

hajdu.peter.4_343_25

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**IMMUNSEJTEK IONCSATORNÁINAK VIZSGÁLATA: FUNKCIÓ, SZABÁLYOZÁS,
LOKALIZÁCIÓ ÉS MŰKÖDÉS NORMÁL ÉS PATOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT**

Hajdu Péter Béla



**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolóGIAI INTÉZET
FOGORVOSTUDOMÁNYI KAR
FOGORVOSI BIOKÉMIAI NEM ÖNÁLLÓ TANSZÉK**

DEBRECEN, 2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	7
1. Tudományos háttér	11
1.1 Bevezetés	11
1.2 Ioncsatornák a T-sejtekben	12
1.2.1 A Kv1.3 csatorna jellemzői	13
1.2.2 Az Orai és STIM tulajdonságai	14
1.2.3 A kétpórusú K ⁺ -csatornák, TASK-1 és TASK-3	16
1.3 A dentritikus sejtek (DC-k) és ioncsatornáik, az Nav1.7 ioncsatorna	18
1.4 Immunológiai szinapszis és T-sejt aktiváció	21
1.5 Ioncsatornák az immunológiai szinapszisban	22
1.6 MAGUK fehérjecsald, cortactin és HS1	24
1.7 A sejtmembrán szerkezete, lipid raftok, koleszterin szerepe	26
1.8 A koleszterin szerepe az ioncsatornák működésének szabályozásában	27
1.9 A koleszterinhomeosztázisban fellépő zavar betegségek kialakulásához vezet	29
1.9.1 A koleszterin bioszintézis zavarának prototípusa: Smith-Lemli-Opitz szindróma	29
1.9.2 Hiperkoleszterinémia és annak immunológiai vonatkozásai	30
1.10 A Kv1.3 csatorna az autoimmun betegségekben	31
2. Célkitűzések	34
2.1 A sejtmembrán szterol (7-dehidrokoleszterin, koleszterin) tartalmának hatása a T-sejtek fiziológiájára, ioncsatornáira	34
2.2 A T-sejt ioncsatornák plazmamembrán lokalizációjának molekuláris háttere és funkcionális következményei	34
2.3 A Kv1.3 csatorna, mint terápiás célpont: egy autoimmun betegség (SLE) sejtszintű lehetséges gyógymódja	35
2.4 Az Nav1.7 csatorna altípus specifikus expressziója és szerepe az éretlen dendritikus sejtekben	35
3. Anyagok és módszerek	36
3.1 Sejtek, sejtenyésztés	36
3.1.1 T-limfociták, mononukleáris vérsejtek	36
3.1.2 Dentritikus sejtek	36
3.1.3 CHO, HEK tsA-201, HEK, HEK-293T sejtek	37
3.1.4 Jurkat E6-1, CH12, D10 sejtek	37
3.1.5 PBMC-s minták hiperkoleszterinémiás betegekből	38
3.1.6 PBMC-k izolálása Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegekből	38
3.1.7 Sejtek töltése koleszterinnel/7-dehidrokoleszterinnel	39

3.1.8	DC-k migrációjának vizsgálata	39
3.2	A sejtek koleszterin és 7DHC összetételének meghatározása	39
3.2.1	Amplex Red Cholesterol Assay Kit	39
3.2.2	Gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS)	40
3.3	Molekuláris biológia	40
3.3.1	Plazmid preparálás, izolálás, mutációk	40
3.3.2	SDS-PAGE elektroforézis és western blot	41
3.3.3	Coomassie-festés és GST affinitás kromatográfia	41
3.3.4	Q-RT-PCR expressziós analízis (DC-k)	42
3.4	Génexpresszió módosítás	43
3.4.1	Transzfecció	43
3.4.2	Virális transzdukció	43
3.4.3	Retrovirális shRNS-es géncsendesítés	43
3.4.4	Géncsendesítés siRNS-sel	43
3.4.5	Kv1.3 csendesítése siRNS-et tartalmazó NP-kkel (siRNS-NP) T-sejtekben	43
3.5	Elektrofiziológia	44
3.5.1	Patch-clamp technika	44
3.5.2	A DC-k áram és membránpotenciál mérése	45
3.6	Lipid nanovezikulák (NP) előállítás	46
3.6.1	NP szintetizálás	46
3.6.2	ULV-k funkcionálizálása	47
3.6.3	siRNS bezárása NP-kbe	47
3.6.4	Az NP-k méretének meghatározása	47
3.7	Intracelluláris Ca ²⁺ -szint mérés	47
3.7.1	Áramlási citometriás módszer	47
3.7.2	Mikroszkópos intracelluláris Ca ²⁺ mérés	48
3.7.3	Intracelluláris Ca ²⁺ válasz mérése az immunológiai szinapszisban	49
3.8	Immunológiai szinapszis létrehozása	50
3.8.1	Kv1.3 csatorna IS-beli módosítása D10 sejtben	50
3.8.2	Kv1.3 csatorna IS-beli berendeződésének molekuláris háttere	50
3.8.3	Orai1 IS-beli feldúsulása, Kv1.3-cortactin kihorgonyozása	51
3.9	Konfokális mikroszkópia, képkieértékelés, FRAP, PLA	51
3.9.1	Konfokális mikroszkópok	51
3.9.2	Kv1.3-cortactin kihorgonyozása: FRAP mérések	51
3.9.3	Kv1.3 csatorna IS-beli berendeződésének kvantifikációja	52
3.9.4	Az Orai1 IS-beli berendeződésének meghatározása	53

3.10	Immunfluoreszcencia	54
3.10.1	Jelölés áramlási citometriás méréshez.....	54
3.10.2	Jelölés mikroszkópos méréshez	54
3.10.3	CFSE proliferációs esszé	54
3.10.4	NFAT nukleáris transzlokáció vizsgálata.....	55
3.10.5	Áramlási citometria	56
4.	Eredmények és megbeszélésük.....	57
4.1	A sejtmembrán szterol (7-dehidrokoleszterin, koleszterin) tartalmának hatása a T-sejtek fiziológiájára, ioncsatornáira	57
4.1.1	Hiperkoleszterinémias betegek T-sejt aktivációja és Kv1.3 csatorna működésének komparatív vizsgálata.....	57
4.1.1.1	A limfocita koleszterintartalom meghatározása hiperkoleszterinémiában.....	57
4.1.1.2	A Kv1.3 expressziójának vizsgálata hiperkoleszterinémia esetén	58
4.1.1.3	A Kv1.3 ioncsatorna kapuzását jellemző kinetikai paraméterek meghatározása hiperkoleszterinémia esetén	58
4.1.1.4	Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése.....	60
4.1.1.5	Hiperkoleszterinémias betegekből izolált limfociták osztódásának vizsgálata CFSE hígulási esszével	61
4.1.2	Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindrómás betegek T-sejt Kv1.3 csatorna működés és aktiváció/proliferáció változásának vizsgálata	64
4.1.2.1	A SLOS sejtek szterolösszetételének vizsgálata GC-MS módszerrel	64
4.1.2.2	A Kv1.3 ioncsatorna expresszió vizsgálata SLOS esetén	64
4.1.2.3	Kv1.3 kapuzását jellemző biofizikai paraméterek meghatározása SLOS esetén	66
4.1.2.4	Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése.....	67
4.1.2.5	SLOS-ból izolált limfociták aktivációjának és proliferációjának vizsgálata	68
4.1.2.6	SLOS állapot modellezése: a 7DHC szint változtatása M β CD/7DHC komplexszel és hatása a Kv1.3 áramsűrűsége	70
4.1.2.7	Kv1.3 ioncsatornák kapuzási paraméterei az SLOS modellrendszerben	72
4.1.2.8	A CHOL és 7DHC Kv1.3 csatornára gyakorolt hatásának összehasonlítása	73
4.1.3	Kv1.3 csatorna és membránbeli szterol közötti kölcsönhatásért felelős fehérje motívumok azonosítása	77
4.1.3.1	A Kv1.3 C-terminális delécióna a Kv1.3 csatornát szterol inszenzitívvé teszi	77
4.1.3.2	A Kv1.3 kettő szterol kötőhellyel rendelkezik a C terminálisán.....	79
4.2	A T-sejt ioncsatornák plazmamembránbeli eloszlásának molekuláris háttere és funkcionális következményei	83
4.2.1	A Kv1.3 csatorna az immunológiai szinapszisba rendeződésének funkcionális következménye	83
4.2.1.1	Egér T sejt vonal (D10) ioncsatornáinak biofizikai és farmakológiai azonosítása....	83

hajdu.peter.4_343_25

4.2.1.2	A TASK csatornák feltételes jelenlétének vizsgálata a D10 sejtvonalon.....	83
4.2.1.3	A kétpórusú K ⁺ csatornák nem érzékenyek margatoxinra.....	85
4.2.1.4	TASK gátlószerek hatása a Kv1.3 csatornára	85
4.2.1.5	A Kv1.3 csatornák kapuzása megváltozik az immunológiai szinapszisban	87
4.2.1.6	A protein-kináz (PK) antagonisták gyorsítják a Kv1.3 inaktivációját.....	89
4.2.2	Kv1.3 ioncsatorna IS-be történő berendeződése: PDZ-domén fehérjék szerepe	93
4.2.2.1	A Jurkat sejtek PSD-95-öt és SAP97-et expresszálják	93
4.2.2.2	A PSD-95 és a SAP97 kölcsönhatásba lép a Kv1.3 C-terminális régiójával.....	94
4.2.2.3	Az mGFP-taggelt vad-típusú és C-terminális deletált Kv1.3 csatornák biofizikai sajátságai	95
4.2.2.4	A Kv1.3 C-terminális deléciója vagy a PSD-95 expresszió hiánya gátolja a Kv1.3 felhalmozódását az immunológiai szinapszisban	97
4.2.3	Kv1.3 ioncsatorna immobilizációjának molekuláris háttere.....	101
4.2.3.1	Kv1.3 csatorna és a cortactin ko-lokalizál, cortactin/SH3/PDZ kötőhely Kv1.3 mutánsok	101
4.2.3.2	Mutáns csatornák biofizikai sajátságai	103
4.2.3.3	Kv1.3 interakciója a cortactinnal.....	105
4.2.3.4	A Kv1.3 csatorna variánsok laterális mobilitása.....	105
4.2.3.5	A cortactin szerepe a Kv1.3 mobilitásban.....	107
4.2.3.6	A Kv1.3 és a HS1 kölcsönhatása a T-limfocitákban	108
4.2.4	Az Orai1 IS-beli tartózkodása megváltoztatja a T-sejtek Ca ²⁺ -válaszát	110
4.2.4.1	Az Orai1 immunológiai szinapszisba történő felhalmozódásának kinetikája	110
4.2.4.2	A STIM1 befolyásolja az Orai1 IS-beli tartózkodási idejét.....	111
4.2.4.3	Az Orai1 N-terminálisának deléciója a STIM1 csendesítéshez hasonló eredményeket mutat	115
4.2.4.4	A SAP97 szabályozhatja az Orai1 távozását az immunológiai szinapsziszól.....	117
4.2.4.5	Az Orai1 az IS-beli tartózkodása szabályozza a T-sejtek Ca ²⁺ - választ.....	121
4.2.5	A C terminális HRET(E) szekvencia szerepe a Kv1.3 csatorna működésében.....	124
4.2.5.1	Stratégiai szempontok a Kv1.3 konstruktok megtervezésekor	124
4.2.5.2	A C-terminális régió deléciója nem csökkenti a Kv1.3 csatornák áramát.....	125
4.2.5.3	A farmakológiai bizonyíték: a homomer H399K-ΔC csatornák a membránban ...	126
4.2.5.4	A NOHRET csatornák kijutnak a sejtmembránba.....	127
4.2.5.5	A NOHRET csatorna: kapuzási áram vagy „gating-current” nem mutatható ki....	129
4.2.5.6	A HRET(E) szekvencia eltávolítása vagy alanin-mutációja nem befolyásolja a Kv1.3 működését	130
4.3	Kv1.3 csatorna, mint terápiás célpont: egy autoimmun betegség (SLE) sejszintű lehetséges gyógymódja	133

4.3.1	Kv1.3 siRNS-sel töltött funkcionizált liposzómák: T _M specifikus Kv1.3 expresszió leszabályozás	133
4.3.1.1	100 nm méretű lipid nanorészecskék szintézise, funkcionizálása és siRNS-sel töltése	133
4.3.1.2	A CD45RO-NP-k specifikusan kötődnek a T _M -sejtekhez és internalizálódnak	134
4.3.1.3	Kv1.3 NP-be zárt siRNS bejut T _M sejtekbe.....	137
4.3.1.4	A Kv1.3-NP-k csökkentik a Kv1.3 csatornák expresszióját	138
4.3.1.5	A memória T-sejtek Ca ²⁺ -válasza csökken a Kv1.3-NP kezelés hatására.....	139
4.3.2	Nanovezikula-asszisztált Kv1.3 géncsendesítés hatása a Ca ²⁺ -függő jelátvitelre	141
4.3.2.1	A Kv1.3-NP-k gátolják az NFAT nukleáris transzlokációt a memória T-sejtekben	141
4.3.2.2	A Kv1.3-NP-k csökkentik a CD40L expresszióját a memória T-sejtekben	143
4.3.2.3	Kv1.3-NP-ék T-sejt fenotípus-váltást eredményeznek.....	143
4.4	Az Nav1.7 csatorna altípus specifikus expressziója és szerepe az éretlen dendritikus sejtekben	147
4.4.1	A Nav1.7 elsősorban a CD1a ⁺ monocitákból származó éretlen dendritikus sejtek (IDC) alpopulációjában fejeződik ki	147
4.4.2	Az intracelluláris Ca ²⁺ szint emelkedése leszabályozza a Nav1.7 expresszióját	148
4.4.3	Az Nav1.7 csatorna szabályozza a CD1a ⁺ IDC-k membránpotenciálját	149
4.4.4	A Nav1.7 befolyásolja a CD1a ⁺ IDC-k migrációját és citokin szekrécióját.....	151
5.	Összefoglalás	154
6.	Jelentőség.....	157
7.	Köszönetnyilvánítás.....	158
8.	Közlemények	160
8.1	A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények	160
8.2	Az értekezés alapját képező közlemények.....	161
8.3	A PhD disszertációt követő egyéb közlemények.....	166
8.4	Könyvfejezetek.....	171
8.5	Szerkesztői összefoglaló.....	171
8.6	Tudományometriai adatok összefoglalása.....	171
9.	Irodalomjegyzék	172

Rövidítések jegyzéke

AR/AA:	<i>accumulation ratio / akkumulációs ráta/arány</i>
APC:	<i>antigen presenting cell / antigén prezentáló sejt</i>
ARP2/3:	<i>actin related protein 2/3 / aktinhoz kapcsolódó fehérje 2/3</i>
BCR:	<i>B cell receptor / B-sejt receptor</i>
CAD:	<i>CRAC activation domain / CRAC aktivációs domén</i>
CC:	<i>coiled-coil / „tekercselt tekercs”</i>
CD:	<i>current density / áram sűrűség</i>
CD:	<i>cluster of differentiation / differenciációs klaszter</i>
CHO:	<i>Chinese hamster ovarium / kínai hörcsög ovárium</i>
CV:	<i>coefficient of variation / variációs koefficiens</i>
CRAC:	<i>calcium release activated calcium channel / Kalcium felszabadulás aktiválta kalcium csatorna</i>
CRAC/CARC	
szekvencia:	<i>cholesterol recogniton amino acid sequence/koleszterin felismerő aminosav motívum</i>
CTL:	<i>cytotoxic T-lymphocyte/ citotoxikus T-sejt</i>
DC v DS:	<i>dendritic cell / dendritikus sejt</i>
7DHC:	<i>7-dehidrokoleszterin / 7-dehydrocholesterol</i>
7DHCR:	<i>7-dehidrokoleszterin-reduktáz / 7-dehydrocholesterol reductase</i>
DLG1:	<i>Discs Large homolog 1</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DPC:	<i>distal pole complex / disztális pólus komplex</i>
E.coli:	<i>Escherichia coli</i>
ER:	<i>endoplasmic reticulum / endoplazmatikus retikulum</i>
ERM:	<i>ezrin, radixin and moesin / ezrin, radixin és moezin</i>
FBS:	<i>fetal bovine serum / magzati szarvasmarha szérum</i>
FL:	<i>full-length / teljes hosszúságú</i>
GAMIG:	<i>goat anti-mouse IgG / kecskében termelt egér-ellenes IgG</i>
EGFP/mGFP:	<i>enhanced/ monomeric green fluorescent protein / felerősített/monomer zöld fluoreszcens fehérje</i>
GC-MS:	<i>gas chromatography mass spectrometry / gázkromatográfia-tömegspektrometria</i>
GUK:	<i>guanylate kinase /guanilát kináz</i>

HC:	hypercholesterolemia / hiperkoleszterinémia
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>
LDL:	low density lipoprotein / kis sűrűségű lipoprotein
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>
MβCD:	methyl- β cyclodextrin / metil- β -ciklodextrin
MβCD/CHOL:	methyl- β cyclodextrin-cholesterol complex / metil- β ciklodextrin-koleszterin zárványkomplex
MβCD/7DHC:	methyl- β cyclodextrin-7DHC complex / metil- β ciklodextrin-7DHC zárványkomplex
MHC:	major histocompatibility complex / fő hisztokompatibilitási komplex
MLV:	multilamellar lipid vesicle / multilamelláris vezikula
nAChR:	nicotinic acetylcholine receptor / nikotinerg acetilkolin receptor
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>
NK sejt:	natural killer cell / természetes ölósejt
NP:	nanoparticle / nanopartikulum v. nanorészecske
oxLDL:	oxidized low-density lipoprotein / az LDL oxidált formája
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>
siRNA:	small interfering ribonucleic acid / <i>kicsi interferáló 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>
SEM:	scanning electron microscope / <i>pásztázó elektron mikroszkóp</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>
SLOS:	Smith-Lemli-Opitz syndrome / <i>Smith-Lemli-Opitz szindróma</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 Ca²⁺ beáramlás</i>
STIM1:	Stromal interaction molecule 1 / <i>Sztrómális interakciós molekula 1</i>
TB:	Terrific broth
TBS:	TRIS Buffered Saline / <i>TRIS pufferolt sóoldat</i>

hajdu.peter.4_343_25

T_C:	cytotoxic T cell / citotoxikus T-sejt
T_{CM}:	central memory T cell / centrális memória T-sejt
TCR:	T Cell Receptor / <i>T-sejt receptor</i>
TEA:	Tetraethylammonium / <i>Tetraetilammónium</i>
T_{EM}:	effector memory T cell / effektor memória T-sejt
TEM:	<i>transmission electron microscope / transzmissziós elektron mikroszkóp</i>
TG:	thapsigargin
T_H:	helper T cell / helper T-sejt
T_M:	memory T cell / memória T-sejt
TM:	transmembrane / transzmembrán
ULV:	unilamelláris lipid vezikula / unilamellar lipid vesicle
WASP:	Wiskott-Aldrich Syndrome protein / <i>Wiskott-Aldrich szindróma fehérje</i>
Wave2:	WASp family Verprolin-homologous protein-2 / <i>WASp család verprolin-homológ fehérje</i>
WIP:	WASP-interacting-protein / <i>WASP-interakciós fehérje</i>
WT v. VT:	wild type / <i>vad típus</i>

