP-szint növekedéséhez járul hozzá. Használatukkal megállapítható, hogy egy adott stimulus hatására a G_i vagy a G_s által mediált jelátviteli útvonal aktiválódott-e.

Az adenzin a sejtfunciók endogén modulátora a központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben. Szinte valamennyi sejtől felszabadulhat, megnövekedett oxigénszükséglet/oxigénellátás arány esetén kerül az extracelluláris térbe. Számos élettani hatása régóta ismert. Auto- illetve parakrin szabályozó hatással rendelkezik, neurotranszmitter, szabályozza a szívkoszorúerek perfúziójának mértékét (tágítja a szívkoszorúereket, bradikardizáló hatású), ugyanakkor gátolja a trombocita-aggregációt és a preszinaptikus purinerg (P) receptorok aktiválásával különböző neurotranszmitterek felszabadulását. Az adenzin hatásainak legnagyobb része sejt felszíni receptorokkal való kölcsönhatásnak tulajdonítható, mely receptorok a purinerg receptorok családjába tartoznak.

A purinerg receptorok endogén ligandumai az adenzin, az AMP, az ADP és az ATP. A purinerg receptorokat Burnstock javaslata alapján adenzinra (adenin-nukleozidra) érzékeny P_1 és ATP-re (adenin-nukleotidra) szelektív P_2 típusokra különíthetjük el. Így a P_1 receptorok azonosak az adenzin-receptorokkal. A P_1 receptorok különböző adenzin-analógokkal szemben mutatott eltérő szelektivitásuk alapján, valamint rekombináns adenzin-receptorok aminosav-szekvenciáinak vizsgálatával további A_1 , A_{2a} , A_{2b} és A_3 alosztályokra oszthatók. Valamennyi adenzin-receptor hét α -helikális transzmembrán doménnel rendelkezik, és effektor mechanizmusa G fehérje-kölcsönhatásokon keresztül valósul meg. Az A_1 receptorok által mediált jelátvitel a G_i és G_o proteineken keresztül történik, az A_2 receptorok G_s , az A_3 receptorok G_i protein-csatoltak. Míg az A_1 és A_3 receptorok gátolják, addig az A_2 típusúak fokozzák az adenilát-cikláz aktivitását (vagyis a cAMP képződését). Az A_1 -en keresztül kifejtett hatás blokkolható PTx-nal.

A szöveti adenzin-receptorok tipizálása specifikus adenzin-analógokkal (agonistákkal) vagy szelektív adenzin-receptor-antagonistákkal történhet. Ezek a természetes ligandumok strukturális analógjai, előbbiek a ligandumokhoz hasonló hatásúak, utóbbiak pedig nem idéznek elő biológiai választ, de képesek gátolni a ligandumok és az agonisták hatását. Az adenzin-agonisták valamennyien adenzin-származékok, az antagonisták lehetnek xantin- (pl. koffein-) vagy nem xantin-származékok. Az N^6 -ciklopentil-adenzin (CPA) A_1 agonista, a 2-[p-(2-karbonil-etil)-feniletilamino]-5'-N-etil-karboxamido-adenzin (CGS 21680) szelektív A_{2a} agonista, az 5'-N-etil-karboxamido-adenzin (NECA) nem szelektív, egyaránt rendelkezik A_1 , A_2 és A_3 agonista tulajdonsággal. A 4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol (ZM 241385) nem-xantin típusú A_{2a} szelektív antagonistá, a 8-(3-klórsztiril)-koffein (CSC) xantin típusú A_{2a} szelektív antagonistá, az 1,3-dipropil-8-ciklopentil-xantin (CPX vagy DPCPX) erősen specifikus A_1 receptor-antagonista.

Az adenzin-receptorok az egész szervezetben megtalálhatók. A nagy receptor-specifitással rendelkező agonisták és antagonisták pozitron emittáló atommal jelzett formái jól használhatóak az egyes adenzin-receptor-típusok szervezeten belüli eloszlásának feltérképezésére, a ligandumkötés kinetikai sajátságainak vizsgálatára. Ilyen bizonyítottan alkalmas radioligandum az 5'-N-(2-[¹⁸F]fluor-etil)-karboxamido-adenzin (¹⁸F-NECA), ami a NECA radioaktívan jelölt származéka.

Bár az adenzin-receptorok legismertebb jelátviteli útvonala az adenilát-cikláz aktivitásának gátlása vagy aktivációja, az adenzin sok hatása együtt jár a sejtmembrán vezetőképességének megváltozásával, különösen a K⁺ és/vagy Ca²⁺ csatornák konduktanciájának módosulásával, s így – természetesen – membránpotenciál-változással is. Ismert, hogy a membránpotenciál alapvető szerepet játszik a jelátvitelben, ezért indokolt lehet a membránpotenciál megváltozásának a sejtek adenzin-receptor-aktivációra történő válaszában kifejtett lehetséges szerepének tanulmányozása.

Kimutatták, hogy A₁ és A₂ adenzin-receptorok egyszerre vannak jelen bizonyos simaizom-sejteken. Ilyenek az általunk vizsgált, szíriai aranyhörcsög *vas deferenséből* izolált DDT₁ MF-2 simaizom-sejtek, melyekben meglehetősen érzékeny adenilát-cikláz rendszer is található.

Bizonyos sejtekben összefüggés mutatható ki a purinerg receptorok aktivációja és a sejtmembrán K⁺ vezetőképessége között. *Xenopus laevis* ovulált petesejtjeiben például a P₁ receptor kifelé irányuló K⁺ áramot aktivál. Mivel a cAMP stabil analógjai K⁺ áramot váltanak ki, így feltételezhető, hogy az adenzin-receptorok stimulálják az adenilát-cikláz rendszert, és a K⁺ áramot a cAMP-szint változásai módosítják.

A P₁ receptorok mellett K⁺ csatornák jelenlétét is kimutatták a DDT₁ MF-2 sejteken, így itt is feltehető a P₁ mediált K⁺ csatorna-aktiváció. Ily módon lehetőség nyílt ezen sejtek farmakológiai felhasználására: az A₁ és A_{2a} receptor-mediált mechanizmusok ugyanazon sejtvonalon történő tanulmányozására.

Xenopus oocitákban mesterségesen expresszáltatott, nyúlgyban és -májban kifejeződő *Shaker* K⁺ csatorna (rabK_v1.3) glibenclamid-érzékenységről számoltak be. Így indokolt lehet a DDT₁ MF-2 sejteken mérhető feszültségfüggő K⁺ áram glibenclamid-szenzitivitásának tanulmányozása is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Feltételezésünk szerint – melyet irodalmi adatok is alátámasztanak – a citoplazma-membrán foszfolipidjeinek molekuláris összetétele módosítja a transzmembrán fehérjék (ioncsatornák és transzporterek) működését. A perifériás vérben lévő limfociták ioncsatornai funkcióinak megváltozása magával vonhatja a celluláris immunválasz megváltozását is.

Az előbbieket alapján kísérleteinkben arra a kérdésre kívántunk választ kapni, hogy a limfociták sejtmembránjába beépült különböző lánchosszúságú és telítettségű zsírsavak hogyan és milyen mértékben módosítják a limfociták $K_v1.3$ csatornáinak működését, s ezen keresztül a sejtek válaszkészségét. Megvizsgáltuk a palmitinsav (PA), a sztearinsav (SA), az OA, a linolsav (LA), az arachidonsav (AA) és a dokozaheptaénsav (DHA) $K_v1.3$ csatornák kinetikai és egyensúlyi paramétereire kifejtett hatását.