1. Tudományos háttér

1.1 Bevezetés

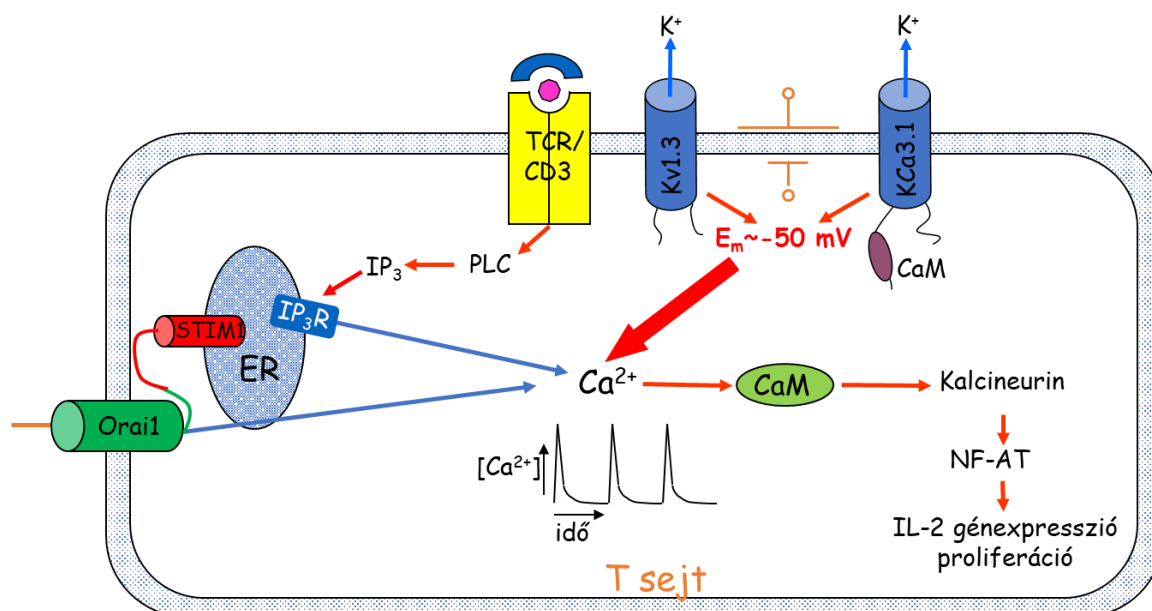
Az emberi szervezet immunválasza két szakaszra különíthető el: a korai fázisban a veleszületett vagy természetes immunitás szereplői (makrofágok, granulociták, természetes ölő sejtek (NK sejtek)) igyekeznek a patogén elemeket eliminálni a szervezetből, majd ezt követően lépnek színre az adaptív vagy szerzett immunitásért felelős sejtek: a különféle limfociták (B és T), melyek egyes alpopulációi aktiválódnak és vesznek részt a kórokozó legyőzésében. Az adaptív és veleszületett immunválasz összekapcsolásában játszanak szerepet a dendritikus sejtek (DC-k), melyek a patogéneket felismerve a nyirokcsomókba vándorolva aktiválják az ott tartózkodó T- és B-sejteket, ezáltal beindítva az adaptív immunválaszt. A DC-ek egy mieloid őssejtből differenciálódott szövet-rezidens sejtek (korábban éretlen DC-nek nevezték őket), melyek az antigének felvétele után differenciálódnak „éretté” és a nyirokcsomóba vándorolva antigén prezentáló sejt-ként funkcionálva aktiválják a limfocitákat.

Az adaptív immunválasz egyik fontos lépése a T-limfociták klonális expanziója, azaz egy adott antigénre specifikus T-sejt alpopuláció aktivációja, majd proliferációja. In vivo, a T-limfociták az antigén prezentáló sejtekkel kölcsönhatva az immunológia szinapszisknak (IS) nevezett szupramolekuláris szignáloszóma kialakulása révén aktiválódnak. A két sejt kontaktrégiójába berendeződött intracelluláris- és membránfehérjék egymás molekuláris közelségét „kihasználva” egy rendkívül hatékony jelátviteli folyamatot képesek realizálni mindkét sejtben. A IS kialakulásának gátlása egyértelműen a T-sejt aktiváció elmaradását eredményezi.

A specifikus antigén T-sejt receptorhoz (TCR/CD3 komplexhez) történő kötődése beindítja azt a jelátviteli kaszkádot, melynek egyik fontos szabályozó eleme az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]_{ic}$). A Ca^{2+} -függő aktiváció szabályozásában fontos résztvevők az ioncsatornák, melyek egyrészt biztosítják, hogy a Ca^{2+} beáramolhasson az extracelluláris térből a citoszólba (Orai1-STIM1 komplex alkotta CRAC csatorna: Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channel), illetve a Ca^{2+} depolarizáló hatását kompenzálják és negatív értéken tartják a membrán potenciált (Kv1.3: feszültség kapuzott/depolarizáció aktivált K^+ csatorna, KCa3.1: intracelluláris Ca^{2+} által szabályozott K^+ csatorna). Mindemellett az ioncsatornák számos egyéb

fiziológiai funkciót képesek szabályozni az immunsejtekben, mint pl. sejtmigráció, interleukin-2 (IL-2) / CD40L (v. CD154) expresszió beindítása, granzim B termelés és még sok más egyéb (1. ábra).

Az ioncsatornák expresszióját (Kv1.3, KCa3.1) már az 1980-as évek derekán kimutatták T-limfocitákban, valamint azóta számos egyéb immunsejtben (B-sejt, dendritikus sejt, makrofák, monocita, granulocita) is igazolták a különféle ioncsatornák funkcionális szerepét [4-11]. Továbbá számos autoimmun betegség esetében sikerült kimutatni, hogy az autoreaktív T-sejtek ioncsatornáinak farmakológiai gátlása révén, illetve célzott sejterápiás, expresszió-leszabályozással a betegség kezelhető [12-15]. Következésképp az ioncsatornák különféle immunsejtekben betöltött szerepének és működésének megismerése fontos mérföldkő lehet a hatékonyabb terápiák kifejlesztése végett.



1. ábra. K⁺ és Ca²⁺ csatornák a limfociták aktivációjában [3]. TCR: T-sejt receptor. PLC: foszfolipáz C IP₃: inositol 1,4,5-triszfoszfát, IP₃R: IP₃ receptor. ER: endoplazmatikus retikulum. STIM1: stromal interaction molecule 1. CaM: kalmodulin.

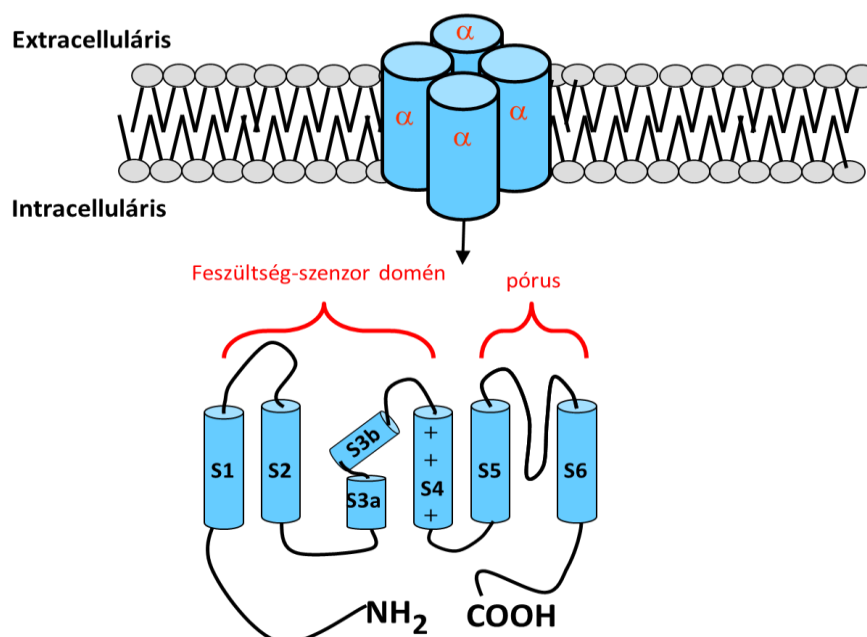
1.2 Ioncsatornák a T-sejtekben

Az ioncsatornák pórusformáló fehérjék, amelyek szinte minden sejtípusban 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⁺, Ca²⁺ 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 [16].

1.2.1 A Kv1.3 csatorna jellemzői

A kálium csatornák nélkülözhetetlen szerepet játszanak a membránpotenciál beállításában és az intracelluláris jelátvitel szabályozásában különböző sejtekben [17, 18]. 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-ben történő összeszereléséhez. Ezen kívül a Kv β járulékos alegységek képesek az N-terminushoz kötődni, és lehetővé teszik több jelátviteli molekula (mint például kinázok) kapcsolódását [19]. 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 [20]. A csatorna C-terminálisához különböző linker ill. adapter fehérjék kapcsolódhatnak, amelyek kihorganyozhatják a fehérjét a citoskeletonhoz, vagy irányíthatják a csatorna kijutását a plazmamembránba (**2. ábra**) [21-26].



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).

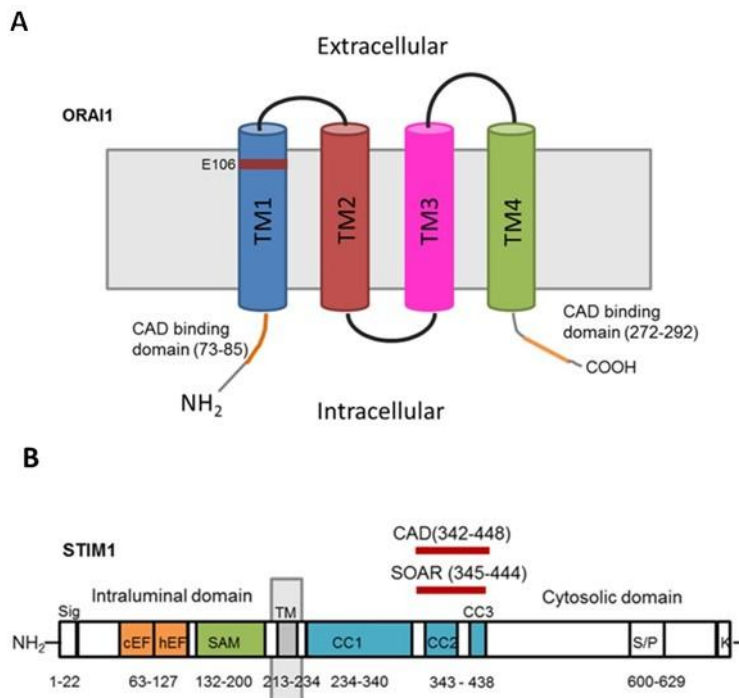
1.2.2 Az Orai és STIM tulajdonságai

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 [27-30]. 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 aminosava [31, 32]. A vad típusú változatnak tekintett Orai1 α -csatorna hat alegységből áll [33-35]. Minden alegység négy alfa-helikális transzmembrán domént (TM) tartalmaz, és intracelluláris N- és C-terminálokkal, valamint szelektivitási szűrővel rendelkezik a 106. pozícióban (**3. ábra** A panel) [30]. A STIM1 CRAC aktivációs doménjének (CAD) és az Orai1 N- (73-91 aa, α izoforma szerinti számozás) és C-terminális végén (342 – 448 aa) 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 a kölcsönhatás során [36-38]. 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 [39-41]. 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 [41]. 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 [42, 43]. Továbbá, kimutatták, hogy az Orai2 gén csendesítése egerekben növelte a SOCE-t T-sejtekben és makrofágokban [44]. 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 [44, 45].

A STIM1 685 aminosavból álló, I-es típusú transzmembrán fehérje, amely nyugalmi állapotban az ER-ban helyezkedik el. A lumenális N-terminális régiója tartalmaz egy ER szignál-

peptidet, egy EF-kéz (EF-hand) és egy SAM (steril alfa motívum) domént, míg a citoszólikus 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 [46, 47]. 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. ábra** B panel) [47, 48]. Emlősökben előforduló homológja a STIM2, amely lényegesen gyengébb Orai1 aktivációra képes [49]. 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 [50-54]. 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 [53].

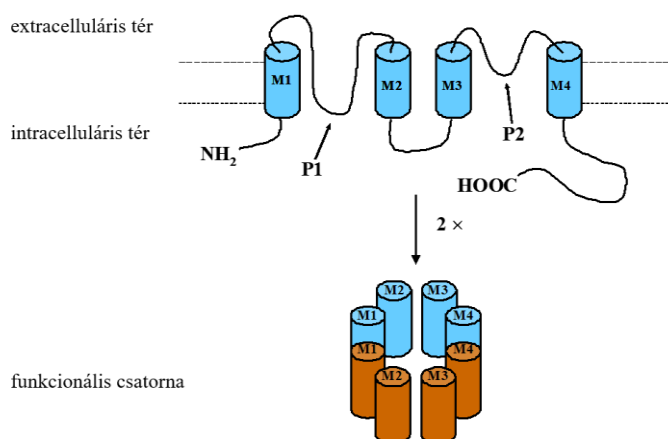
Az Orai1 és a STIM1 különféle funkcióvesztéssel járó mutációi a CRAC csatorna működését (pl. konduktancia csökkenés, megszűnés) és ezzel együtt az immunválasz kialakulását is gátolhatják. A CRAC csatorna funkció módosulása ill. teljes elvesztése immunhiányt, gyakori fertőzéseket, T-sejt aktivációs defektusokat, veleszületett légzőizom elégtelenséget okozhat [39, 55-57]. Éppen ezért az Orai1 különböző fenotípusaira/mutánsaira irányuló kutatások rendkívül fontosak a CRAC csatornához köthető betegségek mechanizmusának megismerése végett [39, 57, 58].



3. ábra Az Orai1 és a STIM1 felépítése (A) TM1-TM4: Transzmembrán domén 1-4. CAD binding domain: CRAC aktivációs kötő domén. **(B)** Sig: szignál peptid. CEF: kanonikus EF-hand. hEF: rejtett EF-hand. SAM: steril alfa motívum. CC1-CC3: coiled-coil domén. CAD: CRAC aktivációs domén. SOAR: STIM1-Orai1 aktivációs régió. S: szerin. P: prolin. K: lizin.

1.2.3 A kétpórusú K^+ -csatornák, TASK-1 és TASK-3

A K^+ csatornák családját alkotják a két alegységből felépülő, alegységenként két pórusrégiót (P1 és P2) tartalmazó, ún. kétpórusú K^+ csatornák (**4. ábra**). Az egyes alegységek a membránt teljesen átívelő négy α -helikális szegmensből (M1-M4) állnak, melyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnek össze. A kétpórusú K^+ csatornák szekvenciális azonosság és funkcionális hasonlóság alapján hat alcsaládba osztályozható: TWIK (**T**andem of Pore Domains in a **W**eak **I**nward **R**ectifying K^+ Channel), TREK (**T**WIK-**R**elated K^+ Channel), TASK (**T**WIK-**R**elated **A**cid-Sensitive K^+ Channel), TALK (**T**WIK-**R**elated **A**lkaline pH-Activated K^+ Channel), THIK (**T**andem Pore Domain **H**alothane-**I**nhibited K^+ Channel), és TRESK (**T**WIK-**R**elated **S**pinal Cord K^+ Channel). Az aminosav-szekvencia analízisek csupán 25-40% homológiát mutatnak a családon belüli egyes csatorna-osztályok között, s a csatornák alapvető elektrofiziológiai sajátosságai nagymértékben eltérhetnek egymástól.



4. ábra. A kétpórusú csatornák feltételezett szerkezete. Két alegységből felépülő, alegységenként két pórus régiót (P1 és P2) tartalmazó K⁺ csatornák. Az egyes alegységek a membránt teljesen átívelő négy α -helikális szegmensből (M1-M4) állnak, melyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnék össze.

Közös jellemzőjük, hogy a hagyományos peptid (ChTX (charybdotoxin), MgTX (margatoxin), stb.) és nem-peptid jellegű (TEA, 4-AP) K⁺ csatornagátlószerre kis mértékben vagy egyáltalán nem érzékenyek. A csatornák aktiválása a legkülönbözőbb szignálok hatására jöhet létre, melyek közül említést érdemel az intra- és extracelluláris pH módosulása, a membrán telítetlen/telített zsírsavainak arányának megváltozása, valamint a mechanikai feszülés [59, 60], [104]. Feltételezhető élettani szerepük a nyugalmi membránpotenciál kialakításában és fenntartásában van, ezek a csatornák tehetők felelőssé az ún. „szivárgási” áramért.

Az általunk vizsgált TASK-1 és TASK-3 csatornákra egyaránt jellemző, hogy rendkívül érzékenyek az extracelluláris pH fiziológiás tartományán belül történő, relatíve kis változásokra, mely a szelektivitási szűrő közelében található hisztidin (H89) protonálódásának tulajdonítható [61], de a pH-szenzitivitáshoz két másik aminosav is hozzájárul kisebb mértékben (H72, K210), mindkettő az extracelluláris hurkokon helyezkedik el [62]. Az extracelluláris savasodás $pK=7,3$ és $1,6$ Hill koefficiens értékekkel gátolja a TASK-1 csatornát, míg a sejten belüli pH-változások nem befolyásolják a csatornaaktivitást. A gátlás feszültségfüggetlen, ami azt valószínűsíti, hogy a protonszensor a transzmembrán elektromos mezőn kívül helyezkedik el [63]. A TASK-3 a TASK-1 csatornánál kevésbé érzékeny savasodásra, $pH=7,4$ -ig aktív, $pK=6,7$ és $1,8-2$ Hill koefficiens értékeknél gátolt. A TASK-1-hez hasonlóan a H89 hisztidin aminosavmaradék határozza meg elsődlegesen a pH-szenzitivitást [61, 64].

Az anandamidot eredetileg nagy specificitású TASK-1 csatorna gátlószerként azonosították a K_{2P} családon belül [65], ezért az anandamidot és a methanandamidot rutinszerűen alkalmazták natív szövetekben, glomus sejteken [66], simaizom sejteken, tüdő

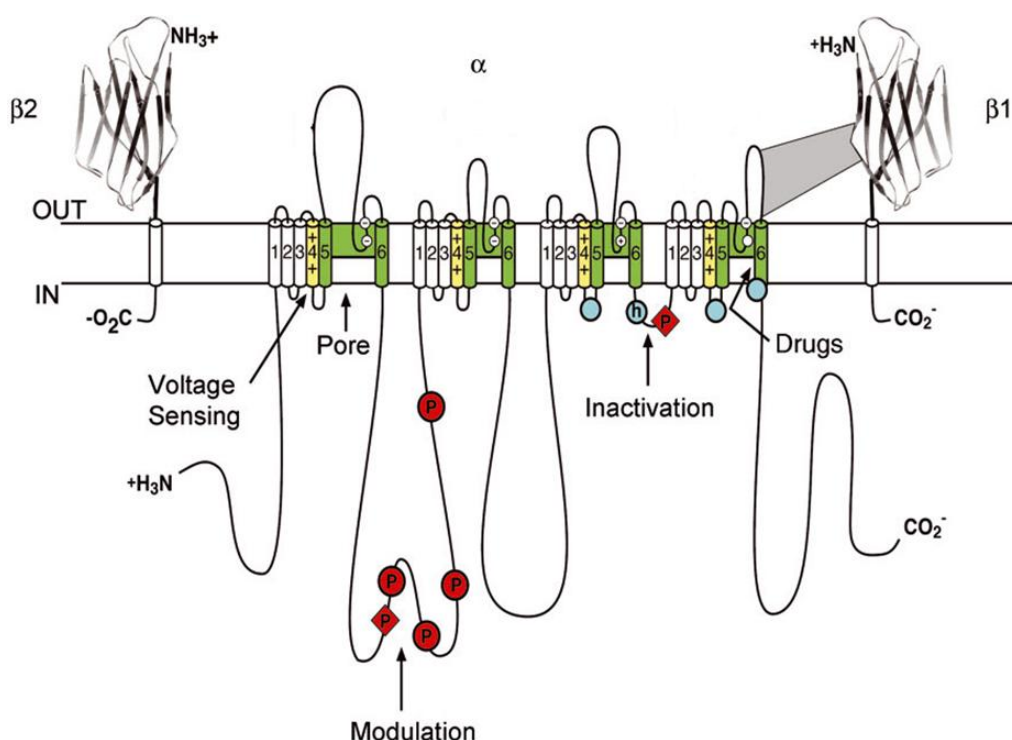
artérián [67] kardiomiocitákon [68] és cerebelláris szemcsesejteken kifejeződő TASK-1 csatornák azonosítására. Azonban egy későbbi tanulmány megcáfolta a specificitást; az anandamidot és methanandamidot is TASK-1 és TASK-3 gátlószerek találták különböző fajokban [69-71], ezért a TASK alcsaládban a (meth)anandamid nem tekinthető specifikus, csatornákat megkülönböztető farmakológiai eszköznek, ellentétben a ruténium vörössel, amely az eddig vizsgált fajokban csak a TASK-3 csatornát gátolta [70, 72], [73], [74, 75]. Érdeemes megemlíteni, hogy hasonló koncentrációkban alkalmazott endocannabinoid származékok a TASK-1 és TASK-3 csatornákat gátolják, azonban más ioncsatornák működését is módosítják, pl. a tetrodotoxin (TTX)-szenzitív Na⁺ csatornákat [76], a vanilloid receptort (TRPV1) [77], a T-típusú Ca²⁺ csatornát [78], és a Shaker-típusú K⁺ csatornákat is [79, 80].

1.3 A dentritikus sejtek (DC-k) és ioncsatornáik, az Nav1.7 ioncsatorna

A kórokozókkal szembeni első védelmi vonalat a veleszületett immunrendszer biztosítja, amely nem specifikus, és csak rövid távú védeltséget biztosít a gazdaszervezet számára. A veleszületett immunrendszer azonban döntő szerepet játszik az adaptív válasz aktiválásában, amely a specifikus kórokozók ellen specializált sejtekkel rendelkezik, és immunológiai memóriát is létrehoz [81]. A dendritikus sejtek (DC-k) fontos szereplők a veleszületett és az adaptív immunitás összekapcsolásában: képesek antigének felismerésére és feldolgozására, továbbá az immunitás beindítása érdekében a nyirokszervekbe vándorolnak, és képesek differenciálódni, gyorsan reagálni a különböző ingerekre [82]. A hagyományos DC-k a makrofágok közös progenitorból két független útvonalon keresztül differenciálódnak CD11c⁺ prekurzorokká, CD1a molekulát expresszáva, vagy anélkül [83, 84]. A CD1a egy 1-es típusú membránfehérje, amelyet a saját vagy kórokozótól származó módosított lipidek stabilizálnak, hogy aktiválják a CD1a-restrikált T-limfocitákat [85-87]. A CD11c⁺ CD1a⁻ DC különböző szövetekbe, mint intersticiális DC jelenik meg, míg a CD11c⁺ CD1a⁺ altípus Langerhans-sejtekké differenciálódik a hámfelszínen [88]. A DC-k a perifériás szövetekben a gyulladás, antigének, kórokozók vagy metabolitok által generált mikrokörnyezeti faktorok hatására monocitákból is differenciálódhatnak [89]. A monociták CD1a⁻ és CD1a⁺ DC-vé történő *in vitro* differenciálódásához a sejtek túlélését támogató granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) és a sejtek differenciálódását irányító IL-4 szükséges [90]. Ezek a DC-alcsoportok éretlen szöveti DC (IDC) jellegzetességeket mutatnak, és stimuláló jelek hatására tovább aktiválhatók. Kimutatták, hogy a CD1a⁻ és CD1a⁺ DC-alcsoportok különböző

funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek, és képesek a T-sejtek polarizációját tolerogén, illetve immunogén irányba eltolni [91]. Az IDC-k drasztikus funkcionális és fenotípusos változásokon mehetnek keresztül az antigénnel történő találkozás és az ezzel járó „danger-signal”-ok hatására, ami az érett DC (MDC) felé történő átmenetet eredményezheti. Aktiválódásukkor az MDC-k a nyirokcsomókba vándorolnak, és professzionális antigénprezentáló sejtekként (APC) működnek, hogy a naiv antigén (Ag)-specifikus T-sejteket gyulladásoz vagy tolerogén irányokba tereljék és polarizálják [92].

Számos jelátviteli útvonal függ a DC intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjától, amelyet különböző ioncsatornák szabályoznak: RyR1 receptorok, P2Y receptorok, L-típusú kalciumcsatornák és a CRAC [93-96]. A feszültség-kapuzott káliumcsatornák segítenek fenntartani a hatékony Ca^{2+} jelátvitelhez szükséges negatív membránpotenciált ezekben a sejtekben [97]. Az immunsejtek differenciálódása során a VGPC (voltage-gated potassium channel) expressziója megváltozhat, ami arra utal, hogy jelentős hatással vannak a különböző sejtfunkciókra. A kizárólag a központi idegrendszerben található mikroglia sejtek több VGSC-t (voltage-gated sodium channel) expresszálnak, amelyek szerepet játszanak a sejt migrációban és a fagocitózisban [98]. Azt is



5. ábra. A feszültség-kapuzott nátrium csatornák szerkezete. A VGSC egyetlen polipeptidlánc, amely négy kvázi azonos doménből áll. Mindegyik domén hat transzmembrán alfa-helikális szegmenssel (S1-S6) rendelkezik [1].

leírták, hogy a nátriumcsatornák a makrofágok és mikroglia aktivációja és fagocitózisa során játszanak szerepet, ami a nátriumcsatorna-blokkolók anti-inflamatorikus hatását sugallja [99].

A feszültség-kapuzott nátrium csatornák (VGSC) egyetlen, körülbelül 260 kDa tömegű polipeptidláncból (α -alegység) állnak, amelyhez egy vagy több β -alegység társulhat [100]. Ez utóbbiak nem szükségesek a csatorna kifejeződéséhez, azonban módosítják a csatorna kapuzásának kinetikáját és feszültség-függését [101]. Az α -alegység négy homológ domént tartalmaz, és mindegyik hat alfa-hélixből (szegmensek, S) áll, amelyek a plazmamembránon átívelnek. A feszültségérzékelő az S4 hélix, amely pozitív töltésű aminosavakat tartalmaz. A csatornák központi pórúsát a négy domén S5-S6 szegmensei és a közöttük lévő pórushurok alkotja (**5. ábra**) [102, 103].

A Nav1.7 csatornát (SCN9A gén kódolja) eredetileg neuronokban írtak le, de azóta kimutatták a DC-ben is [104-106]. Farmakológiai vizsgálatok szerint a Nav1.7 csatorna TTX szenzitív [107]. Neuronokban kimutatták, hogy a Nav1.7 α -alegysége kis depolarizációs eseményeket erősíti, hogy a nyugalmi membránpotenciálhoz közeli küszöbáramok keletkezzenek [108]. Különböző tanulmányok szerint a Nav1.7 szerepet játszhat a fájdalom indukciójában megváltozott expressziója vagy mutáció révén. A Nav1.7 expressziójának és aktivitásának növekedése fokozott fájdalomérzetet eredményez, és az SCN9A gén csendesítésén vagy a Nav1.7 aktivitásának blokkolásán alapuló terápiák a hatékony fájdalomcsillapítás eszközei lehetnek [109]. Sőt, az SCN9A gén túlzott csatornaaktivitást okozó mutációi állhatnak az öröklött fájdalomszindróma, az erythermalgia és a paroxizmális extrém fájdalomzavar hátterében [110]. Egerek csökkent mechanikus, termikus és gyulladáscsökkentő fájdalomra adott válaszokat mutattak, amikor a nociceptív szenzoros neuronokban specifikus SCN9A géndeléciót végeztek [111]. Továbbá a Nav1.7 expressziója fokozódik patofiziológiai körülmények között, például metasztatikus prosztatarákban, ahol számos sejtfolyamat szabályozódik a Nav1.7 aktivitása miatt [112].

1.4 Immunológiai szinapszis és T-sejt aktiváció

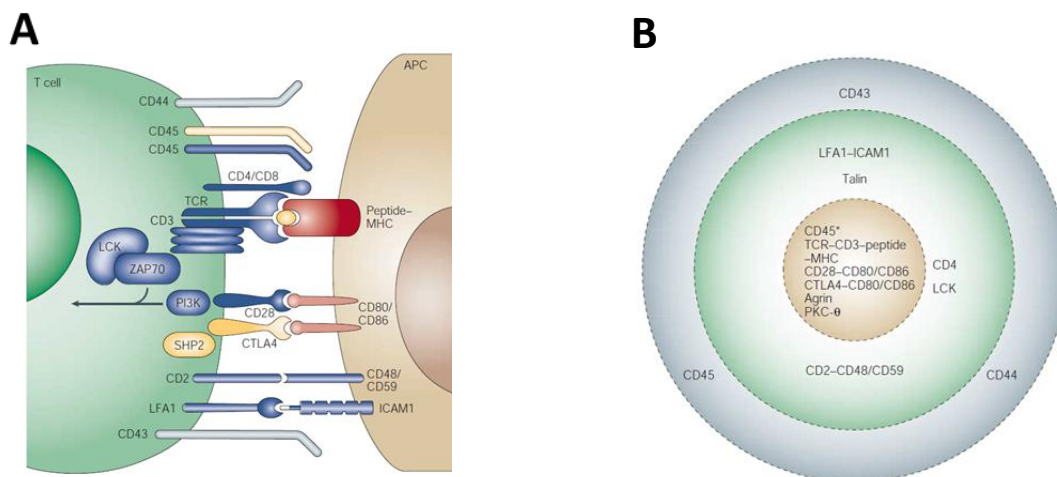
A T-limfociták *in vivo* aktivációja az antigén prezentáló sejtekkel (APC) való találkozás során valósul meg. A T-sejt és az APC közötti fizikai kölcsönhatás különböző jelátviteli kaszkádok elindulását eredményezi, mely a T-sejt polarizációjához vezet: a sejtfelszíni fehérjék, intracelluláris organelumok és jelátviteli molekulák felhalmozódása a T-sejt-APC között létrejövő immunológiai szinapszisban (IS) [113-115]. 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 (**6. ábra**) [116, 117].

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 [118]. 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 [118, 119]. Továbbá egy harmadik, disztális réteget is felfedeztek (d-SMAC), amelyben többek között a CD45 játszik szerepet (**6. ábra**) [120].

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 [117]. 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 potencírozására, valamint elősegíti a T-sejt APC-hez történő kapcsolódását [121, 122].

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 [116]. 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 [116].

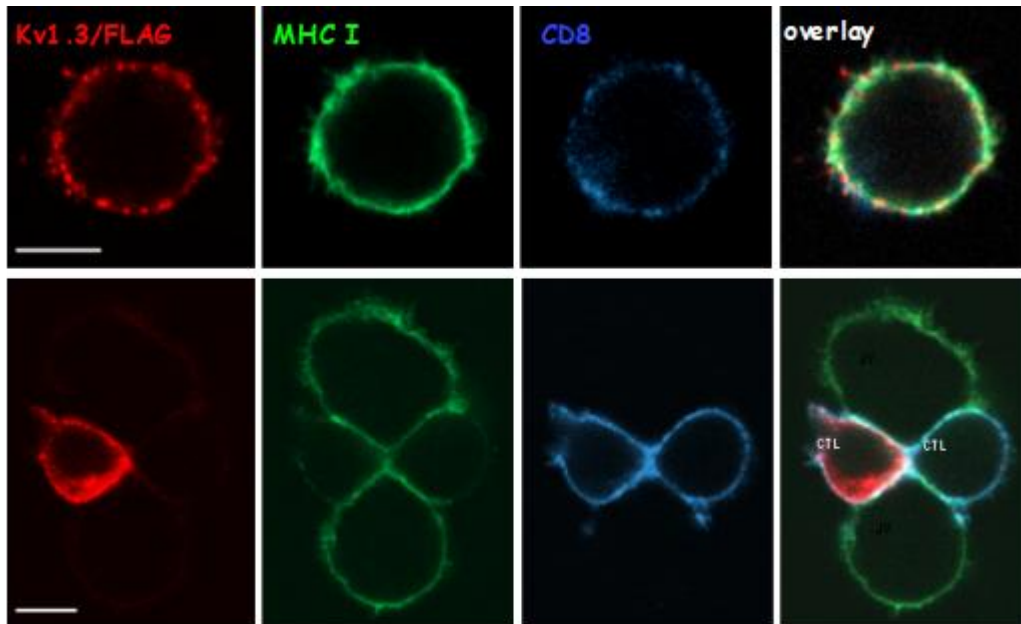


6. ábra. Az immunológiai szinapszis felépítése

1.5 Ioncsatornák az immunológiai szinapszisban

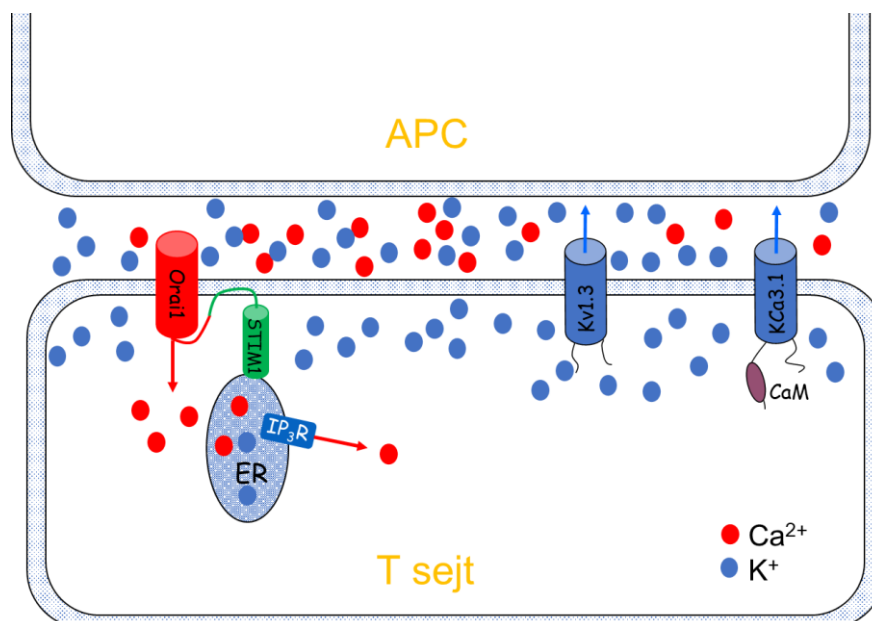
Laboratóriumunkban korábban elvégzett kísérletekkel elsőként igazolták, hogy a FLAG-extracelluláris epitóppal rendelkező, Jurkat sejtekben expresszált Kv1.3 csatornák és a CD3 molekulák átfedő membrán doménekben helyezkednek el, amit keresztkorrelációs számításokkal is igazoltak [123]. Továbbá, ha ugyanezen csatornakonstruktokat citotoxikus T-sejtekben fejezték ki (CTL), akkor azok citotoxikus T-limfociták és komplementer target sejtek között létrejött IS-be rendeződnek át, a csatornák polarizált expressziót mutatnak [124] (7. ábra).

Később más munkacsoportok is megerősítették ezt az eredményt, továbbá leírták, hogy a Kv1.3 csatornák mellett az KCa3.1 csatornák is feldúsulnak az APC-T-sejt kontakt régióban [123-127]. Cahalan és munkatársai kimutatták, hogy a STIM1 és Orai1 fehérjék megjelennek a dendritikus sejt (DC) - T-sejt alkotta pár immunszinapszisában [128]. A csatornafunkció és a Ca^{2+} -szignál nem játszik kulcsszerepet a szinapszis kialakulásának kezdeti szakaszában, a Kv1.3 vagy a CRAC csatornák gátlása nem befolyásolja a molekulák klaszterekbe rendeződését [125, 126, 128], azonban a Ca^{2+} -beáramlás gátlása növekvő



7. ábra. Kv1.3/FLAG átrendeződése az immunológiai szinapszisba. Nyugalomban lévő citotoxikus T sejtek (CTL) teljes membránján a Kv1.3 csatornák folszerű elrendeződést vesznek fel (felső sor), míg target sejtrel immunológiai szinapszisba kerülve a csatornák a két sejt közötti kontaktrégióban dúsulnak fel (alsó sor; skála: 5 μ m).

intracelluláris Ca^{2+} -puffereléssel kombinálva hatással van a szinapszis hosszú távú stabilitására. Így a CRAC csatorna szinapszisba történő vándorlása, ahol különböző receptorok, adhéziós és kostimulációs molekulák is akkumulálódnak, az antigénstimuláció hatására bekövetkező hosszú távú Ca^{2+} -függő jelátviteli szabályozásban játszhat szerepet.

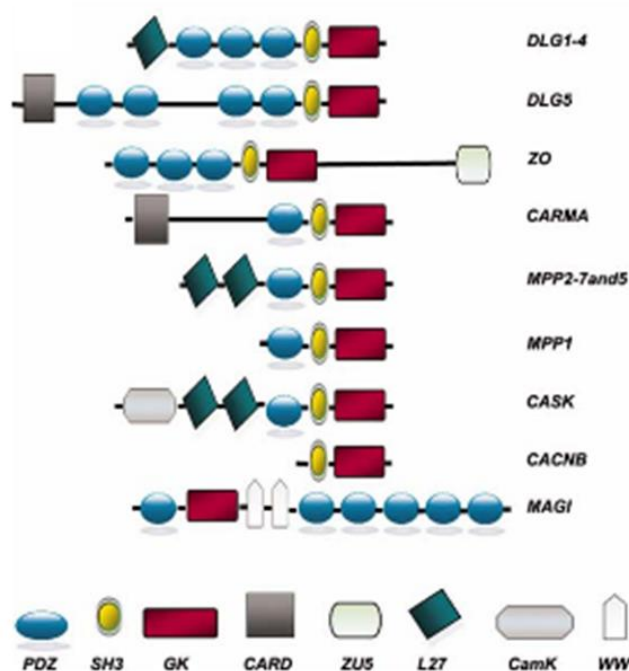


8. ábra. Ioncsatornák az IS-ben. Kv1.3, KCa3.1, STIM1+Orai1 = CRAC az immunológiai szinapszisban, a T-sejt-APC interfésznél [2].

A CRAC csatornák szinapszisban történő feldúsulása a Ca^{2+} influx által lokálisan nagy intracelluláris, és kis extracelluláris Ca^{2+} -szintet eredményez. A Kv1.3 és KCa3.1 csatornák jelenlétének eredményeképpen K^+ efflux jön létre, ami a K^+ -ionok koncentrációját intracellulárisan lecsökkenti, az extracelluláris térben pedig megnöveli, azaz az APC és T-sejt közötti szinaptikus résben lokális K^+ -koncentráció-emelkedés jön létre, ami a T-sejt membránjának depolarizációját eredményezi [129] (**8. ábra**).