2. A DDT_1 MF-2 sejtek A_1 és A_2 típusú receptorokat egyaránt expresszálnak, és feszültségfüggő K^+ és Na^+ csatornák is találhatóak a sejtmembránjukban. Mivel a cAMP stabil analógjai K^+ áramot válthatnak ki bizonyos sejteken, feltételezhető, hogy az adenzin-receptorok stimulálják az adenilát-cikláz rendszert, és a K^+ áramot a cAMP-szint változásai módosítják. Ennek alapján feltételezzük egy ilyen P_1 receptor-mediált K^+ csatorna-aktiváció jelenlétét a DDT_1 MF-2 sejteken. Feltételezésünk beigazolódása esetén ezek a sejtek ideális modellrendszert alkothatnának a feszültségfüggő ioncsatornák P_1 receptorok általi szabályozásának egyazon sejtvonalon történő tanulmányozására.

Ezért meg kívántuk vizsgálni, hogy egyes adenzin-agonisták (NECA) és -antagonisták (ZM 241385) a P_1 receptorokkal történő kölcsönhatásuk révén hogyan módosítják a DDT_1 MF-2 sejteken mérhető feszültségfüggő áramokat.

Mivel irodalmi adatok utaltak arra, hogy a K_{ATP} csatorna-blokkoló 1-{4-[2-(5-klór-2-metoxibenzamido)etil]-fenilszulfonil}-3-ciklohexil-karbamid (glibenclamid, Gilemal) befolyásolja bizonyos feszültségfüggő csatornák konduktanciáját, ezért megvizsgáltuk, hogy a glibenclamid befolyásolja-e az általunk tanulmányozott feszültségfüggő áramokat.

Ezen felül össze kívántuk hasonlítani az 5'-N-(2-fluor-etil)-karboxamido-adenozin (F-NECA) és a NECA által a sejtmembrán K^+ konduktanciájára gyakorolt – adenzin A_1 és A_2 receptorok által közvetített – hatást a DDT_1 MF-2 sejteken, hogy ezáltal az említett agonista pozitron-emissziós tomográfiás (PET) diagnosztikában történő alkalmazhatóságáról információkat nyerjünk.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A zsírsavak kötése a foetal bovine serum-hoz (FBS-hez)

A különféle zsírsavakat absz. etanolban oldottuk, majd telített, etanolos, karbonátmentes KOH-oldattal titráltuk fenolftalein indikátor jelenlétében. Az oldószert az oldaton történő N₂-átbuborékolattal, N₂ atmoszféra alatt lepároltuk. A visszamaradt anyaghoz azonnal hozzáadtuk az FBS-t (2 cm³ oldatot 100 μmol zsírsavhoz), és az oldatot 1 h-ig 37 °C-on tartottuk. A képződött komplexet felhasználásig -20 °C-on tároltuk, és frissen adtuk (5 μl) a sejtenyésztő tápoldathoz (5 cm³).

A sejtek kinyerése és tenyésztése

A limfocitákat egészséges önkéntes donorok humán perifériás véréből sűrűséggradiens centrifugálással, Histopaque-1077 szeparáló oldat (sűrűség: 1,077 g/cm³) felhasználásával nyertük. A vér hígítására és a mononukleáris sejtek mosására 25 mM Hepes tartalmazó *Hank's balanced salt solution*-t (HBSS) (pH=7,4) használtunk. A limfocitákat (2·10⁶ sejt/cm³) különböző telített, valamint telítetlen – FBS-hez kötött – zsírsavakat tartalmazó (50 μM) és kontroll tápoldatokban 3 napig 37 °C-on, 5 % CO₂-tartalmú, nedvesített levegőjű inkubátorban, petri csészékben (d=3 cm) tenyésztettük. Tápoldatként 15 mM szabad sav Hepes, 10 % (V/V) FBS-t, 2 mM L-glutamint, valamint 50 mg/dm³ gentamycint tartalmazó RPMI-1640-et használtunk. A proliferáció elősegítésére 20 μg/cm³ phytohemagglutinin A-t (PHA) és 100 CU/cm³ IL-2-t adtunk a tenyésztő oldathoz. A gázkromatográfiás mérésekhez 4 donor limfocitáit használtuk fel. Minden egyes donor mintáit 7 részre osztottuk, melyekből 6-ot a zsírsavakkal kezeltünk, 1-et pedig kontrollként használtunk. A *patch-clamp* mérésekhez 23 donor limfocitáit használtuk. Minden mintát két részre osztottunk, az egyiket egy adott zsírsavval kezeltünk, a másikat pedig kontrollként használtuk.

A szíriai aranyhörcsög *vas deferens* simaizomzatában szteroid-indukált *leiomyosarcoma* tumorból nyert DDT₁ MF-2 simaizom-sejtvonalat a European Collection of Animal Cell Cultures-től (Porton Down, Salisbury, UK) szereztük be. A sejteket 37 °C-on, 5 %-os CO₂-koncentrációjú, nedvesített levegőjű inkubátorban tenyésztettük 25 cm²-es flaskában DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tápoldatban, amely 2 mM L-glutamint és 10 % (V/V) FBS-t tartalmazott. A sejteket egy héten kétszer passzáltuk, melynek során eltávolítottuk a használt tápoldatot a sejtekről, majd 5 cm³ friss médium hozzáadása után sejtkaparóval felszedtük azokat. Az így kapott szuszpenzió 0,3–0,5 cm³-ét vittük tovább 8 cm³ friss médiumot tartalmazó flaskába.

A kísérletek előtt a sejteket kétszer PBS-ben mostuk (250g, 4 °C, 8 perc), majd a *patch-clamp* mérésekhez kb. 1 cm³ külső oldatban (1. Az *ionáramok mérése*) felszuszpendáltuk. A szuszpenziót

felhasználásig jégen tartottuk. A mérésekhez a sejteket (20–40 μ l szuszpenzió) 1,5 cm³ külső oldatot tartalmazó petri csészébe (d=3 cm) tettük. A gázkromatográfiás vizsgálatokhoz szárazon hagytuk a limfocitákat, és a mintákból a sejtmembránt preparáltuk.

A zsírsavösszetétel vizsgálata

Az egyes limfocita-tenyészetekből a lipideket kloroform–metanol (2:1 V/V) eleggyel kiextraháltuk Folch és mts. módszere szerint. Az összes foszfolipidból a zsírsav-metilésztereket 5 % HCl-tartalmú absz. metanolban 80 °C-on, 2,5 h-ig tartó transzészterifikálással nyertük. A zsírsav-metilésztereket FFAP oszlopon (30 m hosszú, 0,25 mm átmérőjű kapilláris kolonna; Supelco, Bellefonte, PA), Hewlett-Packard 6890 típusú gázkromatográfban választottuk szét. A méréseket kétszer végeztük el, és a két mérés átlagát számítottuk. A csúcsokat a Sigma-tól származó hitelesített standardok segítségével azonosítottuk.

A közölt adatok N=3 számú független kísérlet eredményeinek átlagai \pm SEM (a középérték közepes hibája).