1.6 MAGUK fehérjecsald, cortactin és HS1

A membrán-asszociált guanilát-kinázok (MAGUK) egy széles körben expresszáldó, a neurológiai szinapszisok kialakulásában alapvető fontosságú fehérjecsaldot alkotnak. Tíz alcsaldot azonosítottak a jellegzetes doménjeik DNS szekvenciái alapján. Ezek az alcsaldok a következők: (DLG1-4), disc large 1-4 (DLG1-4), disc large 5 (DLG5), zona occludens (ZO), caspase recruitent domain containing MAGUK protein (CARMA), membrane protein palmytoilált 1 (MPP1), membránfehérje palmytoilált 2-4 (MPP2-4), membrán protein palmytoilált 5 (MPP5), kalcium/kalmodulin-függő szerin protein kináz 3 (CASK), kalcium csatorna β alegység (CACNB) és MAGUK invertált ismétléssel (MAGI) [130]. (**9. ábra**, [131]). DLG, MPP, CASK, CACNB és MAGI fehérjék elsősorban a központi idegrendszerben fejeződnek ki, és a neuronális szinapszisok kialakulását és működését szabályozzák [132-135]. A ZO alcsald tagjai fontos szerepet játszanak a vér-agy gát fenntartásában, míg a CARMA fehérjék



9. ábra. MAGUK fehérje alcsaldok felépítése a doménszerkezet alapján.

különböző szövetekben expresszálódnak, ahol szabályozzák az antitestfelismerést és a gyulladást a vérképző sejtekben [136] [137].

Post-synaptic density protein-95 (PSD-95) és a szinapszis asszociált fehérje 97 (SAP97) a DLG1-4 alcsaládba tartozik, és széles körben tanulmányozták őket neuronokban [138]. Nevének megfelelően a PSD-95 elsősorban a poszt-szinaptikus zónában (PSD) fejeződik ki, míg az SAP97 a preszinaptikus és axonális régiókban található meg, valamint három PDZ (PSD-95, Dlg és ZO-1) doménből, egyetlen SH3 és egy GK doménből állnak (**9. ábra**) [139]. Kimutatták, hogy a SAP97/PSD-95 számos partnerrel lép kölcsönhatásba a fehérje-fehérje interakciós doménjein keresztül (PDZ/SH3 illetve a célfehérje C terminálisán lévő (X-T/S-X-V/I) motívum), beleértve a membrán ioncsatornáit és a citoszolikus fehérjéket [21, 140-143]. Úgy tűnik, hogy e kölcsönhatás célja a receptorok/ioncsatornák klasztereződésének/kihorgonyzásának szabályozása. Másrészt lehetséges, hogy a PSD-95 és a SAP97 az intracelluláris jelátvitel kulcselemei is. Különböző fehérjékről, köztük a guanilát-kináz-asszociált fehérjéről (GKAP) kimutatták, hogy kölcsönhatásba lépnek a DLG fehérjék GK-doménjével, ami arra utal, hogy szerepet játszhatnak egy szignalizációs-komplex létrehozásában azáltal, hogy különböző szignálfehérjéket horgonyoznak le, így tartva őket közel egymáshoz bizonyos helyeken [144]. Továbbá azt is leírták, hogy a SAP97 és a PSD-95 adapter fehérjék akkumulálódnak az immunológiai szinapszisban, bár az előbbi 15 perc után csökkent felhalmozódást mutat T-sejtek és CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakult IS-ben [145].

Az aktin citoskeleton szerepet játszik különböző fehérjék, köztük a TCR szállításában és az IS-ben történő kihorgonyzásában [146-148]. Számos tanulmány számolt be arról, hogy a Kv1 családba tartozó csatornák aktinhoz való kötődését aktinkötő doménnel rendelkező adapterfehérjék biztosítják: PDZ-kötő fehérjék, mint például a hDlg1 (disc large 1) és a cortactin. A cortactin és a PDZ fehérjék Kv csatornákhöz való kötődése a csatorna C-terminális régiójában történik: a cortactin kötődése a Kv1.2 csatornáknál egy 19 aminosav hosszú szekvencián keresztül valósul meg, a PDZ kötődés pedig a Kv1.3 és Kv1.4 csatornáknál egy TDV aminosav motívumhoz történik [149-151]. Emellett a Src homológia 3 (SH3) domén, amely megtalálható a cortactinon és a PDZ fehérjéken, szintén szerepet játszhat e fehérjék kölcsönhatásaiban, mivel az SH3 kötő domén a Kv1.4 csatorna PDZ fehérjék által indukált klaszterizációjában szerepet játszik, és összefüggésbe hozták a Kv1.3 áram modulációjával is [150, 152]. A T-sejtek expresszálják a HS1 (hematopoetikus sejt vonal specifikus fehérje 1)

cortactin ortológot és a PDZ-kötő fehérjéket (hDlg1/SAP97 és PSD-95), amelyek képesek komplexeket képezni az aktinnal és több Kv csatornához is kötődni [145, 153, 154]. A HS1-ről T-sejtekben kimutatták, hogy szükséges az F-aktin felhalmozódásához az IS-ben, és a megfelelő jelátvitelhez az IS kialakulása után [155, 156]. Így feltételezhető, hogy az aktinnal való kölcsönhatás stabilizálja a Kv1.3 kompartmentalizációját az IS-ben az SH3- vagy PDZ-kötőmotívumon keresztül.

1.7 A sejtmembrán szerkezete, lipid raftok, koleszterin szerepe

A sejtmembrán kettős feladattal bír: egyrészt fizikai barrierként védi és elhatárolja a citoszólt és az intracelluláris kompartmenteket a külső környezettől, ugyanakkor lehetőséget nyújt az extra és intracelluláris terek (sejtek) közötti kommunikációra azáltal, hogy megfelelő platformot teremt a transzporterek, jelátviteli molekulák számára. A tudomány jelenlegi állása ebből kiindulva a sejtmembránt egy dinamikus struktúraként értelmezi, ahol azonban a lipid kettősrétegen belül elkülönülnek bizonyos kisméretű, heterogén, koleszterinben és szfingolipidben gazdag domének, melyeket lipid-raftoknak vagy lipid-tutajoknak nevezünk [157]. A membrán raftok feltételezett szerepe a sejtmembránon keresztül lejátszódó transzport és szignalizációs folyamatokban részt vevő molekulák kompartmentalizációja, valamint a sejtmembrán laterális szervezethez való biztosítása [158]. A raftok jelenlétét kimutatták a neuronok közötti szinapszisokban, valamint az immunológiai szinapszisban is [159-161].

A sejtmembrán lipid komponensei közül nagy jelentőséggel bír a koleszterin. A membránokat kialakító lipid kettősrétegekben a koleszterin planáris része és a foszfolipidek zsírsavdalláncai között erős kölcsönhatás alakul ki, ami miatt a szénhidrogénlánc csak egy másik oldali lipid apoláris csoportjaihoz tud kapcsolódni. A poláros feji rész pedig a foszfolipidek hidrofil részeivel alakít ki hidrogénkötéseket. Az erős kölcsönhatások következtében a fázisátalakulási hőmérséklet felett a koleszterin növeli a membránok mechanikai szilárdságát, ugyanakkor csökkenti a fluiditást. A koleszterin a szfingolipidek szénhidrátláncai között hasonló mechanizmussal, mintegy dinamikus „ragasztóként” működve biztosítja a raftok integritását [162]. A koleszterin kivonása a raftokból azok disszociációjához és a raft fehérjék funkcióvesztéséhez vezet [163, 164]. A lipid tutajok és a membránfehérjék közötti kapcsolat háromféle lehet: 1.) a fehérjék egy részének működése rafthoz kötött, 2.) egy másik részük működése teljesen független a raftoktól 3.) a harmadik

csoport tagjai pedig megtalálhatóak mind a raftokban, mind pedig azokon kívül. Az általunk vizsgált Kv1.3 ioncsatorna a lipid-raft asszociált fehérjék családjába sorolható [165].

1.8 A koleszterin szerepe az ioncsatornák működésének szabályozásában

Az utóbbi években egyre több tanulmány hangsúlyozta a koleszterin szerepét az ioncsatorna-működés szabályozásában [166-169]. Az ioncsatornák szerkezeti és funkcióbeli sokszínűsége miatt azonban a koleszterin eltérő módon befolyásolja a különböző csatornák működését. Míg a koleszterinszint növelésének legáltalánosabb hatása a csatornák aktivitásának (nyitási valószínűség, vezetőképesség) koncentrációfüggő csökkenése, melyet számos K^+ csatorna mellett feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornára is kimutattak [170-172], addig a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák esetében a koleszterin kivonása a membránból gátolta a csatornák működését [173]. Más csatornák esetében a koleszterin a kinetikai és egyensúlyi aktivációs paraméterekre van hatással [174-176].

A koleszterin ioncsatornákra kifejtett hatását két eltérő elmélettel magyarázzák. Az első a koleszterin és az ioncsatornák direkt és specifikus lipid-fehérje kölcsönhatását valószínűsíti. A koleszterin részt vesz annak a lipidekből álló „övnek” vagy „buroknak” a kialakításában, ami közvetlenül az ioncsatorna körül helyezkedik el. [177, 178] Az övet alkotó lipid molekulák kapcsolatba kerülnek az ioncsatornák transzmembrán héliceinek sejtmembránnal határos régióival, melyek a lehetséges lipid kötő szekvenciákat tartalmazzák. Az elmélet szerint a lipid öv koleszterin koncentrációjának változása a koleszterin és a csatorna ligand-receptor kölcsönhatásainak befolyásolásán keresztül módosíthatja az ioncsatornák konformációját és vezethet a biofizikai paraméterek megváltozásához. A lipid öv betüremkedhet a transzmembrán hélixek találkozásánál kialakuló árkokba, növelve a lipid-fehérje kölcsönhatásokhoz szükséges határfelületek felszínét [179]. A betüremkedéseknek köszönhetően a lipid környezet a transzmembrán domének által határolt pórusra is hatással lehet. Az elmúlt évek kutatásai olyan új kötőhelyekre mutattak rá, melyek nem a klasszikus értelemben vett lipid-fehérje határfelületen helyezkedtek el, hanem az intracelluláris C- vagy N-terminálison [180, 181].

Több olyan általános koleszterinkötő szekvenciát is azonosítottak, mely alapján feltételezni lehet egy transzmembrán fehérje koleszterinnel szembeni érzékenységét [168, 182, 183]. Ezek közül a legelsőként leírt és legjelentősebbnek tartott a CRAC és CARC szekvencia. A CRAC (cholesterol recognition amino acid consensus motif, koleszterin felismerő

aminosav motívum) szekvencia egy nagyon egyszerű algoritmust követ: az első tagja egy elágazó láncú apoláris aminosav (leucin vagy valin), melyet egy-öt darab tetszőleges aminosav követ, majd egy aromás tirozinon keresztül ismét egy-öt tetszőleges aminosav vezet a szekvenciát záró pozitív töltésű aminosavhoz (lizin, arginin) [184]. A CRAC-hoz nagyon hasonló CARC szekvencia az előbbi inverze, ahol a sort egy pozitív aminosav indítja, az aromás aminosav pedig a tirozin mellett fenilalanin is lehet [183]. Az algoritmus egyszerűségéből adódóan CRAC/CARC szekvenciával rendelkező fehérjék szterolérzékenységet megfelelő szkepcitizmussal, csupán prediktív jelleggel lehet felhasználni [182]. Azonban nem lehet figyelmen kívül hagyni azokat az eredményeket, ahol ezen szekvenciák egyszerű pontmutációja vagy deléciója teljesen megváltoztatta a vad-típusú csatornára jellemző koleszterin iránti érzékenységet [180, 181, 185].

Más megközelítésében a koleszterin a sejtmembrán általános fizikai paramétereit megváltoztatva képes az ioncsatornák működésének befolyásolására [186, 187]. A transzmembrán fehérjék és a lipid kettősréteg hidrofób részei eltérő átmérőjének következtében a fehérje perturbálja a környező lipideket, megváltoztatva a kettősréteg vastagságát, rendezettségét. A lipid réteg úgy fog igazodni, hogy lokális vastagsága megegyezzen a transzmembrán fehérje hidrofób szakaszával [188]. Ezen nyugalmi állapot megváltoztatása energiaigényes folyamat. A fehérjék konformációváltozás során deformálják a környező lipid kettősréteget, és minél nagyobb a membrán ellenállása, annál több energia kell ahhoz, hogy a folyamat kivitelezhető legyen [189]. A lipidkörnyezet fizikai paramétereinek változtatása a folyamat energetikai szükségleteit megváltoztatva módosíthatja a molekuláris mozgásokat. A koleszterinmolekulák hatással vannak a membrán fluiditására, vastagságára, permeabilitására, a membránfehérjék laterális diffúziójára, így ezeken keresztül befolyásolhatják az ioncsatornák konformációváltozásának valószínűségét, kinetikai és egyensúlyi jellemzőit [176, 190, 191] [187]. A két modell nem zárja ki egymást, azonban az egyes mechanizmusok szerepe csatornakként eltérő jelentőségű lehet. A két hatás elkülönítése egy adott csatorna esetén kihívás elé állítja a kutatókat [192]. Az elkülönítés egyik lehetséges módszere olyan koleszterin analógok vizsgálatán alapszik, melyek sejtmembrán szerkezetére gyakorolt hatása hasonló a koleszterinhez, azonban a receptor-ligand kölcsönhatások során nem tudja helyettesíteni azt [168]. Az epikoleszterin és ent-koleszterin két olyan királis koleszterin analóg, amelyek kisebb fenntartásokkal ugyan [193], de

megfelelnek a fenti kritériumoknak [194]. Míg a koleszterin csökkenti a Kir2.1 csatorna áramsűrűségét, addig az epikoleszterin növeli azt, specifikus lipid-fehérje kölcsönhatást valószínűsítve [195]. Hasonló koleszterin analógokkal szembeni sztereo-specificitást publikáltak KCa1.1 és TRPV1 (Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1) csatornák esetén [185, 196], míg az nAChR (nikotinerger acetilkolin receptor) vagy VRAC (volumen regulált anion csatorna) csatornák esetén nem volt eltérés az optikai izomerek és a koleszterin hatásában [197, 198].

1.9 A koleszterinhomeosztázisban fellépő zavar betegségek kialakulásához vezet

1.9.1 A koleszterin bioszintézis zavarának prototípusa: Smith-Lemli-Opitz szindróma

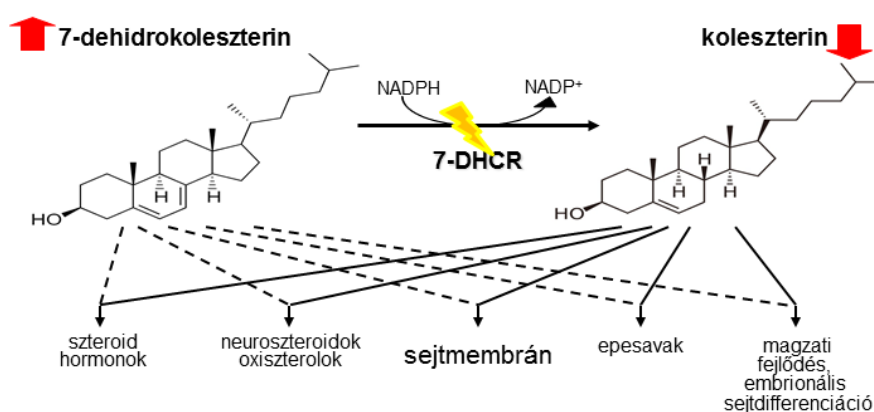
Az elmúlt harminc évben több malformációs szindrómáról (Smith-Lemli-Opitz szindróma, lathosterolosis, desmosterolosis) derült ki, hogy a betegség hátterében a szterolszintézis örökletes zavara áll [199]. Ezek közül a legelsőként leírt a Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLOS), mely nevét a betegséget 1964-ben leíró orvosokról kapta [200]. Az SLOS autoszomális recesszíven öröklődő, monogén, malformációs szindróma [201]. A szindrómát az endogén koleszterin bioszintézis 7-dehidrokoleszterin-reduktáz enzim (7DHCR) veleszületett zavara okozza [202, 203]. Az enzimdefektus a koleszterinszint csökkenése mellett a koleszterinszintézis prekursor molekuláinak (főleg 7-dehidrokoleszterin (7DHC) és izomere, a 8-dehidrokoleszterin) emelkedett szintjéhez vezet a vérplazmában és a sejtmembránban egyaránt [204]. A folyamat eredményeképpen megváltozik a lipid-raftok és a membránok szerveződése, zavart szenvednek különböző szignáltranszdukciós útvonalak, illetve a koleszterin mint univerzális prekursor molekula (epesavak, neuroaktív szteroidok, szteránvázas hormonok) sem tudja maradéktalanul ellátni feladatát (**10. ábra**) [205]. Továbbra is nyitott kérdés azonban, hogy a tünetek kialakulásáért elsődlegesen a koleszterin hiánya vagy a prekursor molekulák toxikus hatása tehető felelőssé.

A betegség tünettana és megjelenése szerteágazó, az arc és a fej-nyak régió gyakori fejlődési rendellenességei és neurológiai eltérések mellett szinte minden szervrendszer érintett lehet [205]. A klinikai tünetek alapján felmerülő SLOS gyanút a szérumban koleszterin csökkenése és emelkedett 7DHC szint igazolhatja, további bizonyítást a molekuláris genetikai vizsgálat ad [205]. A 7DHCR több mint 130 különböző mutációját azonosították, de a genotípus-fenotípus között nincs szoros összefüggés, azaz ugyanazon mutáció vezethet enyhe vagy súlyos rendellenességhez is [206]. A betegség kezelésére jelenleg csak tüneti terápia áll

rendelkezésre. Orális koleszterin szubsztitúció hatására a viselkedési problémák és a hallásfunkciók javulását, a fényérzékenység és a fertőzések csökkenését tapasztalták [207]. Antioxidáns kezelés, valamint statin terápia a szterol prekursorok toxicitásának mérséklésén keresztül lehet hatásos [208]. A kezelések hatásosságáról megoszlanak a vélemények, ugyanis a randomizált, placebo kontrollált klinikai tanulmányok vagy hiányoznak, vagy nem támasztják alá a nem standardizált tanulmányokban talált eltéréseket [209, 210].

1.9.2 Hiperkoleszterinémia és annak immunológiai vonatkozásai

A koleszterinnel kapcsolatos betegségek másik, széles körben is ismert spektrumát a zsírsavcsere koleszterinszint-emelkedéssel járó zavarai képviselik. A hiperlipidémiák során kialakuló hiperkoleszterinémia (HC) csak tünet, melynek hátterében 3 fő ok állhat: a



10. ábra. Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLOS) A sejtekben a 7-dehidrokoleszterin reduktáz (7-DHCR) mutációja következtében csökkenő koleszterin és emelkedő 7-dehidrokoleszterintartalom komplex sejtbiológiai és élettani hatásokkal jár.

kedvezőtlen étrend és életmód által kiváltott anyagcsere-túlterhelés, betegségek vagy gyógyszerek hatására kialakuló szekunder anyagcserezavarok, valamint a zsírsavcsere primer, örökletes zavarai [211]. A hiperkoleszterinémia következménye az etiológiától, beosztástól függetlenül szisztémás érlemezés és következményes szívinfarktus, agyi infarktus vagy perifériás érelzáródás lehet [212, 213]. A hiperlipidémiák sikeres kezelésének alapját a megfelelő diéta és életmódváltás jelentheti, mely legtöbb esetben kiegészül a hydroxy-metil-glutanyl-CoA-t (HMGCoA) szelektíven gátló statin készítmények alkalmazásával [214]. Az elmúlt évek során intenzív alap kutatások zajlottak az érlemezés patogenezisének, molekuláris és sejt szintű történéseinek feltárására [215, 216]. A jelenleg legelfogadottabb hipotézis szerint az érlemezés az endotél sejtek különböző eredetű

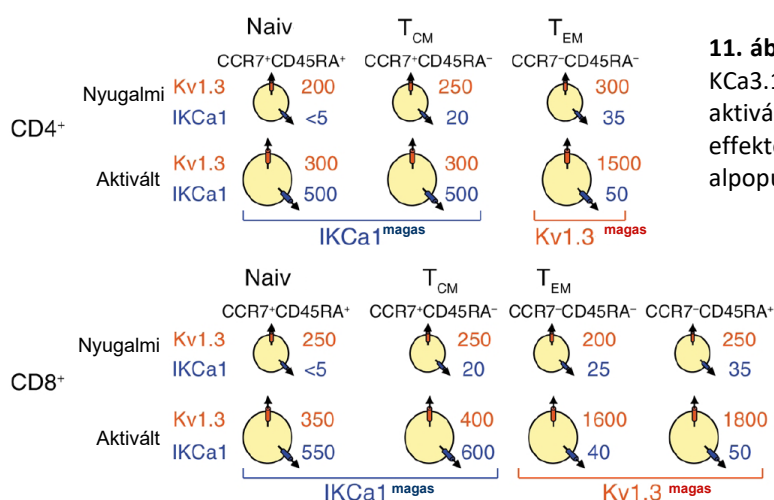
(mechanikai stressz, anyagcsere betegségek, fertőzések, dohányzás) károsodására adott krónikus gyulladós válaszreakciója, mely fenntartásában kiemelt szerepet játszanak az érfalba lerakódó lipid (köztük koleszterin) molekulák [211, 217]. A károsodott endotél által termelt gyulladós faktorok aktiválják a veleszületett és a szerzett immunrendszer sejtjeit, melyek az osztódó simaizomsejtekkel közösen vesznek részt a főleg koleszterinnel telített ateroszklerotikus plakkok kialakításában [217]. A plakk nemcsak elzárhatja az ereket, de a leszakadó törmelékek mikroembóliákat okozhatnak, a plakk alatti meggyengült érfalban pedig gyakran alakul ki aneurizma, melynek megrepedése súlyos vérzéssel járhat [211]. Úgy tűnik, hogy a T-sejtek kiemelt szerepet játszanak az érlemezésedés gyulladós folyamataiban [218]. Érlemezésedésben szenvedő betegek és modellállatok vizsgálata egyaránt alátámasztotta az aktivált T-sejtek jelenlétét az ateroszklerotikus plakkokban [219-221]. A T-sejtek jelentős része oxidált LDL partikulumokra volt specifikus [219]. Hiperlipidémiás állatmodellekben a CD4⁺ limfociták depléciója csökkentette az érlemezésedés progresszióját [222], immunhiányos SCID egerekben az immunológiai funkciók helyreállítása viszont felgyorsította a folyamatot [223]. Fontos észrevétel, hogy az érlemezésedéshez vezető állapotok befolyásolják az immunrendszer normál működését is, többnyire csökkentve a szervezet ellenálló képességét különböző kórokozókkal szemben [224, 225]. Hiperkoleszterinémia hatására megemelkedik a limfociták sejtmembránjának koleszterintartalma [226]. A mesterségesen előidézett hiperkoleszterinémia állatkísérletekben negatívan befolyásolta a Kv ioncsatornák által ellátott élettani funkciókat [227, 228].

1.10 A Kv1.3 csatorna az autoimmun betegségekben

Egészséges sejtekben a Kv1.3 csatornák feldúsulásának folyamatos növekedése figyelhető meg az immunszinapszis képződés alatt, míg az SLE-s (systemás lupus erythematosus) sejtekben a Kv1.3 ioncsatorna az IS képződés korai szakaszában elhagyja a szinapszist. Ez a lecsökkent tartózkodási idő az IS-ben bizonyítottan hozzájárul a T-sejt magasabb citoszolikus Ca²⁺ szintjének kialakulásához, mely az SLE-s T-sejtek hiperaktivitását okozhatja [229]. Továbbá a Kv1.3 esetében azt is leírták, hogy a csatorna IS-be történő diffúziójának gátlása antitest-keresztkötéssel a CD3-CD28 indukált Ca²⁺ jel módosulását eredményezte az immunológiai szinapszisban [230]. A megváltozott Kv1.3 lokalizáció fontos pathofiziológiai következményekkel is bírhat. Ezen felül szintén kiderült, hogy SLE-s

betegekből származó T-sejtekben a Kv1.3 csatorna farmakológiai gátlásával az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedése elmarad, tehát az autoreaktív sejtek Ca^{2+} -függő útvonalának gátlása érhető el [231]. A Ca^{2+} kulcsszerepet játszik a transzkripciós faktorok aktivitásának szabályozásában, amelyek a citokintermelést és proliferációt is irányítják. A Ca^{2+} -válasz amplitúdója és időtartama meghatározza a transzkripciós faktor-aktivitás specificitását, így a génexpressziós mintázatot. Az SLE-s T-sejtekben kimutatták, hogy a Ca^{2+} -válasz sokkal kifejezettebb, és tovább fenntartott, mely a nagyobb mértékű NFAT transzlokációhoz vezet [230].

A különféle autoimmun betegségek, mint pl. sclerosis multiplex, reumatoid arthritis, 1-es típusú diabétesz mellitusz esetében a betegség pathogenezisében az autoreaktív effektor memória T-sejtek játszanak szerepet ($\text{CCR7}^-/\text{CD45RA}^{+/-}$). A naiv T-sejtek, egy adott antigén stimuláció hatására differenciálódnak centrális memória T-sejtekké (T_{CM}), majd további antigén stimulust követően T_{EM} sejtekké. Chandy és munkatársai kimutatták, hogy az említett betegségekben szenvedő páciensekben az aktivált, beteg szöveti környezetből izolált effektor memória T-sejtekben a Kv1.3 expresszió sokkal magasabb, mint a naiv és centrális memória T-sejtekben (kb. 1500/sejt) [13] (11. ábra). Ezzel szemben az IKCa1/KCa3.1 csatornák száma sokkal alacsonyabb az aktivált T_{EM} -ben, mint az utóbbi kettőben. Továbbá, a naiv ($\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$) és centrális memória T-sejtek (T_{CM} ; $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$) esetén a mitogén indukált proliferáció a Kv1.3 csatornák expressziójának enyhe (kb. 250/sejt \rightarrow 400/sejt) ugyanakkor az IKCa1/KCa3.1 csatornák expressziójának jelentős fokozódásával (8-10/sejt \rightarrow 500/sejt) jár együtt.



11. ábra Átlagos, sejtenkénti Kv1.3 és KCa3.1/IKCa1 csatornaszám nyugvó és aktivált CD4^+ és CD8^+ centrális és effektor memória T sejt alpopulációkon.

Azaz a T_{EM} sejtek, valamint a nyugalomban lévő összes említett T-sejt membránpotenciálját döntően a Kv1.3 ioncsatornák szabályozzák, míg a naiv és T_{CM} T-sejt alpopulációban az IKCa1/KCa3.1 a domináns. A Kv1.3 nagy affinitású gátlószerei (pl. ShK toxin, $IC_{50} \sim 100$ pM [232]) a T_{EM} sejtek osztódását specifikusan gátolták, ugyanis a Kv1.3-blokkolás mediált proliferáció-gátlás alól a nyugvó (naiv) és T_{CM} sejtek az IKCa1/KCa3.1 csatornák fokozott expressziójával mentesülnek. A Kv1.3 csatorna szelektív gátlásával T_{EM} sejtek aktivációja gátolható, immunszuppresszió érhető el.

2. Célkitűzések

Kutatásom során az immunsejtek sejtmembránjában kifejeződő ioncsatornák funkcionális szerepét kívántam tisztázni. Kísérletes munkánk során számos aspektusból, fiziológias és patológias körülmények között vizsgáltuk az ioncsatornák szerepét, membránlokalizációját, expressziójának változását és a membránkörnyezet csatornákra kifejtett hatását.

2.1 A sejtmembrán szterol (7-dehidrokoleszterin, koleszterin) tartalmának hatása a T-sejtek fiziológiájára, ioncsatornáira

A Kv1.3 csatorna a humán T-limfociták domináns feszültség-függő K^+ csatornája, mely fontos szerepet játszik a T-sejt aktivációban. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a membrán *in vitro* koleszterinszint változtatása módosítja e csatorna kapuzását jellemző paramétereket. Kutatásunk során meg kívántuk vizsgálni:

- 1) *hiperkoleszterinémiás betegek T-sejt aktivációja és Kv1.3 csatorna működése eltérő-e a normál koleszterinszintű donorokhoz képest;*
- 2) *Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindrómában (7-dehidrokoleszterin akkumuláció) szenvedő betegek esetében miként változnak a T-sejtek Kv1.3 csatornájának jellemzői, mik ezek funkcionális következményei;*
- 3) *mely fehérje motívumok felelősek a Kv1.3 csatorna és membránbeli szterolok közötti kölcsönhatásért.*

2.2 A T-sejt ioncsatornák plazmamembrán lokalizációjának molekuláris háttere és funkcionális következményei

A T-sejtek aktivációja *in vivo* az antigén prezentáló sejt (APC) és T-sejt között létrejött immunológiai szinapszisban (IS) valósul meg. A két sejt közötti kontakt régióba berendeződnek a T-sejt ioncsatornái (Kv1.3, KCa3.1, CRAC), valamint számos egyéb membrán és intracelluláris fehérje is. Kísérleteinkben azt kívántuk megválaszolni, hogy

- 1) *az IS-ben lévő T-sejtben miképp változnak a Kv1.3 csatornák biofizikai jellemzői;*
- 2) *mely fehérj(ék) felelős(ek) a Kv1.3 IS-be történő berendeződésében, illetve aktin-mediált kihorgonyzásában,*

3) mi a CRAC ioncsatorna *Orai1* alegységének IS-ben történő tartózkodásának molekuláris háttere és szerepe,

4) mi a *Kv1.3* C terminálisának szerepe a membránlokalizációban és a csatorna működésében.

2.3 A *Kv1.3* csatorna, mint terápiás célpont: egy autoimmun betegség (SLE) sejt szintű lehetséges gyógymódja

Bár az SLE hátterében elsődlegesen B-limfociták állnak, a hiperaktív memória T-sejtek (T_M) is hozzájárulnak a betegség kialakulásához, remissziójához, méghozzá a B sejtek (re-)aktivációja révén, a CD40-CD40L útvonalon keresztül. A CD40L v. CD154 expresszióját az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedése növeli, mely hozzájárul az SLE-s T-sejtek általi B-limfocita aktivációhoz. *Kv1.3* csatornák farmakológiai gátlásával a T-sejt Ca^{2+} -válasza módosítható, ezáltal aktivációja megakadályozható. Mindezek alapján szeretnénk volna:

- 1) kidolgozni egy nanovezikulomokon alapuló, *Kv1.3* elleni siRNS-t alkalmazó módszert, mellyel specifikusan a T_M -ekben tudjuk a *Kv1.3* expressziót leszabályozni,
- 2) meg kívánjuk határozni az általunk létrehozott *in vitro* modellrendszerben, hogy a nanovezikulák segítségével történt *Kv1.3* géncsendesítés milyen hatással van a Ca^{2+} -függő jelátvitelre és a CD154/CD40L szintjére.

2.4 Az *Nav1.7* csatorna altípus specifikus expressziója és szerepe az éretlen dendritikus sejtekben

Korábban kimutattuk, hogy a humán monocita eredetű, éretlen DC-k expresszálják az *Nav1.7* ioncsatornát. Az éretlen DC-k (IDC-k) $CD1a^+$ altípusa az immunválasz beindításáért, gyulladásos folyamatok kialakulásáért felelős, míg a $CD1a^-$ populáció az immuntolerancia kialakításában játszik szerepet. Kísérleteinkben arra kerestük a választ:

- 1) kimutatható-e különbség a $CD1a^+/CD1a^-$ populáció *Nav1.7* expressziójában és funkcionális-e a csatorna?
- 2) mi a *Nav1.7* csatorna funkciója az éretlen DC-ékben?

3. Anyagok és módszerek

3.1 Sejtek, sejtenyésztés

3.1.1 T-limfociták, mononukleáris vérsejtek

A humán perifériás limfocitákat egészséges önkéntesekből nyertük. A mononukleáris sejteket Ficoll-Hypaque sűrűség alapú centrifugálással (sűrűség: 1.077 g/l) szeparáltuk, majd foszfát alapú pufferben (PBS) mostuk. A különféle T-sejt alpopulációkat negatív vagy pozitív szelekciós kittel izoláltuk (EasySep, STEMCELL Technologies, USA). A sejtek aktivációját PHA (5-10 µg/mL) vagy CD3/CD28 antitestekkel (24 lyukú wellhez előzőleg kitapasztottuk) végeztük, 48-96 óráig, 37°C-on, 5% CO₂ és 95%-os páratartalom mellett. A T-sejteket 15 mM HEPES-t tartalmazó RPMI médiumban tenyésztettük (amely tartalmazott még 10 % FBS-t, 2mM L-glutamint, 1 mM Na-piruvátot, és 200 egységnyi penicillin/sztreptomocint). A betegekből és egészséges donorokból származó vérminták vételéhez rendelkezünk etikai engedéllyel.

3.1.2 Dentritikus sejtek

A humán monocitákból származó DC-eket olyan CD14⁺ monocitákból állítottuk elő, amelyeket egészséges véradók Buffy-coatjából Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország) gradiens centrifugálással, majd anti-CD14-gyel bevont mágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) végzett pozitív szelekcióval izoláltunk perifériás mononukleáris sejtekből (PBMC) (Immunológiai Intézetben, Debreceni Egyetem). A tisztított CD14⁺ monocitákat (>95%) 2x10⁶ sejt/ml koncentrációban kihelyeztük, és szérummentes AIMV táptalajban (Invitrogen, Paisley, Skócia) tenyésztettük 100 ng/ml IL-4 és 75 ng/ml GM-CSF (PeproTech EC, London, Egyesült Királyság) jelenlétében, amelyet a 0. és 2. napon adtunk. Az IDC-k aktiválását az 5. napon 10 ng/ml TNF-et, 5 ng/ml IL-1β-t, 20 ng/ml IL-6-ot, 75 ng/ml GM-CSF-et (PeproTech EC) és 1 µg/ml PGE₂-t (Sigma, St Louis, MO, USA) tartalmazó gyulladásozó koktéllal indukáltuk 24 órán keresztül. Az MDC-eket áramlási citometriával azonosítottuk a CD83 expressziója alapján FITC-jelölt anti-CD83 mAb (Immunotech, Marseille, Franciaország) segítségével. Egyes kísérletekben az 5 napos IDC-eket 180 ng/ml Ca²⁺ ionofórral (ionomicin) (Sigma, St. Louis, MO) vagy 250 nM tapsigarginnal (Calbiochem, La Jolla, CA) kezeltük 24 órán keresztül. Az NF-κB gátlásához az IDC-eket 10 µM MG132-vel vagy az oldószer-kontroll dimetilszulfoxiddal (DMSO, Sigma) kezeltük 1 órán

keresztül a gyulladássos koktéllal történő aktiválás előtt. A Nav1.7 csatorna gátlásához tetrodotoxint (TTX) (Alomone Laboratories, Izrael) használtunk 10 μ M koncentrációban 24 órán keresztül.

A DC-k fenotípusát áramlási citometriával, különböző fluorokróm-konjugált antitestek (anti-CD1a-PE az altípus-azonosítására, anti-CD83-FITC a DC-k érésének azonosítására, Beckton Dickinson Pharmingen, San Diego, CA) segítségével végeztük. A fluoreszcencia-intenzitásokat FACSCalibur áramlási citométerrel (BD Biosciences Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ) mértük és elemeztük. A CD1a-jelölt DC-eket a FACS DiVa nagysebességű sejtszortírozóval (BD Biosciences Immunocytometry Systems) választottuk szét. A CD1a⁺ DC-eket fluorokróm-jelölt anti-CD1a antitesttel festettük meg a vizuális azonosításhoz és a patch-clamp mérésekhez (Nikon TE2000 fluoreszcens mikroszkóp).

3.1.3 CHO, HEK tsA-201, HEK, HEK-293T sejtek

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 tartottuk, és 2-3 naponta passzáltuk.

3.1.4 Jurkat E6-1, CH12, D10 sejtek

A Jurkat E6-1 sejteket, sejt vonalakat 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 D10 egér TH2 sejteket, melyek a GFP-vel konjugált PKC- θ enzimet stabilan expresszálják, Click's médiumban tenyésztettük, amely 10% FBS-t, 1% Glutamint, 1% penicillin/streptomicint, 1% piruvátot, 50 μ g/ml Gentamicin-t, β -merkaptó-ethanolt és 25 mg/L adenzint, citozint, guanozint, uridint tartalmazott. A sejtek G418 rezisztensek voltak. A sejt vonalat Abraham Kupfer és munkacsoportjától kaptuk (Johns Hopkins University, Baltimore), melyet retrovírusos transzdukcióval állítottak elő.

A CH12-LX egér B sejteket DMEM médiumban tenyésztettük, amely a következő adalékanyagokat tartalmazta: 10% FBS, 1% glutamin, 1% penicillin/streptomicin, 1% piruvát, 50 μ g/ml gentamicyn, β -merkaptóethanol és 25 mg/L adenzin, citozin, guanozin, uridin.

3.1.5 PBMC-s minták hiperkoleszterinémias betegekből

A kísérletek során 15, korábban nem kezelt, a Friderickson szerinti besorolás alapján II/A; II/B csoportba tartozó hiperkoleszterinémias személyt vizsgáltunk. A mintagyűjtés során arra törekedtünk, hogy a mintaadók teljes koleszterinszintje a fiziológiás <5,2 mmol/l értéknél magasabb legyen. Mivel ezen értékek nagysága tág határok között mozgott a megfigyelt populációban, a hiperkoleszterinémias mintákat a koleszterinszintek alapján két csoportra bontottuk. Az első csoportba (HC I. csoport) a mérsékelt (5,2 mmol/l < X < 10 mmol/l), a második csoportba (HC II. csoport) a jelentősen (10 mmol/l < X) emelkedett koleszterinszinttel rendelkező személyek mintái kerültek. A vizsgálatok során a kontroll sejteket hét, normál koleszterinszinttel rendelkező önkéntesből nyertük. Sem a hiperkoleszterinémias, sem a kontroll csoport tagjai nem szenvedtek egyéb, általunk ismert olyan betegségben, amely befolyásolhatta a mérési eredményeket, illetve a szérumban koleszterinszinteket. Így a máj, vese, endokrin zavarok, cukorbetegség, alkoholizmus, drogfüggőség, lipidcsökkentő és egyéb gyógyszerek használata a tanulmányból való kizárást vont maga után. A kiválasztott betegektől és kontroll személyektől a Belgyógyászati Klinika A épülete Lipid Szakrendelésének munkatársai egyenként 10 ml perifériás vénás vért vettek a véralvadást elkerülendő, heparinizált Vacutainer csövekbe.