Az ionáramok mérése

Az ionáramok meghatározását *patch-clamp* technikával teljes-sejt konfigurációban, feszültség-zár üzemmódban, szobahőmérsékleten végeztük, AXON Instruments TL-1-125 és Digidata 1200 komputer interfészekhez csatlakoztatott Axopatch-200 erősítő használatával. A szűrési frekvenciát a mintavételezési frekvencia felére vagy annál kisebbre állítottuk Warner Instruments LPF-8 berendezés segítségével. Az adatgyűjtéshez a Clampex 8.2 (Axon Instruments, Foster City, Cal., USA) programot használtuk.

A külső oldat NaCl-ot tartalmazott, pH=7,35. A kapillárisból készült pipettákat KF-ot tartalmazó belső oldattal töltöttük meg, pH=7,23. Az adenzin-analóg ligandumok törzsoldatait a külső oldatban hígítottuk ki, majd gravitációs perfúzióval juttattuk el a sejtekhez.

A K⁺ áramok mérése:

A depolarizáló impulzusok között a feszültséget -120 mV-on tartottuk, az aktivációs kinetika jellemzéséhez a limfocitákon 15 ms-ig, a DDT₁ MF-2 sejteken 150 ms-ig, az inaktivációs kinetika jellemzéséhez a limfocitákon 1 s-ig, a DDT₁ MF-2 sejteken 2 s-ig +50 mV-ra depolarizáltuk a sejtmembránt. A depolarizáló impulzusokat 30 (aktiváció), illetve 60 s-onként (inaktiváció) alkalmaztuk az áram kumulatív inaktivációjának elkerülésére. *Online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének meghatározásához limfocitákon -120 mV tartófeszültségről depolarizáltunk -70 és +50 mV közötti feszültségértékekre 10 mV lépésközökkel, 1 s hosszúságú impulzusokkal. DDT₁ MF-2 sejtek esetében a tartófeszültséget -120 mV-ra állítottuk, -80 és +60 mV között 20 mV-os lépcsőközökkel 2 s-ig depolarizáltunk. Utólagos

szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésének meghatározásához (limfocitákon) 15 ms hosszú impulzusokkal +50 mV-ra depolarizáltunk, ezen impulzusok között a tartófeszültséget változtattuk -100 mV és -20 mV között 10 mV-os lépésközökkel, az egyes depolarizáló impulzusok között 2,5 percet vártunk az adott tartófeszültségen az egyensúlyi inaktiváció kialakulásának eléréséhez. Utólagos szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk.

A Na^+ áramok mérése:

Az áramgörbék felvételéhez -120 mV tartófeszültségről -80 és +90 mV között 10 mV-os lépcsőközökkel 7 ms-ig depolarizáltunk a DDT₁ MF-2 sejteken. *Online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk.

Az adatok kiértékelése

A kiértékelésekhez Clampfit 8.2 (Axon Instruments, Foster City, Cal., USA), Microsoft Excel, illetve SigmaPlot 8.0 szoftvereket használtunk.

Azokban az esetekben, amelyekben nem *online* szivárgóáram-kivonást alkalmaztunk, a mérések során nyert áramgörbét a kiértékelés kezdetén szoftveresen korrigáltuk ohmikus szivárgási áramra. A görbét digitálisan szűrőztük hárompontos *boxcar* módszerrel.

Az aktivációs és az inaktivációs időállandó (τ_a és τ_i) meghatározásához – a Hodgkin–Huxley modellnek megfelelően – a Levenberg–Marquardt algoritmus alkalmazásával illesztettünk a kapott áramgörbékre.

A limfocitákon található $K_v1.3$ csatornák egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggését jellemző paraméterek (a feszültségfüggés középpontja, $V_{1/2,a}$ és meredeksége, s_a) meghatározásához minden egyes membránpotenciálon kiszámítottuk a membrán csúcs K^+ konduktanciáját (G_K), az aktuális G_K értékeket a legnagyobb G_K értékére normáltuk, és a normált vezetőképesség – feszültség függvényt a Boltzmann-egyenlettel illesztettük. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését ($V_{1/2,i}$ és s_i) szintén a Boltzmann-függvénnyel jellemeztük.

A DDT₁ MF-2 sejtek esetében a dózis–hatás görbét a Hill-egyenlettel illesztettük.

Statisztikai analízis

Az aktivációs és az inaktivációs időállandót minden sejtre legalább 3 depolarizációs impulzusból nyert érték átlagolásával határoztuk meg.

A HPL-k esetében az adatok nagymértékű donorfüggő változása (lásd alább) és az időállandók nem-normál eloszlása a mediánok használatát tette indokolttá az átlagok helyett.

Minden egyes limfocita-preparátumot (donoronként) kontroll (kezeletlen) és zsírsavval kezelt csoportra osztottunk. A különböző donoroktól származó, az adott zsírsavkezeléshez tartozó kontroll

sejteken kapott τ_a , τ_i , $V_{1/2,a}$, s_a , $V_{1/2,i}$ és s_i értékeket Kruskal–Wallis *one way* variancia-analízis (ANOVA) *on ranks* eljárás használatával összehasonlítottuk. Az analízis azt mutatta, hogy szignifikáns különbség van a különböző donorok kontroll sejtjei között, és néhány esetben az ugyanazzal a zsírsavval kezelt, különböző donoroktól származó sejteken mért paraméterekben is statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk. Ezért a következő sejtenkénti normalizációs eljárást alkalmaztuk. Egy adott sejtnél egy adott zsírsavval történt kezelésre adott válaszát jellemző mért paramétert az ugyanannak a paraméternek az azonos donortól származó kontroll sejteken kapott átlagára normáltuk, majd a kapott normált értékeket egyesítettük minden kezelésnél, átlagot és SEM-et számoltunk, és Student-féle t-próbát végeztünk $\mu=1$ nullhipotézis ellenében, $P<0,05$ szignifikanciaszint mellett.

A statisztikai összehasonlításokat SigmaStat 3.11 programmal végeztük. Mind a kontrollal szemben történő, mind a páronkénti összehasonlításoknál Dunn-módszert alkalmaztunk.

A DDT₁ MF-2 sejteken végzett kísérletek önkontrollosak voltak.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. A citoplazma-membrán foszfolipid-összetételének hatása a $K_v1.3$ csatornák funkciójára humán limfocitákban

A zsírsavak beépülésének ellenőrzése

A zsírsavak limfocita-membránba történő beépülésének követésére gázkromatográfiás vizsgálatokat végeztünk. A kezelések hatására minden esetben statisztikailag szignifikáns növekedést tapasztaltunk a vizsgált zsírsavnak a limfocitamembránban található összes zsírsav mennyiségére vonatkoztatott relatív mennyiségében (t-próba, $P < 0,05$).

A PA relatív mennyisége a kontroll mintában mért $29,00 \pm 1,51$ %-ról ($N=3$, ahol N a donorok száma) $35,66 \pm 0,65$ %-ra növekedett a kezelt sejtekben ($N=3$). A SA relatív mennyisége a membránban $32,01 \pm 2,71$ %-ról $40,56 \pm 1,26$ %-ra ($N=3$), az OA mennyisége $6,10 \pm 3,12$ %-ról $20,15 \pm 5,42$ %-ra ($N=3$), a LA-é $4,32 \pm 2,19$ %-ról $17,75 \pm 2,87$ %-ra ($N=3$), az AA relatív mennyisége $10,63 \pm 1,49$ %-ról $14,54 \pm 2,49$ %-ra ($N=3$), míg a DHA mennyisége $2,50 \pm 1,29$ %-ról $16,89 \pm 0,65$ %-ra ($N=3$) emelkedett.