3.1.6 PBMC-k izolálása Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegekből

A betegbevonás idejéig Magyarországon 15 SLOS-ban szenvedő gyermeket diagnosztizáltak (18). A Debreceni Egyetem „SLO-szindróma diagnosztikai és terápiás munkacsoport”-ja Balogh István vezetésével 2013-ban publikálta a diagnosztizált betegek részletes esetismertetését, genotípus-fenotípus korrelációját (18). A betegeket a fenotípusos jellemzőket figyelembe vevő Kelly és Hennekkam féle súlyossági rendszer alapján osztották csoportokba. Az enyhe csoportba négy, a tipikus csoportba hét, míg a súlyos csoportba 4 gyermek került. A tipikus csoportból két, a súlyos csoportból pedig mind a négy gyermek elhunyt a mintavételezés megkezdése előtt. A diagnózist követően minden gyermek orális koleszterin pótlásban (150-300 mg/ttkg) részesült, valamint statinterápia is indult, amit öt esetben a mellékhatások miatt felfüggesztettek. Tanulmányunkba végül a kilenc elérhető magyarországi betegből 8-at sikerült bevonni (életkor: $7,65 \pm 2,23$ év), egy gyermek ugyanis külföldön tartózkodott. A mintavételezés során 8 egészséges, az SLOS betegek életkorához

igazított kontroll személyt (életkor: $7,66 \pm 1,83$ év) is bevontunk a tanulmányba. A betegektől és egészséges kontroll személyektől egyenként 10 ml perifériás vért vettünk heparinizált Vacutainer csövekbe.

3.1.7 Sejtek töltése koleszterinnel/7-dehidrokoleszterinnel

A frissen izolált limfocitákat, illetve CHO sejteket kétszer mostuk Hanks oldattal, majd 2×10^6 sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk metilált- β -ciklodextrin/koleszterin-t (M β CD/CHOL) vagy metilált- β -ciklodextrin/7-dehidrokoleszterin-t (M β CD/7DHC, CycloLab, Magyarország) tartalmazó Hanks oldatba (a szövegben és ábrákon feltüntetett koncentrációértékek minden esetben a komplexek koleszterin, illetve 7DHC tartalmára utalnak). A sejtuszpenziót 60 percig 37°C -on inkubáltuk, majd kétszer mostuk Hanks oldatban, végül az elektrofiziológiai mérések során külső oldatként alkalmazott normál Ringer oldatba vettük fel a sejteket. A kontroll sejtek esetében ciklodextrin származékok nélkül inkubáltuk a sejteket.

3.1.8 DC-k migrációjának vizsgálata

Az IDC-eket 10^6 sejt/ml mennyiségben felszuszpendáltuk migrációs tápfolyadékban (0,5 % BSA RPMI 1640-ben). A matrigellel bevont transzmigrációs betéteket (6,5 mm átmérőjű; pórusméret $3 \mu\text{m}$) a BD Biosciences-től szereztük be. A MIP-1 α kemokint (PeproTech) 200 ng/ml-re hígítottuk migrációs tápfolyadékban, és 600 μl végső térfogatban adtuk az alsó kamrákhoz. 40 μM TTX-et vagy azonos mennyiségű DMSO-t adtunk az alsó és a felső kamrába. Amikor spontán transz-endothelialis migrációs vizsgálatokat végeztünk, az alsó kamrában a migrációs közeg RPMI 1640-0,5 % BSA volt, kemokinek nélkül. A felső kamrába 250 μl végső térfogatban adtunk IDC-eket, és a kemotaxis vizsgálatokat 24 órán keresztül végeztük 5% CO_2 mellett, 37°C -on. A vizsgálat végén a betéteket kidobtuk, és az alsó kamrába vándorolt sejteket összegyűjtöttük. A migrált sejtek számát polisztirol standard gyöngyök (Sigma) segítségével áramlási citometriával számoltuk.

3.2 A sejtek koleszterin és 7DHC összetételének meghatározása

3.2.1 Amplex Red Cholesterol Assay Kit

A hiperkoleszterinemiás sejtek koleszterintartalmának meghatározását az Amplex Red Cholesterol Assay segítségével végeztük (ThermoFisher Scientific, Hungary). Az esszé során a sejteket először Triton X-100 alapú oldat segítségével lizáltuk (az oldat összetevői: 50 mM Tris,

(pH 8,0), 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl, 1% Triton X-100), majd a gyártó által ajánlott protokollnak megfelelően a lizátumot és a reagenseket 96 lyukú tálcán inkubáltuk. A sejtek lizálása során felszabaduló koleszterinmolekulák koleszterin-oxidáz hatására bomlanak, a reakció során keletkező hidrogén-peroxid pedig az Amplex-Red reagenssel (10-acetil-3,7-dihidroxiphenoxazin) egy fluoreszcens molekulát (rezorufin) képez. A koleszterinnel ekvimoláris mennyiségben keletkező rezorufint fluorimetriás eljárással detektáltuk, amiből következtettünk a sejtek összkoleszterin-koncentrációjára. A mérésekhez Multimode Microplate Reader-t (BioTek, Winooski, VT) használtunk. A minták koleszterin-koncentrációjának meghatározásához ismert koleszterinkoncentrációjú referencia oldatok segítségével kalibrációs görbét készítettünk. Annak érdekében, hogy eredményeink a minták sejtszámától függetlenek legyenek, a koleszterinkoncentráció meghatározása során kapott értékeket a fehérjekoncentrációval arányos, 280 nm-en mérhető abszorbanciára normáltuk.

3.2.2 Gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS)

Az SLOS betegekből származó vörösvértetek (vvt) CHOL és 7DHC koncentrációjának meghatározásához gázkromatográfia-tömegspektrometrián (GCMS-QP2010, Shimadzu) alapuló módszert alkalmaztunk. A kísérleteket Dr. Péter Mária az SZBK munkatársa végezte. A mintákhoz belső standardként 10 µg/mg protein ergoszterol került hozzáadásra. A lipidextrakció módosított Folch protokoll alapján történt. A minták fehérjetartalmának meghatározásához BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham) került felhasználására a gyártó utasításait követve. Az extraktumok elpárolása utáni maradék anyagot 25 µl benzénben oldották, majd 3 µl N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid-ban vették fel és inkubálták szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. A reakció során keletkező trimethylsilyl éter származékok 1-1 µl-ét injektálták a kromatográfiai oszlopokra. Az egyes szterolok azonosítása koleszterin és 7DHC referenciaoldatok segítségével történt.

3.3 Molekuláris biológia

3.3.1 Plazmid preparálás, izolálás, mutációk

A plazmidokat E. coli kompetens sejtek (DH5α, ET12567) segítségével szaporítottuk fel, hősokk módszer alkalmazásával transzformáltuk a sejteket a cirkuláris plazmidokkal. 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.

A különféle csatornák mutációit ún. flanking primer PCR módszerrel hoztuk létre (egy-egy konstruktot az Eredmények és megbeszélések fejezetben, a megfelelő résznél kerülnek említésre). A klónozás/mutáció létrehozásának prokollja röviden az alábbi volt: a PCR során felszaporított DNS szakaszt 1%-os agaróz gélen megfuttattuk, majd kivágtuk és kitisztítottuk fenol-extrakciós módszerrel. Ezután mind az inzertet, mind a vektort a megfelelő restrikciós enzimekkel hasítottuk, 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.

3.3.2 SDS-PAGE elektroforézis és western blot

A fehérje mintákat SDS gélelektroforézissel méretük alapján elválasztottuk, ahol 12%-os gélt használtunk (20 percig 80 V, majd 90 percig 120 V feszültséget alkalmazva), majd PVDF membránra (Millipore, Billerica, MA, USA) transzferáltuk. A membránt sovány tejjel blokkoltuk (Dóczy ABC, Debrecen), majd hozzáadtuk az elsődleges antitesteket: egér anti-STIM1, anti-FLAG M2, egér anti-SAP97, anti-PSD95, nyúl anti-Kv1.3 és nyúl/egér anti-aktin. Ezután a membránt mostuk Tween 20-at tartalmazó TBS-ben (TRIS pufferolt sóoldat), majd hozzáadtuk az anti-egér IgG vagy anti-nyúl IgG HRP-kapcsolt másodlagos antitesteket (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA). A membránokat 3-szor mostuk TBS-ben és 1-szer desztillált vízben, végül Pierce™ ECL reagenst (ThermoFisher, Magyarország) adtunk hozzá és FluorChem Q Multimage III Western blot képalkotó rendszer (ProteinSimple, USA) segítségével előhívtuk. A kísérletek során 1×10^6 sejtet használtunk minden egyes minta esetében.

3.3.3 Coomassie-festés és GST affinitás kromatográfia

A pGEX-4T-2-Orai1/pGEX-4T-2-Kv1.3 N- ill. C terminálissal rendelkező GST fúziós fehérjéket (Orai1-1-72: első 72, Orai1-1-88: első 88; Orai1-259-301: utolsó 42 aminosav az Orai1 fehérjéből; Kv1.3-N-term: első 184, Kv1.3-C-term: utolsó 94 aminosav a humán Kv1.3-ból), 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-tiogalaktóziddal (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-merkaptoetanolt és proteázgátló koktél III-at (Calbiochem, Darmstadt, Németország) tartalmazó lízispufferben szonikáltuk. Ezután SDS gélen megfuttattuk és 1 percig Coomassie-festékkel 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 Orai1/Kv1.3 N és C terminálist tartalmazó GST fehérjét tartalmazó lizátumokat 1 óráig GST SpinTrap oszlopokra (GE Healthcare, USA) kötöttük ki, 4 °C-on inkubálva és állandóan forgatva. A Jurkat sejteket (amelyek az SAP97/PSD95/STIM1 fehérjéket 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 fehérjéket 10 mM glutationnal eluáltuk. Az eluátumokat SDS-PAGE segítségével választottuk szét, és PVDF membránra vittük át. A fehérjék jelenlétét western-blottal igazoltuk speciális SAP97/PSD95/STIM1-elleni antitest segítségével.

3.3.4 Q-RT-PCR expressziós analízis (DC-k)

A teljes RNS-t Trizol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) izoláltuk a DC-kből. A reverz transzkripciót 37 °C-on 120 percig végeztük 100 ng teljes RNS-ből a High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével. A Nav1.7, KCa3.1 és MMP12 génekre Q-RT-PCR-t végeztünk (ABI PRISM 7900, Applied Biosystems) 40 ciklusban 94 °C-on 12 másodpercig és 60 °C-on 60 másodpercig Taqman assay-kkel (Applied Biosystems). Minden PCR-reakciót tiplikátumban végeztünk, egy RT enzimet nem tartalmazó kontrollreakcióval együtt. Az összehasonlító Ct-módszert használtuk, a 36B4 endogén kontroll gént használtuk kontrollként kvantifikáláshoz.

3.4 Génexpresszió módosítás

3.4.1 Transzfekció

A DNS plazmidok tranziens transzfekcióját Lipofectamine 2000™ (Life Technologies, Magyarország) segítségével végeztük a gyártó által megadott protokoll alapján (CHO/HEK/HEK tsA-201 sejtvonalak esetében).

3.4.2 Virális transzdukció

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

3.4.3 Retrovirális shRNS-es géncsendesítés

A STIM1/SAP97/PSD95/cortactin fehérjék leütését Jurkat/HEK sejtekben a virális transzdukcióhoz használt protokoll alapján (Nolan laboratórium) Mission shRNS (Sigma-Aldrich Ltd.) plazmidok segítségével végeztük. A transzdukció kontrolljaként pLKO.1-puro plazmidot (Sigma-Aldrich Ltd.) használtunk, ami egy olyan shRNS inzertet tartalmazott, amely nem kódol egyetlen ismert génrészletet sem. A géncsendesítés hatékonyságát western-blottal ellenőriztük. A géncsendesített sejteket 3 µg/ml puromycin segítségével szelektáltuk ki.

3.4.4 Géncsendesítés siRNS-sel

A T-sejteket Kv1.3 specifikus és scramble siRNS-sel és pmaxGFP plazmiddal kotranszfectáltuk 4D-Nucleofector System segítségével (Lonza Group Ltd.), a gyártó által megadott protokoll alapján. A sejteket 24 órával a transzfekció után használtuk kísérleteinkhez.

A DC-eket három különböző Nav1.7 specifikus és kontroll siRNS (Applied Biosystems) konstrukció keverékével transzfectáltuk a 3. napon 1 pmoL végső koncentrációban (GenePulser X Cell elektroporátor és 0,4 cm-es küvetták (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)). A transzfekció után 2 nappal a Nav1.7 mRNS expressziójának szintjét Q-RT-PCR segítségével vizsgáltuk. A transzfectált sejtek életképességét 7AAD és Annexin V festéssel (Beckton Dickinson Pharmingen) ellenőriztük.

3.4.5 Kv1.3 csendesítése siRNS-et tartalmazó NP-kkel (siRNS-NP) T-sejtekben

3×10^5 T-sejtet (aktiváltat az elektrofiziológiai kísérletekhez, nyugalmi állapotút a Ca^{2+} mérésekhez) T-sejt médiumban 50 µL siRNS-NP-vel kezeltünk, és 24 órán át inkubáltuk sejt kultúra inkubátorban (37°C, 5% CO₂, párásítva).

3.5 Elektrofiziológia

3.5.1 Patch-clamp technika

A mérés előtt a sejteket (T-sejt, CHO, HEK, HEK tsA-201, Jurkat, D10) 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. Az ionáramokat whole-cell (teljes-sejt) és/vagy 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 X mM-os tetraetil-ammóniumos (TEA) oldat a következőket tartalmazta: X mM TEA-Cl, 145-X mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂, 5,5mM glükóz, 10mM HEPES (pH 7,35, 305 mOsm). A peptid toxinok alkalmazása esetén a külső oldathoz 0.1 mg/ml BSA-t adtunk. 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. 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 gátlás során megmaradó áramhányadot (RF: remaining fraction) a gátlószerezrel 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 sejt aktivációs időállandóját a három egymást követő, 15 másodpercenként megismételt depolarizáció során kapott időállandók átlagaként határoztuk meg. P/5 protokollt alkalmaztunk a szívárgási áram minimalizálására.

Az inaktivációs áram kinetikájának meghatározásához egyexponenciális 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 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 tesztpotenciálokra egy adott V tesztpotenciál csúcsárama (I_p), és a K^+ megfordítási potenciál ($E_r = -85mV$) 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 – 100mV 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.

3.5.2 A DC-k áram és membránpotenciál mérése

A DC-k esetén a standard teljes-sejt patch-clamp technikákat használtuk a korábban leírtak szerint, feszültség-zár (áram detektálás) vagy áram-zár (membránpotenciál mérés) konfigurációban. A CD1a⁺ DC-ket fluorokróm-jelölt anti-CD1a antitesttel festettük meg a vizuális azonosításhoz és a patch-clamp mérésekhez való kiválasztáshoz Nikon TE2000 fluoreszcens mikroszkóp segítségével. A normál extracelluláris oldat (mM-ban): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz és 10 HEPES (pH 7,35, 305 mOsm). A Na⁺-mentes külső oldat (mM-ban): 145 kolin-Cl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35, 305 mOsm). A magas K⁺-tartalmú fürdőoldat a következőkből állt (mM-ban): 150 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35, 305 mOsm). Az IDC-kben végzett Nav1.7 mérésekhez használt pipettaoldat (mM-ban): 140 KF, 5 mM NaCl, 11 K₂EGTA, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7,20, ~295 mOsm). A perforált-patch üzemmódban történő membránpotenciál méréshez használt

pipettatöltő oldat (mM-ban): 150 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 5 HEPES, 10 EGTA (pH 7,2) és 0,3 g/l Nystatin. Az KCa3.1 áram méréséhez 150 KCl, 5 HEPES, 11 EGTA, 8,7 CaCl₂, 2 MgCl₂, (pH 7,2) került a pipettába (a szabad Ca²⁺ koncentráció kb. 1 μM).

A KCa3.1 konduktancia meghatározásakor a teljes-sejt áramot feszültségrámpa (-120 mV-tól +50 mV-ig tartó, 200 ms hosszúságú) protokollal rögzítettük, és az áram nagyságát -85 mV-on (I_{-85}) és -120 mV-on (I_{-120}) meghatároztuk. Mivel a K⁺ megfordítási potenciálja körülbelül -85 mV (E_K), amelyet a pipetta és a normál külső oldat összetételéből a Nernst-egyenlet segítségével számoltunk ki, az áram ezen a feszültségen tisztán a szivárgási áram. Ezzel szemben a -120 mV-on mért áram az KCa3.1 áramból és a szivárgásból áll. Mivel a szivárgási áram 0 mV-nál megfordul és lineáris az áram-feszültség összefüggés, értéke -120 mV-nál az alábbi képlet segítségével kiszámítható: $I_{leak}(@-120mV) = -120 / -85 \times I_{-85}$, és kivonható a -120 mV-on mért teljes sejtáramból, hogy megkapjuk a tiszta KCa3.1-áramot ezen a feszültségen [$I_{KCa3.1}(@-120mV)$]. Továbbá az KCa3.1-áram nem mutat idő- és feszültségfüggő aktivációt (az áram-feszültség kapcsolat lineáris), így a teljes-sejt konduktancia az alábbi módon kiszámítható a csak KCa3.1-csatornákat kifejező IDC esetében: $G = I_{KCa3.1}(@-120mV) / (-120mV - E_K)$. A KCa3.1 csatorna vezetőképességét már korábban meghatározták ($\gamma = 11$ pS), így a csatornák száma egy sejtben a következőképpen adható meg: $N = G / \gamma$ [233].

3.6 Lipid nanovezikulák (NP) előállítás

3.6.1 NP szintetizálás

Kloroformban oldott lipideket L- α -foszfatidil-kolin (PC), 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-fosfo-etanolamin-N-[biotinil(polietylén-glikol)-2000] (PE-PEG-biotin) és koleszterin (CH) (Avanti Polar Lipids Inc.) 3:1:1 molarányban összekevertük, N₂ gázzal megszárítottuk, PBS-sel (pH = 7,4) rehidratáltuk, és 37 °C-os inkubátorban 2 órán át rázattuk, hogy multilamelláris vezikulákat (MLV) készítsünk. Szonikálás (Misonix, XL-2000 sorozat) után a mintát 100 nm-es szűrővel extrudáltuk, hogy unilamelláris vezikulákat (ULV) szintetizáljunk (LIPEX™ Thermobarrel Extruder, Northern Lipids Inc.). A CellVueRed (Molecular Targeting Technologies Inc.) lipidfestékkel ellátott NP-ket a fent leírtak szerint állítottuk elő, azzal a különbséggel, hogy a lipidfestéket a N₂-vel történő szárítás előtt adtuk a lipidkeverékhez.

3.6.2 ULV-k funkcionalizálása

A biotinizált antitesteket (egér anti-humán IgG és CD45RO, 10 µg/ml, BD Biosciences) először 10 µg/ml Alexa-647 vagy Alexa-488 konjugált streptavidinnel (SAV, Life Technologies) inkubáltuk PBS-ben. Ezután az antitest-SAV komplexet hozzáadtuk a 100 nm-es ULV-hez, és szobahőmérsékleten inkubáltuk. A nem kötött antitestet és SAV-t CL-4B oszlopok (GE Healthcare Life Sciences) segítségével távolítottuk el. A későbbi siRNS-töltéshez használt NP-eket 2-4 órán keresztül -80 °C-on lefagyasztottuk, majd 48 órán keresztül liofilizáltuk (Labconco, FreeZone 6 Freeze Dryer).