A PUFA-k módosítják a $K_v1.3$ csatornák aktivációs és inaktivációs kinetikáját

Azért, hogy összehasonlíthassuk a különböző kezelések hatásait, elvégeztük a mért időállandók részletes statisztikai analízisét (l. a *Statisztikai analízis* c. részt). A páronkénti összehasonlítás (Kruskal–Wallis *one way ANOVA on ranks*, $P < 0,05$) számos esetben szignifikáns különbséget mutatott a különböző donorok kontroll limfocitáin végrehajtott mérések esetében mind az aktivációs időállandóban (τ_a), mind az inaktivációs időállandóban (τ_i), továbbá az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének középpontjában ($V_{1/2,a}$). Más egyensúlyi paraméterek nem mutattak donorfüggést.. Az időállandók értékeinek donorfüggő tulajdonsága miatt a különböző donoroktól származó limfocitákon mért adatokat nem osztottuk kontroll és kezelt csoportokra, hanem a kezelt sejteken mért értékeket normáltuk az ugyanazon donortól származó kontroll értékekre (l. *Statisztikai analízis*).

A humán perifériás limfociták $K_v1.3$ csatornáinak aktivációs időállandóját a membrán SA-val történő dúsítása nem változtatta meg. Az aktivációs időállandó a kontroll érték $1,05 \pm 0,04$ -szeresének adódott. Az ugyancsak telített PA és az egyszeresen telítetlen OA esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változást az aktivációs időállandóban. Az arányok (rende): $1,07 \pm 0,09$ és $0,97 \pm 0,03$. Ugyanakkor a PUFA-k, mint pl. a LA hatására gyorsult az áram aktivációs kinetikája, amit számszerűleg az aktivációs időállandó csökkenése fejez ki, a kontrollhoz viszonyított arány itt

0,91±0,02-nek adódott. AA és DHA szintén gyorsította a csatornák aktivációját 0,64±0,07 és 0,73±0,11 arányok mellett.

A limfociták $K_V1.3$ csatornáinak inaktivációs időállandója az aktivációs időállandóhoz hasonlóan változott. LA, AA és DHA szignifikánsan csökkentette, míg PA, SA és OA hatására nem változott a limfociták inaktivációs időállandója. Az inaktivációs időállandók arányai rendre: 0,67±0,08; 0,51±0,05; 0,54±0,09; 0,92±0,06; 0,97±0,03 és 1,13±0,13.

Zsírsvavas kezelés nem változtatja meg a $K_V1.3$ csatornák aktivációjának és inaktivációjának egyensúlyi paramétereit

A normált teljessejt-vezetőképesség (G_n) feszültségfüggése (egyensúlyi aktiváció) az ioncsatornák zárt és nyitott állapot közötti egyensúlyi megoszlását jellemzi adott membránpotenciálon. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése leírja a nem inaktiválódott csatornák arányát adott membránpotenciálon.

Egyetlen tanulmányozott zsírsvav sem változtatta meg a $K_V1.3$ csatornák egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggését. Ezt a statisztikai analízis megerősítette. A *Statisztikai analízis c.* bekezdésben részletezett megfontolások miatt a tesztek a Boltzmann-függvények normált paramétereire végeztük el. A kezelt/kontroll arányok az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének középpontja ($V_{1/2,a}$) esetében: SA: 1,02±0,08; OA: 1,06±0,16; LA: 1,07±0,18; AA: 1,13±0,04; DHA: 0,97±0,04. A meredekségek (s_a) arányai: SA: 1,03±0,05; OA: 1,04±0,05; LA: 0,99±0,16; AA: 1,05±0,10; DHA: 0,98±0,09.

Zsírsvavakkal végzett kísérleteink során nem tapasztaltunk szignifikáns változást a $K_V1.3$ csatornák egyensúlyi inaktivációjának feszültségfüggésében sem. A legjobban illeszkedő Boltzmann-függvénnyel kapott paraméterek a következők. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése középpontjának ($V_{1/2,i}$) kezelt/kontroll arányai: SA: 1,08±0,05; OA: 0,95±0,07; LA: 0,98±0,01; AA: 1,06±0,01; DHA: 1,07±0,12; a meredekségek (s_i) arányai: SA: 0,96±0,09; OA: 1,05±0,12; LA: 1,09±0,08; AA: 1,05±0,04; DHA: 0,91±0,07; rendre. A statisztikai analízist a $V_{1/2,i}$ és az s_i normált értékeire végeztük el (l. fentebb).

A zsírsvavak $K_V1.3$ csatornák aktivitására kifejtett hatásának tanulmányozására az alábbi irodalmi adatok készítették bennünket: 1. a $K_V1.3$ csatornák aktivitása alapvetően meghatározza a limfocita-aktivációs folyamatokat; 2. a limfocitamembrán lipidösszetételében bekövetkező változások drámaian befolyásolnak bizonyos immunreakciókat; 3. a membránban lévő lipidkörnyezet módosítja általában a membránfehérjék, és különösképpen az ioncsatornák funkcióját.

A T sejtek antigén-aktivációjának membránpotenciál-függése jól ismert. Tekintettel arra, hogy a $K_v1.3$ csatornák nagyon szűk membránpotenciál-tartományban működnek egyensúlyban (azaz az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggésének metszetében), ezeknek a paramétereknek a feszültségfüggésében bekövetkező bármilyen kis változás nagymértékben befolyásolhatja a K^+ áram alkalmasságát a T sejtek membránpotenciáljának irányítására. A $K_v1.3$ kapuzás kinetikájában bekövetkező változások, különösen azok, amelyek a vezető (nyitott) állapotban eltöltött időt befolyásolják, nagyon hatékonyan megváltoztathatják a K^+ konduktancia hozzájárulását a teljes membrán-konduktanciához, és így módosíthatják a T sejtek membránpotenciálját. Például az ebben az értekezésben leírt PUFA kezelést követő, az inaktivációs kinetikában bekövetkező kb. kétszeres gyorsulás nagyon hatékonyan lecsökkenti a nyitott állapot élettartamát. A megnövekedett inaktivációs sebesség hatását az áram PUFA kezelést követő gyorsabb nyitási kinetikája alig kompenzálja, mivel az inaktivációs kinetika kb. 2 nagyságrenddel lassabb, mint az aktivációs kinetika, ezért az $I(t)$ görbe alatti terület (pl. az átvitt töltés mennyisége) érzékenyebb az inaktivációs kinetikában bekövetkező változásokra, mint az aktivációs kinetikában bekövetkezőkre. Így az aktivációs és az inaktivációs kinetikák összesített hatása egy csökkent K^+ áram, ami megmagyarázhatja a PUFA-k immun- és autoimmun folyamatok szuppressziójában kifejtett jótékony hatását.

Számos tanulmány rámutat arra, hogy az n-3 PUFA-kban gazdag étrend gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Úgy vélik, a zsírsavak gátló hatása nem egyéb metabolitokká történő átalakulás eredménye, hanem közvetlen hatás. A PUFA-khoz hasonlóan a PUFA-tartalmú triacil-glicerinek is koncentráció- és dózisfüggő módon gátolják a Con A által stimulált limfocita-proliferációt patkányban, míg az SFA-t vagy az OA-at tartalmazó triacil-glicerinek nem gátolják az említett sejtválaszt.

A PUFA-k hatásának molekuláris mechanizmusát illetően Stulnig és mts. (1998) arról számoltak be, hogy Jurkat T sejt-lipidek PUFA-kkal történő dúsítása nagyon korai jelátviteli eseményt gátol. Úgy gondolják, hogy a T sejt-aktiváció PUFA-indukált gátlása az Src kinázcsaládba tartozó Lck-nak a DRM-ek citoplazma felőli rétegéből történő kiszorításának a következménye. A mi munkánk azt mutatja, hogy az Lck kiszorítása mellett a $K_v1.3$ aktivitásának szuppressziója egy kiegészítő mechanizmus lehet az immunreakciók gátlásában.

A feszültségfüggő ioncsatornák nyitása és az azt követő lassú inaktivációs lépés a csatornafehérje feszültség-szenzor doménjében és pórusdoménjében végbemenő konformációs változások sorozatát foglalja magában. Minthogy a K^+ csatornák a sejtmembránba ágyazódnak, funkciójukat befolyásolhatják a lipid-fehérje kölcsönhatások. Ezt alátámasztja a humán $K_v1.2$ csatorna napjainkban elvégzett röntgen-krisztallográfiai szerkezetvizsgálata, ami a csatorna különböző lehetségesen lipidek felőli felületeit mutatta meg (a $K_v1.2$ közeli rokonságban áll a

K_v1.3-mal). A funkcionális csatorna négy alegysége mindegyikének a pórushélice és a szelektivitási filtere mentén található S5 és S6 transzmembrán hélixek együtt alkotják az egyetlen pórusdomént, míg minden egyes alegység S1–S4 hélicei alkotják a csatorna feszültség-szenzor doménjeit (csatornánként négyet). A röntgenszerkezet alapján a bizonyítékok következő sora rámutat a fehérje–lipid kölcsönhatások fontosságára: 1. a kristályosodási folyamat során detergens/lipid elegy jelenlétére volt szükség; 2. a feszültség-szenzor domén nem illeszkedik szorosan a pórusdoménhez; hanem a pórus hidrofób felületeit és a feszültség-szenzorokat elválasztó teret lipidek tölthetik ki natív membránokban; 3. a feszültség-érzékelésben kulcsszerepet játszó oldalláncok (az S4 extracelluláris végétől számított Arg-1 és -2) az S4 hélix lipidborítású felszínén helyezkednek el.

A membrán lipidösszetételének számos hatását a membrán-mikroviszkozitás (fluiditás) megváltozásának, a membrángörbület és a laterális nyomásprofil membránban bekövetkező változásának és az ioncsatornák lipid raftokba történő beépülésének vagy onnan való kirekesztésének tulajdonítják.

Azt az elképzelést, miszerint a PUFA-knak a K_v1.3 csatornákra kifejtett hatása inkább a csatorna fizikai-kémiai környezetének változásaival van összefüggésben, semmint a csatornák kapuzási szerkezetével történő specifikus kölcsönhatással, a következő okok miatt megerősítjük. 1. Minőségileg hasonló változásokat fedeztek fel a K_v1.3 aktivációs és inaktivációs kinetikájában a különböző lánchosszúságú, telítettségi fokú és kettőskötés-helyzetű PUFA-kkal. 2. A PUFA-k közös jellemzője, hogy acil-láncuk a telítetlenség mértékének növekedésével egyre hajlítottabb, és ezért változtatják meg a membrán mechanikai tulajdonságait, pl. fluiditás-növekedést (mikroviszkozitás-csökkenést) okozva.

Anel és mts. kimutatták, hogy a *cisz*-telítetlen zsírsavak megváltoztatják a lipid-acilláncok sorrendjét és gátolják a citotoxikus T limfociták (CTL-ek) sejtfunkcióját, de a *transz*-telítetlenek és a telítettek nem. Mi a kísérleteinkben csak *all-cisz*-telítetlen zsírsavakat használtunk, és mindegyiket hatékonyan találtuk a K_v1.3 csatornák kinetikájának módosítására, kivéve az egyszerűen telítetlen OA-at.

Egy lehetséges alternatíva, hogy a limfociták PUFA-kkal történő kezelése a K_v1.3 csatornák protein-kinázok és -foszfatázok általi poszt-szintetikus módosításával járhat, és ennek a módosulásnak a platformja a T-sejtek lipid raftja lehet. Korábban már leírták, hogy a K_v1.3 csatornák lipid raftokban helyezkednek el a T sejt-membránban, és hogy az n-3 PUFA EPA szelektíven beépül a T sejt-raftokba és megváltoztatja az összetételüket. Ez utóbbi tükröződik az acilált jelátviteli fehérjéknek a lipid raftok citoplazma felőli rétegéből történő kiszorításában, mint pl. az Src családbeli Lck kináz esetében. Minthogy a K_v1.3 aktivitását és kapuzását nagymértékben szabályozza a tirozinon és a szerin/treonin oldalláncokon történő foszforiláció, a limfociták

jelátviteli komplexének PUFA-kkal történő felbomlasztása szintén egy elképzelhető lehetőség az eredményeink magyarázatára.

Beszámoltunk arról, hogy az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggése érzéketlen a PUFA-k, a MUFA vagy az SFA-k membránban történő akkumulációjára. Ez azt jelenti, hogy a csatornák egyensúlyi megoszlása a zárt és a nyitott, illetve a nem-inaktivált és az inaktivált állapotok között adott membránpotenciálon ugyanaz, tekintet nélkül a zsírsavkezelésre (pl. a $\Delta\Delta G$ a megfelelő állapotok között változatlan). Ezzel szemben a nyitott és az inaktivált állapotokba vezető kinetikákat gyorsítják a PUFA-k, ami a zárt és a nyitott, illetve a nyitott és az inaktivált állapotokat elválasztó energiakorlát (ΔG) nagyságának a csökkenésében nyilvánul meg (Panyi és mts., 1995.). Így a csatornapuzás energetikáját a PUFA-k specifikusan befolyásolják, amit az átmenetek sebességei tükröznek, de az állapotok közti egyensúlyi megoszlás nem. Ez összeegyeztethető a membrán mikroviszkozitásának a csökkenésével PUFA-kezelés során.

4.2. Adenozin-analógok dóziszfüggően módosítják a DDT₁ MF-2 simaizom-sejtek K⁺ csatornáinak működését

A DDT₁ MF-2 sejteken található ionáramok azonosítása

A DDT₁ MF-2 sejteken kétfajta feszültségfüggő áram mérhető: kifelé irányuló K⁺ áram és befelé folyó Na⁺ áram. Mivel a Na⁺ áram hamarabb aktiválódik, és inaktiválódik is, mint ahogy a K⁺ áram aktiválódik, ezért a kétfajta áramkomponens külön-külön, egymástól függetlenül mérhető.

Annak igazolására, hogy valóban K⁺ áramokat mérünk, először jól ismert K⁺ csatorna-blokkolókat adtunk a sejtekhez. 4-AP (5 mM) és TEA⁺ (10 mM) reverzibilisen blokkolták a kifelé folyó teljessejt-áramot, a gátlószerek jelenlétében és a kontroll körülmények között mért áramamplitúdók hányadosa (I/I_0 , megmaradó áramhányad, MÁH) rendre $0,52\pm 0,10$ (N=5), illetve $0,29\pm 0,11$ (N=3) volt. A csatornák peptid típusú gátlószerek (ChTx, MgTx) alkalmazásával végzett farmakológiai analízisét Rubovszky Bálint Ph.D. értekezésében már bemutatta. A kapott jellemzők a K_v1.3 csatornák tulajdonságainak felelnek meg.