3.6.3 siRNS bezárása NP-kbe

A liofilizált CD45RO-NP-eket (kb. 50 µg lipid) 100 µl nukleázmentes vízben rekonstruáltuk, amely 200-400 pmol, protamin-szulfáttal komplexált (1:5 moláris arány) Kv1.3-siRNS-t (Kv1.3-NP-k; Santa-Cruz Biotechnology Inc.) vagy scramble Cy3-siRNS-t (Scramble-NP-k Applied Biosystems) tartalmazott.

3.6.4 Az NP-k méretének meghatározása

Az NP-k átmérőjének meghatározására dinamikus fényszórás (DLS) és intenzitás-fluktuáció korrelációs módszereket használtunk a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) segítségével. Az ULV-eket pásztázó elektronmikroszkópiával (SEM, Hitachi SU 8000), pásztázó transzmissziós elektronmikroszkópiával (STEM) és hidratált minták esetében WETSEM-mel tettük láthatóvá. Röviden, a TEM megfigyeléshez a liofilizált nanorészecskéket először metanolban diszpergáltuk, majd lipidoldatot (50 µl) cseppentettünk és Cu-rácsra (TED PELLA, G200HS) szárítottuk. A mintákat 30 kV-on STEM-mikroszkóppal vizsgáltuk. A lipid NP-eket hidratált állapotban is vizualizáltuk WETSEM TM technológiával (EI-Mul Technology, Izrael). A folyékony membránt (QX 102 kapszula) először poli-L-lizinnel vontuk be, majd a szuszpendált NP-oldatot (15 µl) a membránra rögzítettük, és a lipidvezikulákat SEM segítségével 25 kV-on vizualizáltuk.

3.7 Intracelluláris Ca²⁺-szint mérés

3.7.1 Áramlási citometriás módszer

A Ca²⁺ mérése a Baba és munkatársai által leírt ún. „Ca²⁺ add-back” módszeren alapult [234]. Röviden, 1×10⁶ CD3⁺ sejtet 1000-szeres hígításban Indo-1-AM (2 mg/ml) rációmetrikus festékkel 0,015% Pluronic-127 jelenlétében (Life Technologies, Carlsbad, CA), 1 mM CaCl₂-t, 1

mM MgCl₂-t és 1% FCS-t tartalmazó Hank's oldatban 30 percig 37 °C-on töltöttük, majd háromszor mostuk 10 mM HEPES-sel (pH 7,0) és 1% FCS-sel kiegészített Hank's oldatban. A mérések előtt a sejteket a fent említett HEPES-es Hank's, 0,5 mM EGTA-val (pH 7,4) kiegészített kalcium-depletált (kb. 0 mM Ca²⁺) oldatban felfuszpendáltuk. A mintákat 37°C-on tartottuk a mérés kezdetéig. A T-sejtekben az Indo-1 fluoreszcencia arányát (amely a [Ca²⁺]_i-t jelzi) áramlási citometriával mértük LSRII áramlási citométeren (Beckton Dickinson). Gerjesztés: 355 nm, 20 mW UV lézer, emisszió: 530/30-as sávszűrővel a Ca²⁺-ot nem kötött Indo-1, valamint 405/20-as sávszűrővel a Ca²⁺-hoz kötött Indo-1 intenzitás detektáltuk. Az Indo-1 fluoreszcencia arányának változásait a T_M sejtekben SAV-Alexa488-cal jelölt CD45RO-NP-ken történő kapuzással határoztuk meg. A következő protokollt alkalmaztuk: a sejtekhez 0 mM Ca²⁺-os oldatban lévő thapsigargin (TG, 1 μM) adtunk, majd 2 mM Ca²⁺-tartalmú oldatot adtunk a sejtekhez. Ez a protokoll lehetővé teszi a Ca²⁺ beáramlás mérését, amely kizárólag a CRAC csatornákon keresztül történik. A sejtek TG-vel való kezelése az intracelluláris Ca²⁺ raktárak kiürüléséhez és a CRAC-csatornák megnyitásához szükséges jelátviteli lépések aktiválásához vezet [10]. A Ca²⁺ beáramlást a nyitott CRAC csatornákon keresztül ezután az extracelluláris Ca²⁺ koncentráció ([Ca²⁺]_{ext}) emelkedése indukálja. A mintákat 300 esemény/másodperc sebességgel rögzítettük "alacsony" áramlási sebességgel. Az elemzését a Flow-Jo szoftver (Tree Star Inc., USA) segítségével végeztük.

A görbe alatti területet (AUC) a Ca²⁺-görbe azon szakaszára számoltuk ki, amikor a sejteket TG hozzáadása után 2 mM Ca²⁺ -oldatban tartottuk; ez becslést ad a sejtbe történő átlagos Ca²⁺ -beáramlásról. A Ca²⁺ amplitúdókat (ΔCa²⁺) az Indo-1 csúcsintenzitás-arányaként adtuk meg 2 mM Ca²⁺ hozzáadásakor, korrigálva a TG hozzáadása előtti 0 mM Ca²⁺ -nál mért átlagos Indo-1-aránnyal (az alapjelet kivontuk a csúcstértékből).

3.7.2 Mikroszkópos intracelluláris Ca²⁺ mérés

Az Orai1-et kifejező, különböző Jurkat T-sejteket poly-L-lizinnel bevont üvegaljú petrikbe helyeztük szintelen RPMI médiummal együtt, majd 1 μM 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 μM thapsigargin-t (TG) (Thermo Fisher Scientific Inc.) tartalmazó 0 mM-os Ca²⁺ oldatot adtunk a sejtekhez az endoplazmatikus retikulum (ER) Ca²⁺ raktárainak kiürítésére. A Ca²⁺ visszaadása során, az 1 μM 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.

3.7.3 Intracelluláris Ca²⁺ válasz mérése az immunológiai szinapszisban

Az Orai1 vad típusú csatornát (mGFP-Orai1-Full), az N-terminális deléciós csatornát (mGFP-Orai1-Δ72), 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 μM 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/sztreptomycin). 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 választ.

A kalcium válaszok 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 alapvonal (a gyöngyök hozzáadása előtt) átlagának és 2-szeres SD-jének (átlag+2×SD) összegénél, valamint a csúcsok előtt és után lévő pontok magassága kisebb volt, mint a csúcs(pont)

magassága. Méréseinket 3 különböző napon végeztük. Csak a mGFP pozitív, „gyönggyel aktivált” (CD3-CD28 gyöngghöz kapcsolódott) sejteket vettük figyelembe.

3.8 Immunológiai szinapszis létrehozása

3.8.1 Kv1.3 csatorna IS-beli módosítása D10 sejtben

Az egér D10 TH2 sejt vonalat, mely a tojásfehérje conalbumin antigénre specifikus, antigénfelismerő sejt ként, míg a CH12-LX B sejteket antigénprezentáló sejt ként használtuk. A CH12-LX sejteket egy éjszakán át 500 µg/ml conalbuminnal kezeltük. Mind a CH12-LX, mind a D10 sejteket Click's médiummal mostuk, majd a sejt koncentrációt 1×10^6 sejt/ml-re állítottuk be. A T és B sejteket 1:1 arányban kevertük, 5×10^5 T és 5×10^5 B sejtet 1 percig, 37 °C-on, 200 g-n centrifugáltuk. Az elektrofiziológiai mérésekhez a pelletet normál extracelluláris oldatban/médiumban szuszpendáltuk fel, majd 5 perc 37 °C-on történő inkubálás után 35 mm-es Petri csészékbe pipettáztuk. A D10 sejtek és egyben a szinapszis azonosítása a PKC- θ GFP fluoreszcens jele alapján történt, amely egyedülálló sejtben egész sejtre kiterjedő diffúz jelet adott, míg szinapszisban lévő sejtben az antigén bemutató sejtrel való kontaktrégióba rendeződött át. A B-sejteket a szinapszis létrehozása előtt Cell Tracker Red™ membránpermeábilis fluoreszcens reagenssel (ThermoFisher Scientific, Hungary) jelöltük meg, a könnyebb megkülönböztetés céljából.

3.8.2 Kv1.3 csatorna IS-beli berendeződésének molekuláris háttere

A Jurkat T-sejt vonal specifikus a Staphylococcus enterotoxin E-re (SEE, Toxin Technologies, Sarasota, FL, USA). APC-ként a Raji B-sejtes limfóma sejteket használtuk. A Raji sejteket 10 µg/ml Staphylococcus enterotoxin E-vel (SEE, szuperantigén) „aktiváltuk” 30 percig. A sejt konjugátumokat a Jurkat sejtek és a Raji sejtek 1:1 arányú összekeverésével és 37°C-on 200g-n történő 1 perces centrifugálásával képeztük. A keverékeket poli-L-lizinnel bevont fedőlapokra cseppentettük, és 1, 5, 10, 20 vagy 30 percig 37°C-on, 5%CO₂ és 95% levegővel párasított légkörben inkubáltuk, majd jégre tettük a jelöléshez. A sejteket egyszer 1 × TBS-sel mostuk, majd 2%-os paraformaldehiddel fixáltuk 1 × TBS-ben 10 percig. Az egyes lépések között a sejteket háromszor öblítettük 1 × TBS-szel. A sejteket elsődleges CD3 antitesttel (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), majd a megfelelő másodlagos antitesttel (Alexa Fluor 647, GAMIG, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) jelöltük. Mindkét antitestet 1%

BSA-t tartalmazó TBS-ben hígítottuk, és 30 percig inkubáltuk a sejtekkel. A fedőlemezeket leöblítettük és Mowiol Antifade-ben rögzítettük.

3.8.3 Orai1 IS-beli feldúsulása, Kv1.3-cortactin kihorgonyzása

A különféle Kv1.3-t, Orai1-t expresszáló 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 falloidint 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.

3.9 Konfokális mikroszkópia, képkéértékelés, FRAP, PLA

3.9.1 Konfokális mikroszkópok

A konfokális képeket Zeiss LSM 510 és 710, NIKON Ti2, Olympus FV-1000 mikroszkópokkal rögzítettük. He-Ne lézert (633 és 543 nm vonalak), argon lézert (488 nm vonal) a fluoreszcens festékek (Alexa-488/546/647) valamint a fluoreszcens fehérjék (mGFP/EGFP/mCherry) gerjesztéséhez. A szeletek vastagságát kb. 1 – 1,5 μm-re állítottuk be.

3.9.2 Kv1.3-cortactin kihorgonyzása: FRAP mérések

A transzfektált HEK-293 sejteket kollagénnel és poli-L-lizinnel bevont üveg fedőlemezekre pipettáztuk, és a FRAP-kísérletek elvégzése előtt 37 °C-on legalább 1 órán át fenolvörös nélküli DMEM-ben inkubáltuk. A sejteket a FRAP-mérések során is fenolvörös nélküli DMEM-ben tartottuk. A sejtfedőlemezek egy részét a FRAP-mérések előtt 50 percen keresztül 37 °C-on az aktin-polimerizációt kiváltó jasplakinolidot (Calbiochem) tartalmazó oldattal (2 μM DMEM-ben; DMSO 1:1000 hígításban a kontroll sejtekben) előinkubáltuk. A FRAP-kísérleteket Zeiss LSM 510 Meta konfokális mikroszkópon végeztük 40× vízimerziós objektívvel (NA: 1,2),

szobahőmérsékleten. A pinhole méretet 0,8-0,86 μm közé állítottuk be (a szeletvastagság kb. 1 μm volt). A mérések során az EGFP-jelölt Kv1.3 csatornákat 488 nm-es Argon lézerrel gerjesztettük, amelyet egy 505-535 nm-es EGFP-szűrőn keresztül 1%-os teljesítményen engedünk át a „photobleaching” előtti és utáni mérésekhez. A photobleachinget csak a sejtmembrán mentén egy régióra (ROI) korlátoztuk, és az Argon-lézerrel (488 nm) 100%-os teljesítményen keresztül végeztük el a ROI-n belül. A FRAP-kísérletek során a konfokális képeket 15 másodpercenként 512x512-es felbontással és 3x-os zoommal készítettük, összesen 60 felvételt rögzítettünk. A háttér-fluoreszcenciát kivontuk az egyes képek „photobleached” ROI-ján mért átlagos fluoreszcens intenzitásból, majd a photobleach-elés előtti intenzitáshoz normalizáltuk. Ezeket a normalizált értékeket használtuk a végső elemzéshez. A mobilis frakciót (M_f) a következő módszerrel határoztuk meg

$$M_f = \frac{F_\infty - F_0}{F_i - F_0} \quad (1)$$

ahol F_∞ a fluoreszcencia intenzitás a FRAP-kísérletek végén, F_0 a közvetlenül a fehérítés utáni fluoreszcencia-intenzitás, F_i pedig a bleaching előtti fluoreszcencia intenzitás.

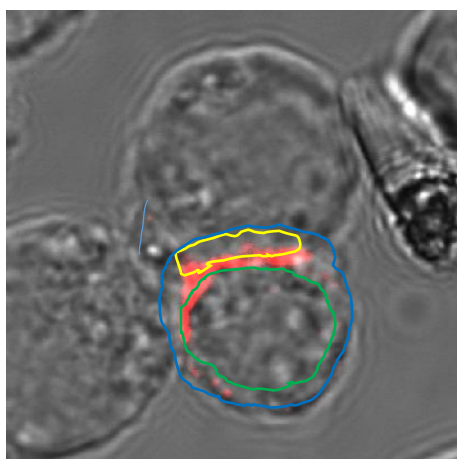
3.9.3 Kv1.3 csatorna IS-beli berendeződésének kvantifikációja

A Kv1.3 csatornák felhalmozódásának számszerűsítésére az IS-ben (a CD3 polarizáció alapján a T-sejt és a B-sejt kontaktterületén) a következő kifejezést használtuk (felhalmozódási arány, AR):

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

ahol I_{IS} , $I_{outside}$, I_{inside} és I_{BG} (Kv1.3 csatornák) átlagos fluoreszcens intenzitása az IS-ben, a sejten kívül (beleértve a membránt és az intracelluláris régiót), a sejten belül (csak az intracelluláris régióban), illetve a kép sejtmentes területén detektált háttérintenzitás. $AREA_i$ a leírt részek területét jelöli. A ROI-kat mindig az extracelluláris CD3 jelölés alapján választottuk ki, hogy az esetleges intracelluláris mGFP-Kv1.3 jeleket elhanyagolhassuk (**12. ábra**). Az elemzéshez MacBiophotonics ImageJ szoftvert használtunk. Egy sejtet akkor tekintettünk Kv1.3-polarizáltnak, ha az AR értéke nagyobb volt, mint 1,5.

3.9.4 Az Orai1 IS-beli berendeződésének meghatározása



I_{IS} and $AREA_{IS}$: mean intensity and area of the IS

$I_{outside}$: mean intensity in the whole cell

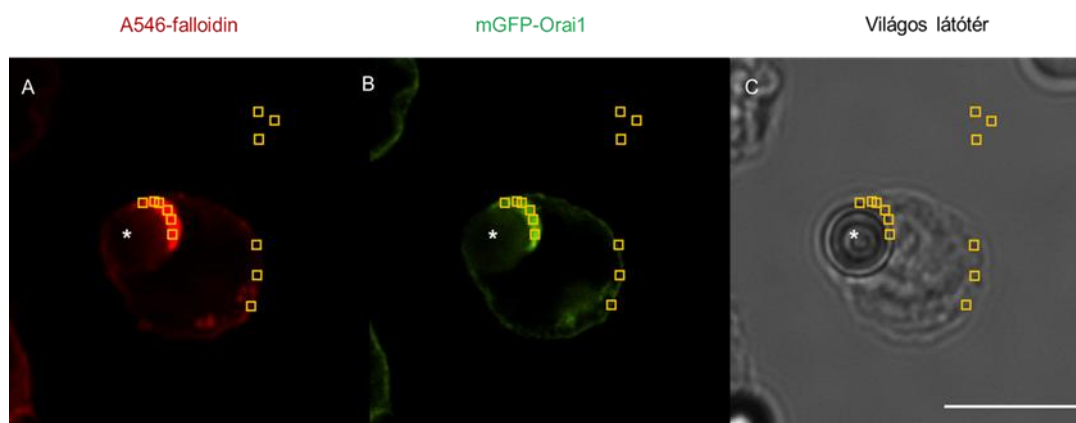
I_{inside} : mean intensity in the cytosol of cell

$AREA_{membrane} = AREA_{outside} - AREA_{inside}$

I_{BG} : mean background intensity

12. ábra A Kv1.3 csatorna IS-beli feldúsulásának analízise

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 (**13. ábra**). Majd ezeket a meghatározott helyzetű ROI-kat használtuk az mGFP fluoreszcens csatorna esetében az mGFP-Orai1 felhalmozódásának meghatározására.



13. 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 konstrukciókat 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 felvétel 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 10 μ m hosszú.

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.

3.10 Immunfluoreszcencia

3.10.1 Jelölés áramlási citometriás méréshez

A különböző sejteket fluoreszcens festékekkel konjugált specifikus és izotípusos kontroll antitestekkel jelöltük 10% FCS/BSA-PBS-ben 30 percre, jégen a gyártó által megadott koncentrációban és protokollt használva. A sejteket élő, illetve fixált formában (1-2 % PFA-val fixáltuk) is jelöltük.

3.10.2 Jelölés mikroszkópos méréshez

A sejteket (T-sejt, Jurkat sejtvonalak, CHO, HEK stb.) poli-L-lizin bevonatú üveg fedőlemezre cseppentettük, és 1-4 %-os (para)formaldehiddel fixáltuk (sejttől függően), permeabilizáláshoz 0.1 % Triton X-100-at, acetont vagy metanolt használtunk. A nonspecifikus kötődés csökkentése miatt 10%-os FCS/BSA-át tartalmazó oldattal blokkoltunk. A direkt jelölésnél illetve indirekt jelölésnél az elsődleges antitestet 10 % FCS/BSA-PBS/TBS oldatban adtuk a sejtekhez, inkubációs idő 30 min-től 12 óráig terjedt, jelölendő fehérje típusától függően. A másodlagos antitestet 1% FCS/BSA-PBS/TBS-ben adtuk a sejtekhez, inkubációs idő 60 min. A fedőlemezeket Mowiol/Fluoromount G (eBioScience) segítségével rögzítettük a tárgylemezre.