Adenozin-agonisták és -antagonisták módosítják a DDT₁ MF-2 sejteken mérhető K⁺ áramokat

Az A₁ és A₂ adenozinreceptor-agonista hatással egyaránt rendelkező NECA 1 nM – 60 μM koncentráció-tartományban irreverzibilisen és a koncentrációtól függő módon csökkentette a K⁺ áramot a DDT₁ MF-2 sejteken. A félhatásos dózis (EC₅₀) 165,13 μM-nek, a Hill-koefficiens (n_H) 0,38-nak adódott. A gátlás erősségének koncentráció-függésében maximumot tapasztaltunk; a NECA a legnagyobb gátló hatást kísérleteinkben 5 μM koncentrációnál érte el, itt a MÁH

0,65±0,02-nak adódott (N=3). Mivel a NECA mind az A₁, mind az A₂ receptoroknak agonistája, alkalmazása során összetett, kétfázisú folyamat játszódhat le. Kisebb koncentrációk esetében a K⁺ áram gátlása tapasztalható (A_{2a} hatás), míg nagyobb koncentrációk esetében az áram gátlását felülmúlhatja az áram növelése (A₁ hatás). Méréseink szerint a NECA megváltoztatja az áram kinetikáját is: gyorsabb aktivációt eredményez; pl. 5 μM koncentráció esetében az aktivációs időállandók hányadosa (τ/τ_0) 0,70±0,10 volt (N=5).

Megvizsgáltuk a NECA és a TEA⁺ együttes hatását oly módon, hogy előbb NECA-val (0,5 μM), majd TEA⁺-val (10 mM) blokkoltuk az áramot ugyanazon a sejten (N=2). Várakozásunknak megfelelően a két molekula gátló hatása nem volt kompetitív, mivel a két anyag nem ugyanarra a helyre kötődik: a TEA közvetlenül a K⁺ csatornára fejt ki hatását, míg a NECA adozinreceptoron keresztül hat. A NECA-val blokkolt áramot a TEA⁺ tovább csökkentette, a MÁH ebben az esetben 0,27±0,05-nak adódott (ez jó egyezésben van azzal, amikor a TEA⁺-t önmagában használtuk, ahol a MÁH 0,29±0,11 volt).

A NECA analógja, a ¹⁸F-NECA β⁺ bomló izotópként viselkedik, az élő szervezetbe bevihető, így pozitron-emissziós tomográfiás (PET) képalkotás segítségével diagnosztikai célokra (az egyes adozinreceptor-típusok szervezeten belüli eloszlásának feltérképezésére, kinetikai sajátásaik vizsgálatára) felhasználható. Hogy elkerüljük a β⁺ sugárzó anyaggal történő érintkezést, *patch-clamp*-es kísérleteinkben ezen anyagnak a nem radioaktív izotópját, a ¹⁹F-NECA-t használtuk.

A ¹⁹F-NECA 1 μM koncentrációban nem fejtett ki hatást a K⁺ áramok amplitúdójára (MÁH: 1,00±0,01; N=2), sem aktivációs időállandójára (τ/τ_0 : 0,98±0,04). 5 μM koncentráció esetében azonban már tapasztaltunk gátló hatást, a MÁH értéke ebben az esetben 0,85±0,03 volt (N=3). Az aktivációs időállandóra az F-NECA ebben a koncentrációban sem volt hatással: az aktivációs időállandók hányadosa 0,99±0,05 volt (N=4).

Az A_{2a} adozinreceptor-antagonista ZM 241385 1 μM koncentrációban az áram csökkenését idézte elő, MÁH: 0,81±0,07(N=4), mely hatás irreverzibilis volt, a sejtek normál külső oldattal történő mosása nem függesztette fel a ZM 241385 hatását. A ZM 241385 ebben a koncentrációban a K⁺ áram aktivációs időállandójára nem volt hatással (τ/τ_0 : 0,95±0,09; N=4).

A K_{ATP} csatorna-blokkoló glibenclamid 1–20 μM koncentráció-tartományban irreverzibilisen és koncentrációfüggő módon csökkentette a K⁺ áramot, 3 μM-nél a MÁH 0,77±0,05 volt (N=3). A félhatásos dózis (EC₅₀) 15,00 μM-nek, a Hill-koefficiens (n_H) 1-nek adódott. A glibenclamid az áram kinetikai paramétereire nem volt hatással: a kezelt/kontroll arány az aktivációs időállandó esetében 1,08±0,18-nak adódott 3 μM koncentrációnál.

Adenozinreceptor-aktiváció vagy –inaktiváció nem befolyásolja a Na⁺ áramokat a DDT₁ MF-2 sejteken

A gyors befelé folyó áramot feszültségfüggő Na⁺ áramként azonosítottuk a következő kritériumok alapján: 1. 100 nM *tetrodotoxin* (TTx) reverzibilisen blokkolta az áramot, 2. a csatorna az ingerelhető sejtek feszültségfüggő gyors Na⁺ csatornájára jellemző kinetikai paraméterekkel és feszültség–áram karakterisztikával rendelkezett, 3. Na⁺ mentes extracelluláris környezetben az áram nem volt mérhető.

A vizsgált P₁ agonisták és antagonisták a Na⁺ csatornák csúcsáramát nem befolyásolták. A mért MÁH-ok: 1 μM NECA esetén: 0,97±0,04 (N=3), 1 μM ZM 241385 esetén: 1,02±0,11 (N=4), 1 μM glibenclamid esetén pedig: 0,99±0,03 (N=3).

Jelen tanulmányban bemutatott eredményeink összhangban vannak korábbi tapasztalatainkkal, melyeket Rubovszky Bálint értekezésében már bemutatott. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a K⁺ áram tulajdonságaiban bekövetkezett változások során a receptorok a csatornákra G protein-független módon fejtik ki hatásukat.

Tudomásunk szerint ez az első tanulmány, amelyben sikerült kimutatni a DDT₁ MF-2 sejteken levő K⁺ áram szelektív P₁ adenozinreceptor-agonistákkal és –antagonistákkal történő módosítását. Bár Mollemannak és mts-nak (1989) nem sikerült kimutatniuk nagy dózisu adenozinnak (1 mM) semmiféle hatását a membránáramra vagy az ATP-indukált áramokra ezen a sejtvonalon, eredményeik nem mondanak egyenesen ellent a mi tapasztalatainknak. Minthogy az adenozin nem specifikus ligandum, kötődhet P₂ receptorokhoz is, ezen kívül mind az A₁, mind az A₂ receptorokhoz történő gyenge kötődése további különböző receptor-aktivációs folyamatokat indíthat be, ami végül azt eredményezheti, hogy a K⁺ áramra gyakorolt hatás nem lesz szignifikáns. Jelen tanulmányban altípus-specifikus agonisták és antagonisták hatásait vizsgáltuk, így az egyes hatások elkülönülve jelenhettek meg.

A K⁺ csatornáknak a különböző altípus-specifikus adenozin-analógokra adott válasza szövetről szövetre változik. Felfedezéseink szerint a DDT₁ MF-2 sejtek egyedülállóak abban, hogy az A₁ receptor-aktivációra megnövekedett K⁺ konduktanciával és hiperpolarizációval, az A₂ receptor-aktivációra pedig csökkent K⁺ konduktanciával és depolarizációval képesek válaszolni. Ezért ezek a sejtek jól használhatók lehetnek a farmakológiában, az A₁ és A_{2a} receptor-mediált mechanizmusok ugyanazon a sejtvonalon történő vizsgálatában.

Kimutatták, hogy szoros kapcsolat van a membránpotenciál és az adenilát-cikláz aktivitása között, mely jelenség Ca²⁺ független. Ez a felfedezés összhangban van a mi megfigyeléseinkkel és az adenilát-cikláznak az irodalomban bemutatott, A_{2a} agonisták receptorhoz történő kötődése általi stimulációjával. Adataink alátámasztják azt a feltételezést, hogy az A₁ adenozin-receptorokhoz

történő agonista-kötődés által kiváltott adenilátcikláz-inhibíciót az indukált membránpotenciál-növekedés közvetítheti. Az adenilát-cikláz feszültségfüggése alapján feltételezzük, hogy az adenilát-cikláznak az A_1 és A_2 receptorok befolyásolása által közvetített stimulációja vagy inhibíciója olyan mechanizmussal valósulhat meg, amely ligandumindukált transzmembránpotenciál-változást tartalmaz az első elemi lépések között, mivel a membránpolaritásban bekövetkező változások az enzim feszültségfüggő konformáció-változásához vezethetnek.

A két adenzin-analóg, a NECA és fluorral jelölt származéka, az F-NECA eltérő hatást fejt ki a DDT₁ MF-2 simaizom-sejtek K^+ konduktanciájára. Ez a kémiai szerkezetük különbözőségének a következménye lehet, ami az A_1 és A_2 adenzin-receptorokhoz való affinitásuk eltérő mivoltához vezethet. Minthogy mind A_1 , mind A_2 receptorok jelenlétét kimutatták a DDT₁ MF-2 sejteken, és a NECA mindkét receptornak agonistája, a NECA vagy az F-NECA kötődésével kiváltott funkcionális válasz az A_1 és az A_2 altípusokon keresztül mediált hatások összege. Eredményeink azt sugallják, hogy a cAMP-függő jelátviteli útvonalaknak a receptorhoz történő kötődés általi stimulációja különbözik a NECA és az F-NECA esetében. Bár az F-NECA által az elektrofiziológiai tulajdonságokban okozott változás kevésbé kiemelkedő, mindkét vegyület csökkenti a K^+ áramot. Ezért az F-NECA elektrofiziológiai szempontból kevésbé hatékony analógnak használható. Mivel az F-NECA másként viselkedik a vizsgált elektrofiziológiás folyamatban, mint a NECA, ezért a PET eredmények értékelésénél körültekintően kell eljárni.

Yao és mts. (1996) a nyúlgyanban és -májban kifejeződő feszültségkapuzott K^+ csatornát (rabK_V1.3) *Xenopus* oocitákba klónozták. Az így kifejeződött csatornát, eltérően a korábban leírt *Shaker* csatornáktól, glibenclamid-érzékenynek találták (a glibenclamid a K_{ATP} csatornák jól ismert inhibitora.) A *Xenopus* oocitákban mesterségesen expresszálatott rabK_V1.3 csatorna glibenclamid-érzékenysége ugyanolyan nagyságrendűnek bizonyult, mint a nyúl vaszkuláris simaizomban található glibenclamid-érzékeny K_V natív csatornáé. A rabK_V1.3 és a DDT₁ MF-2 simaizomsejteken található K^+ csatornákon kívüli egyéb K_V csatornák glibenclamid-szenzitívítására nem találtunk utalást az irodalomban.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során sejtmembránbeli feszültség-aktivált kationcsatornák tulajdonságait vizsgáltuk.

1. Különböző zsírsavaknak a $K_v1.3$ csatornák kinetikájára kifejtett hatását tanulmányoztuk PHA- és IL-2 stimulált humán perifériás limfocitákon. Eredményeink szerint a kifejtett hatás összefüggésben van az adott zsírsav telítettségének mértékével és/vagy lánchosszával. Minden vizsgált PUFA befolyásolta a limfociták $K_v1.3$ csatornáinak aktivációs és inaktivációs kinetikáját – gyorsítva a kérdéses időállandókat –, ellentétben a vizsgált MUFA-val és SFA-kkal. Ugyanakkor a kísérleteinkben vizsgált összes zsírsav változatlanul hagyta az egyensúlyi paramétereket, vagyis az aktiváció és az inaktiváció feszültségtől való függését. A zsírsavak limfocitamembránba történő beépülésének igazolására végzett gázkromatográfiás mérések mutatják az egyes kezelések eredményességét: minden vizsgált zsírsav nagyobb mennyiségben jelent meg a limfociták plazmamembránjában, mint amennyi a kezeletlen sejtekben található volt.

Kimutattuk tehát, hogy a PUFA-k képesek módosítani a $K_v1.3$ csatornák kinetikáját humán perifériás limfocitákon azáltal, hogy megváltoztatják a mikrokörnyezetet a lipid kettős rétegben. Ily módon a PUFA-kban gazdag étrend fontos lehet a megfelelő lipidösszetétel fenntartásához vagy lipidkorrekció indukálásához. A T sejt-aktiváció a feszültség-kapuzott és a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák és a Ca^{2+} felszabadulás-aktivált Ca^{2+} csatornák működésén alapul, ezért a $K_v1.3$ csatornák működésének PUFA-indukált megváltozásai előidézhetik az immunrendszer funkciójának megváltozását. Mivel a T limfocitákban kifejeződő $K_v1.3$ csatornák irányítják a membránpotenciált és a jelátvitelt, a PUFA-indukált hatások hasznosak lehetnek az immunrendszer működési zavarainak és/vagy akut és krónikus gyulladásoknak a kezelésében.

2. Kimutattuk, hogy a K^+ áramok mértéke és az adozinreceptor-stimuláció vagy -inhibíció között kapcsolat van a DDT_1 MF-2 sejtek esetében. Jelen értekezést előzetes méréseinkkel is összevetve – melyekről Rubovszky Bálint értekezésében már beszámolt – megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott adozin-agonisták és -antagonisták részt vesznek az adozinreceptor-mediált folyamatban, és igazolják az A_1 és A_2 adozin-receptorok jelenlétét és aktivitását a vizsgált sejtvonalon. A K^+ áram tulajdonságaiban bekövetkezett változások során a receptorok a csatornákra G protein-független módon fejtik ki hatásukat. Ugyanakkor a vizsgált P_1 agonisták és antagonisták a sejteken levő Na^+ csatornák konduktanciáját nem befolyásolták.

A DDT₁ MF-2 sejtek egyedülállóak abban, hogy az A₁ receptor-aktivációra megnövekedett K⁺ konduktanciával és hiperpolarizációval, az A₂ receptor-aktivációra pedig csökkent K⁺ konduktanciával és depolarizációval képesek válaszolni. Ezért ezek a sejtek jól használhatók lehetnek a farmakológiában, az A₁ és A₂ receptor-mediált mechanizmusok ugyanazon a sejtvonalon történő vizsgálatában.

6. KÖZLEMÉNYEK

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Székely, A., Kitajka, K., Panyi, Gy., Márián, T., Krasznai, Z.: Nutrition and immune system: Certain fatty acids differently modify membrane composition and consequently kinetics of $K_v1.3$ channels of human peripheral lymphocytes. *Immunobiology* **212** (3), 213-227. (2007)
IF: 1,812

Rubovszky, B., Márián, T., Szentmiklósi J. A., Cseppentő, Á., Gesztelyi, R., **Székely, A.**, Fórizs, F., Gáspár, R., Krasznai, Z.: Comparative pharmacological studies on the A_2 adenosine receptor agonist 5'-N-ethyl-carboxamidoadenosine and its ^{19}F isotope labelled derivative. *J. Pharmacol. Sci.* **93**, 356-363. (2003) **IF: 1,792**

Márián, T., Rubovszky, B., Szentmiklósi J. A., Trón, L., Balkay, L., Boros, I., Gáspár, R., **Székely, A.**, Krasznai, Z.: A_1 and A_2 adenosine receptor activation inversely modulates potassium currents and membrane potential in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **89**, 366–372. (2002) **IF: 1,792**

6.2. Egyéb közlemények

Lévai, A., Adam, W., Jekő, J., Patonay, T., **Székely A.** and Vass, E. B.: A comparative study of the epoxidation of 2-substituted isoflavones by dimethyldioxirane, sodium hypochlorite, and alkaline hydrogen peroxide (Weitz–Scheffer reaction). *J. Heterocyclic Chem.* **37**, 1065–1069. (2000) **IF: 0,735**

6.3. Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek, megjelent absztraktok, előadáskivonatok

Székely A., Krasznai Z.: Modification of kinetics of $K_v1.3$ channels of human peripheral lymphocytes by certain fatty acids. *ISAC XXII International Congress*, Montpellier, Franciaország, 2004. (poszter)

Székely A., Kitajka K., Krasznai Z.: A humán perifériás limfociták $K_V1.3$ csatornáinak kinetikája és membránjának összetétele egyes zsírsavak hatására megváltozik. *XXXIV. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2004. (poszter)

Székely A., Kitajka K., Krasznai Z.: Egyes zsírsavak hatására megváltozik a humán perifériás limfociták $K_V1.3$ csatornáinak kinetikája és membránjának összetétele. *IV. Sejtanalitikai konferencia*, Budapest, 2004. (poszter)

Székely A., Krasznai Z.: Certain fatty acids differently modify kinetics of $K_V1.3$ channels of human peripheral lymphocytes. *Herculane International Autumn School of Biophysics*, Timișu de Sus – Predeal, Románia, 2003. (poszter)

Székely A., Rubovszky B., Krasznai Z.: Egyes zsírsavak eltérően módosítják a humán perifériás limfociták $K_V1.3$ csatornáinak kinetikáját. *XXXIII. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2003. (poszter)

Székely A., Fórizs F., Rubovszky B., Márián T., Krasznai Z.: Adenozin-analógok dóziszfüggően módosítják a DDT_1 MF-2 simaizom-sejtek káliumcsatornáinak működését. *XXXII. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2002. (poszter)

Székely A., Fórizs F., Rubovszky B., Márián T., Krasznai Z.: Az A_1 és A_2 adenozinreceptor-aktiváció ellentétes hatása DDT_1 MF-2 simaizom-sejtek membránpotenciáljára. *III. Sejtanalitikai konferencia*, Budapest, 2002. (poszter)

Rubovszky B., Márián T., Lehel Sz., **Székely A.**, Krasznai Z.: Effect of P_1 type adenosine receptor agonists on the potassium currents of DDT_1 MF-2 smooth muscle cells. *Summer School National Conference of Romanian Society for Pure and Applied Biophysics*, Sovata, Románia, 2001. (poszter)

Székely A., Márián T., Rubovszky B., Krasznai Z.: Adenosine analogues modify potassium channel properties of DDT_1 MF-2 cells in a dose-dependent manner. *Summer School National Conference of Romanian Society for Pure and Applied Biophysics*, Sovata, Románia, 2001. (poszter)

Rubovszky B., Márián T., Lehel Sz., **Székely A.**, Krasznai Z.: Effect of P_1 type adenosine receptor agonists on the potassium currents of DDT_1 MF-2 smooth muscle cells. *Orvosi és gyógyszerészeti szemle* **47**. (3), 8. (2001) (megjelent absztrakt)

Székely A., Márián T., Rubovszky B., Krasznai Z.: Adenosine analogues modify potassium channel properties of DDT₁ MF-2 cells in a dose-dependent manner. *Orvosi és gyógyszerészeti szemle* **47**. (3), 9-10. (2001) (megjelent absztrakt)

Rubovszky B., Márián T., Lehel Sz., **Székely A.**, Krasznai Z.: P₁ típusú adenosinreceptor-agonista NECA és fluorral jelölt származéka, a ¹⁹F-NECA hatása DDT₁ MF-2 sejtek káliumáramaira. *XXXI. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2001. (poszter)

6.4. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások

Székely A., Kitajka K., Krasznai Z.: A humán perifériás limfociták K_v1.3 csatornáinak kinetikája és membránjának összetétele egyes zsírsavak hatására megváltozik. *XXXIV. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2004.

Székely A.: Zsírsavak módosítják a humán perifériás limfociták K_v1.3 csatornáinak kinetikáját. *PhD konferencia*, Debrecen, 2003.

Székely A.: Adenosin-analógok dóziszfüggően módosítják a DDT₁ MF-2 sejtek káliumcsatornáinak működését. *PhD konferencia*, Debrecen, 2002.

Rubovszky B., Márián T., Lehel Sz., **Székely A.**, Krasznai Z.: P₁ típusú adenosinreceptor-agonista NECA és fluorral jelölt származéka, a ¹⁹F-NECA hatása DDT₁ MF-2 sejtek káliumáramaira. *XXXI. Membrán-transzport konferencia*, Sümeg, 2001.

6.5. Egyéb poszter

Kiss, T., **Székely, A.**, Somsák, L. and Kiss, L.: Synthesis of xilosidase inhibitors and their enzymatic investigations using β-D-xilosidase from *Aspergillus carbonarius*. *20th International Carbohydrate Symposium*, Hamburg, Németország, 2000. (poszter)

6.6. Egyéb előadások

Lévai, A., Patonay, T., **Székely, A.** and Vass, E. B.: Enantioselective epoxidation of 3-substituted and 2,3-disubstituted chromones. *17th International Congress of Heterocyclic Chemistry*, Vienna, Ausztria, 1999.

Lévai, A., Patonay, T., **Székely, A.** and Vass, E. B.: Comparative epoxidation of 3-substituted and 2,3-disubstituted chromones. *11th European Symposium on Organic Chemistry*, Göteborg, Svédország, 1999.

Lévai A., Patonay T., **Székely A.**, Vass E.: Kromonok összehasonlító epoxidálása. *A MTA Heterociklusos Kémiai Munkabizottsága 1999. évi előadóülése*, 1999.

Székely A.: 3-Szubsztituált és 2,3-diszubsztituált kromonok epoxidálása. *XXIV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia*, Veszprém, 1999.

Székely A.: 3-Szubsztituált és 2,3-diszubsztituált kromonok epoxidálása, *TDK konferencia*, Debrecen, 1998.