3.10.3 CFSE proliferációs esszé

A T-limfociták proliferációjának vizsgálatához a Lyons és mtsai. által kidolgozott CFSE-hígulási esszé munkacsoportunk által módosított változatát használtuk [235]. Az esszé során membrán-permeábilis, nem fluoreszcens CFDA-SE (karboxifluoreszcein-diacetát-szukcinimidil-észter) oldattal töltöttük a sejteket. A citoplazmába diffundáló CFDA-SE molekulákról intracelluláris észterázok hasítják le a két acetát csoportot, kialakítva a fluoreszcens és nem membránpermeábilis CFSE molekulát. A CFSE intracelluláris fehérjék aminocsoportjaihoz kapcsolódva stabil festék-fehérje konglomerátumokat képez. A lassan metabolizálódó citoskeletális fehérjékhez való kapcsolódás okozza a CFSE-festés hosszú életidejét. A T-limfociták mitotikus osztódása során az utódsejtek CFSE koncentrációja a kiindulási érték felére csökken, így áramlási citométeren jól megfigyelhetőek az egyes

osztódási ciklusokon átment T-limfociták egyes populációihoz tartozó fluoreszcenciacsúcsok. A perifériás vérből frissen szeparált mononukleáris sejtekhez 1 μM -os végkoncentrációban adtuk a CFSE-t, majd a sejtszuszpenziót 15 percig szobahőmérsékleten és 20 percig 37 °C-on inkubáltuk. Tekintve, hogy a CFSE fényérzékeny anyag, a sejteket az áramlási citométeres mérésekig (lásd lentebb) fénytől védve kezeltük és tároltuk. A limfociták szelektív aktivációjához 500ng/ml anti-CD3 és 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD28 szolubilis antitesteket használtunk, mely hatására a sejtek átlagosan naponta-kétnaponta osztódtak. A CFSE-vel jelölt sejtek proliferációját a stimulációt követő ötödik napon vizsgáltuk FACScan típusú citométer segítségével. Az FSC és SSC értékek alapján kaput illesztettünk a limfocitákra, majd a kapu által határolt populációnak vizsgáltuk meg a CFSE fluoreszcencia-hisztogramját. A proliferáció mértékét az osztódások során létrejött utódsejtek és az összes sejt számának hányadosaként definiált osztódási indexszel (OI) jellemeztük, az alábbi képlet segítségével:

$$OI = \left(\sum_{k=1}^n A_k \right) / \left(\sum_{k=0}^n A_k \right)$$

ahol az n darab osztódási ciklus alatt a k ciklusban A_k darab sejt volt a mintában.

3.10.4 NFAT nukleáris transzlokáció vizsgálata

Az siRNS-t tartalmazó NP-kkel kezelt 6×10^5 aktivált T-sejtet 1%-os paraformaldehid-oldatban (Affymetrix) fixáltuk, majd 0,1% Triton X-100-at (Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS-ben permeabilizáltuk. Az NFAT festését Alexa Fluor 488 anti-NFATc1 antitesttel (Biolegend, USA) végeztük a gyártó protokollja szerint. A sejtmagokat DAPI-val (100 nM, Life Technologies) festettük meg. A mintákat ImageStream X áramlási citométerrel (Amnis Corporation, Seattle WA) vizsgáltuk, és a képeket az IDEAS szoftverrel (Amnis Corporation, Seattle WA) elemeztük. Csak az NP pozitív sejtek képeit rögzítettük. Ebből a populációból kiválasztásra kerültek az NFAT és a DAPI jelek szempontjából kettős pozitívnak mutatózó, egyedi sejtek, és az NFAT nukleáris lokalizációját hasonlósági pontszámként számszerűsítettük, amely a kiválasztott egyedi sejtekben a DAPI és az NFAT csatornák pixeleinek korrelációját jelenti.

3.10.5 Áramlási citometria

A sejtek áramlási citometriás méréséhez Novocyte áramlási citométert (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA), LSR II, FACScan citométert (BD Biosciences, USA) használtunk, ha azt másképp nem tüntettük fel.

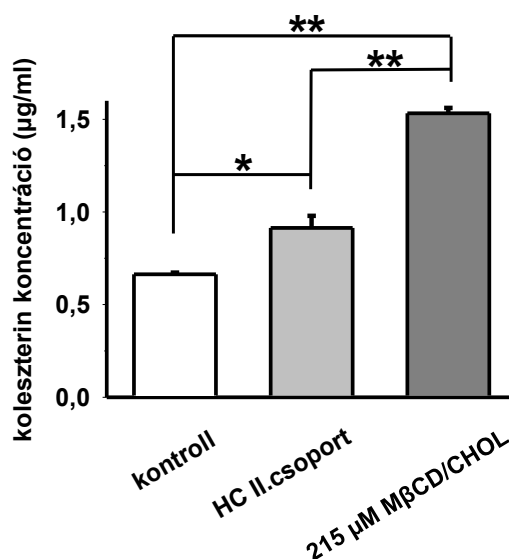
4. Eredmények és megbeszélésük

4.1 A sejtmembrán szterol (7-dehidrokoleszterin, koleszterin) tartalmának hatása a T-sejtek fiziológiájára, ioncsatornáira

4.1.1 Hiperkoleszterinémiás betegek T-sejt aktivációja és Kv1.3 csatorna működésének komparatív vizsgálata

4.1.1.1 A limfocita koleszterintartalom meghatározása hiperkoleszterinémiában

Korábbi irodalmi adatok alapján ismert, hogy hiperkoleszterinémia (HC) esetén megemelkedik a T-sejtek koleszterintartalma [226]. Feltételezésünk szerint az emelkedett koleszterintartalom esetén a membrán koleszterintartalom is emelkedik, ami módosíthatja a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák működését is. A korábbi eredmények megerősítése érdekében első lépésként összehasonlítottuk az egészséges donorokból, illetve hiperkoleszterinémiás betegekből származó limfociták koleszterintartalmát. Pozitív kontrollként normokoleszterinémiás sejteket töltöttünk 1,5 mg/ml (215 μ M) M β CD/CHOL segítségével. A koleszterintartalom meghatározásához az Amplex-Red esszét használtunk. A koleszterin koncentráció meghatározása során kapott értékeket a 280 nm-en mérhető abszorbanciára normáltuk. Ezen a hullámhosszon mért abszorbancia arányos a mintában található fehérje (és a sejtek) mennyiségével, ami lehetővé teszi, hogy a normálás utáni mérési eredmények a sejtszámtól függetlenek legyenek. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a hiperkoleszterinémiás betegekből izolált sejtek koleszterin koncentrációja szignifikánsan magasabb, mint a kontroll sejteké (kontroll: $0,66 \pm 0,01$ μ g/ml, n=3, HC II. csoport: $0,91 \pm 0,07$ μ g/ml, n=3, p=0,007). Azonban a 1,5mg/ml M β CD/CHOL töltés a limfociták koleszterin koncentrációját nemcsak a kontroll, de a II. csoport hiperkoleszterinémiás sejtjeihez képest is magasabb értékre emeli (1,5 mg/ml M β CD/CHOL: $1,53 \pm 0,03$ μ g/ml, n=3, mindkét esetben p <0,001; **14. ábra**)



14. ábra Hiperkoleszterinémiában a limfociták koleszterintartalma emelkedett. A kontroll, HC II. csoport és a 215 µM MβCD/CHOL-lal töltött limfociták koleszterintartalmát Amplex Red koleszterin esszé segítségével határoztuk meg. A szignifikáns eltéréseket * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,001$) jelöli.

4.1.1.2 A Kv1.3 expressziójának vizsgálata hiperkoleszterinémia esetén

Korábbi eredményeink szerint a limfociták koleszterinnel történő töltése lecsökkenti, a koleszterin membránból való kivonása növeli a Kv1.3 expresszióját [236]. Ezek alapján feltételeztük, hogy a megemelkedett koleszterintartalommal jellemezhető HC sejtek Kv1.3 expressziója alacsonyabb, mint a kontroll sejteké. A Kv1.3 ioncsatorna expresszióját közvetett módon, az áramsűrűség meghatározásával jellemeztük. Az áramsűrűséget a teljes-sejt kapacitás és a +50mV-os depolarizáló impulzus során mért csúcsáram hányadosaként definiáltuk. A teljes-sejt kapacitás arányos a sejtmembrán felületével, a csúcsáram pedig a funkcionális csatornák számával. A hányados jól közelíti az egységnyi felületre jutó csatornaszámot, a funkcionális csatornaexpressziót. Eredményeink szerint a hiperkoleszterinémiás állapot nem változtatta meg szignifikánsan a +50mV-on mért csúcsáramot. Ehhez hasonlóan a sejtek kapacitása sem változott meg, melyből következik, hogy az áramsűrűség esetén sem találtunk szignifikáns eltérést. A két betegcsoport között szintén nem volt eltérés (**1. táblázat**).

4.1.1.3 A Kv1.3 ioncsatorna kapuzását jellemző kinetikai paraméterek meghatározása hiperkoleszterinémia esetén

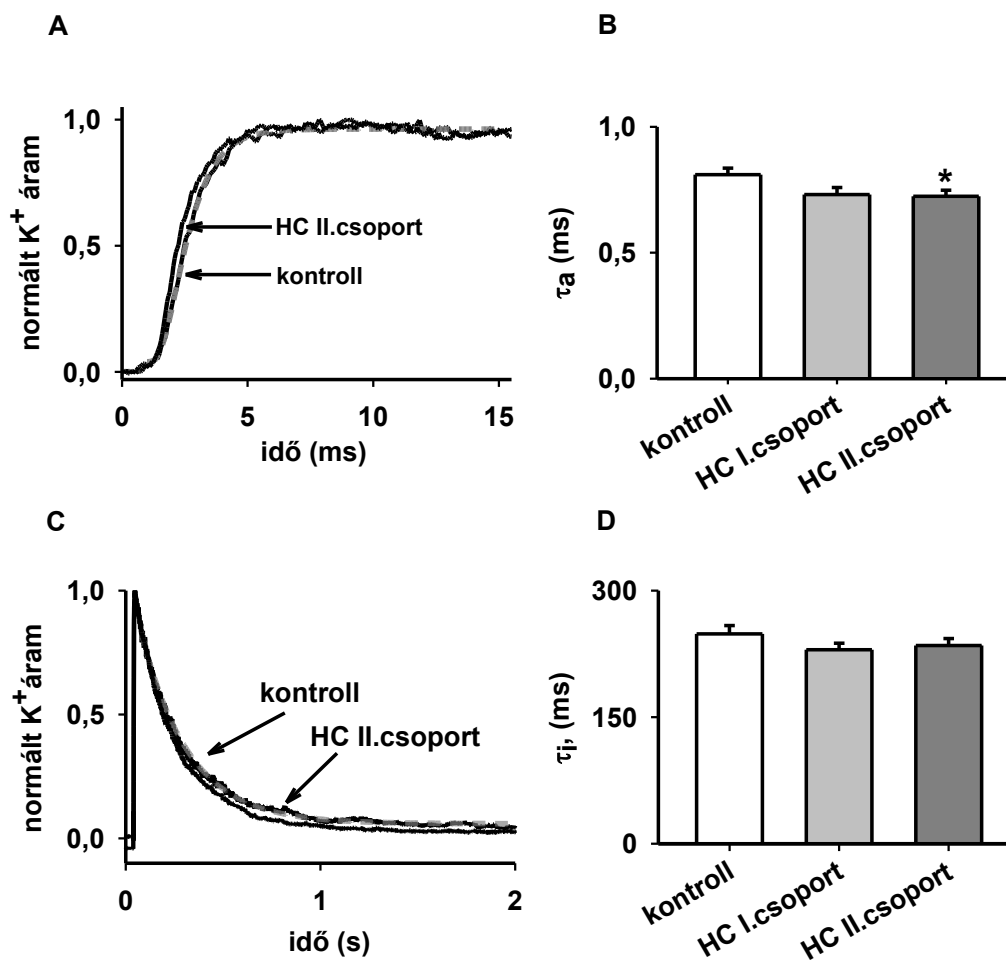
Egészséges donorokból izolált limfociták MβCD/CHOL komplexszel történő töltése lassította a Kv1.3 ioncsatorna aktivációs és inaktivációs kinetikáját [236]. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a hiperkoleszterinémia az in vitro kísérletekhez hasonlóan befolyásolja-e a Kv1.3

ioncsatornák működését. A Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kinetikájának vizsgálatához rövid. 15 ms hosszúságú depolarizáció impulzust alkalmaztunk. A gyorsan aktiválódó Kv1.3 ioncsatornák áramgörbéit a Hodgkin-Huxley szerinti modellel illetve meghatároztuk az aktivációs kinetikát jellemző aktivációs időállandót. Az aktivációs időállandó a HC II. csoport esetén statisztikailag szignifikáns csökkenést mutatott, míg az I. csoport esetén nem volt szignifikánsnak tekintett eltérés a kontrollhoz képest (**15. ábra, 1. táblázat**). A két betegcsoport között nem volt szignifikáns eltérés ($p=0,859$).

A Kv1.3-ra jellemző C-típusú inaktiváció vizsgálatához két másodperc hosszú depolarizációt alkalmaztunk. Az inaktiválódó áramgörbék leszálló szárát exponenciális függvénnyel illetve meghatároztuk az inaktivációs időállandót (τ_i). Az inaktivációs kinetika nem mutatott eltérést a kontroll és a hiperkoleszterinémias betegekből izolált limfociták esetén (**1. táblázat, 15. ábra**). A mérsékelt és a jelentősen emelkedett koleszterinnel jellemzett betegcsoportok között szintén nem volt eltérés.

	kontroll	HC I.csoport	p	HC II. csoport	p
I_{max} (pA)	642,1±44 (n=51)	631,9±48 (n=57)	0,87	620,2±37,4 (n=42)	0,74
C_m (pF)	1,68±0,17(n=51)	1,67±0,12(n=57)	0,96	1,54±0,09(n=42)	0,48
$J_{Kv1.3}$ (pA/pF)	499±65,4 (n=51)	450,7±41(n=57)	0,49	478,1±45,6 (n=42)	0,78
τ_a (ms)	0,81±0,03 (n=51)	0,731±0,03(n=57)	0,07	0,724±0,02 (n=42)	0,02*
τ_i (ms)	243,8±8 (n=41)	229,3±6,9(n=48)	0,17	234,9±8,2(n=35)	0,43
$V_{1/2}$ (mV)	-24,9±0,9 (n=26)	-26,5±1 (n=38)	0,25	-26,1±1(n=27)	0,43
k	10,8±0,4(n=26)	10,4±0,2(n=38)	0,32	10±0,3(n=27)	0,07

1. táblázat A Kv1.3 expresszióját és kapuzását jellemző paraméterek összehasonlítása egészséges (kontroll), mérsékelt (HC I. csoport) és jelentősen emelkedett (HC II. csoport) plazma koleszterinnel rendelkező személyekből izolált limfociták esetén. A táblázatban az átlag ± SEM értékeket tüntettük fel. I_{max} : +50mV-on mért csúcsáram, C_m : teljes-sejt kapacitás, $J_{Kv1.3}$: Kv1.3 áramsűrűség, τ_a : aktivációs időállandó, τ_i : inaktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, k: egyensúlyi aktiváció meredekség, n= sejtszám, * jelöli a statisztikailag szignifikáns ($p<0,05$) eltérést



15. ábra A hiperkoleszterinémia hatása a Kv1.3 kapuzásának kinetikai paramétereire. Az A ábrán egy kontroll és egy HC II. csoportból származó sejt aktivációjának vizsgálata során kapott áramgörbéje látható. Az áramgörbéket a Hodgkin és Huxley által kidolgozott ún. n^4 -es modell szerint illesztettük (szaggatott vonal), majd az aktivációs kinetikát, az aktivációs időállandóval (τ_a) jellemeztük. Az inaktivációs kinetika jellemzéséhez (szaggatott vonallal) egy-exponenciális függvénnyel illesztettük az áramgörbék leszálló ágát és meghatároztuk az inaktivációs időállandót (τ_i). **(B,D)** Az oszlopdiaagramokon az aktivációs és inaktivációs időállandók átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel, * jelöli a szignifikáns eltérést ($p < 0,05$).

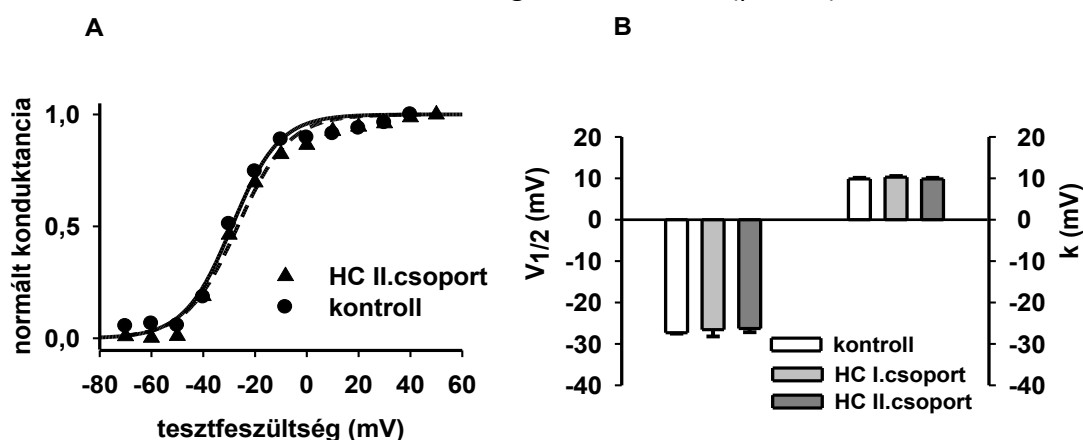
4.1.1.4 Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése

A kinetikai paramétereiket követően megvizsgáltuk a megnövekedett koleszterinszint hatását a Kv1.3 csatorna egyensúlyi aktivációjára. Korábbi *in vitro* kísérleteinkben az áramsűrűség és a kinetikai paraméterek mellett az egyensúlyi aktiváció is megváltozott, a kontroll limfociták félaktivációs feszültsége jobbra tolódott koleszterintöltés hatására [236]. A HC sejtek

egyensúlyi aktivációját két paraméterrel jellemeztük: a félaktivációs feszültséggel (mely megadja azt a membránpotenciál értéket, ahol a csatornák fele nyitott állapotban van) és az egyensúlyi aktiváció meredekségével. Ezen paraméterek a normált konduktancia-tesztfeszültség függvény illesztéséből közvetlenül meghatározhatók (G-V görbe). A kinetikai paraméterekhez hasonlóan az egyensúlyi aktiváció egyik paramétere sem mutatott eltérést hiperkoleszterinémia esetén (**16. ábra, 1. táblázat**) A két betegcsoportok között szintén nem volt eltérés (**1. táblázat**).

4.1.1.5 Hiperkoleszterinémiás betegekből izolált limfociták osztódásának vizsgálata CFSE hígulási esszével

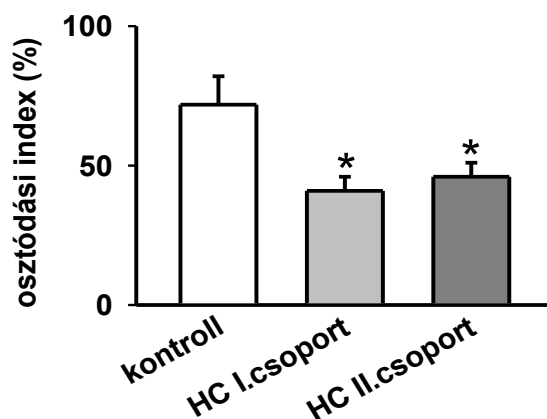
A limfociták proliferációjának vizsgálatát az Anyagok és módszerek fejezetben részletesen ismertetett CFSE esszé segítségével végeztük anti-CD3-anti-CD28 stimulációt követően (Lásd Anyagok és módszerek 3.10.3 fejezet). Az öt napos stimulációt követően a hiperkoleszterinémiás betegek limfocitái szignifikánsan alacsonyabb osztódási indexet (OI) mutattak, mint az egészséges donorokból izolált sejtek (OI_{kontroll}: 71,8±10,2%, n=10; OI_{HC I}: 40,9±5,1%, n=7, p=0,014; OI_{HC II}: 46,0±5,0%, n=11, p=0,02, **17. ábra**). A két betegcsoport átlagos osztódási indexei között nem volt szignifikáns eltérés (p=0,65).



16. ábra. Hiperkoleszterinémia hatására nem változik a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak egyensúlyi aktivációja. (A) Egy kontroll és egy HC II. csoportba tartozó sejt G-V függvénye és hozzá illesztett Boltzmann görbe látható. **(B)** Az egyensúlyi aktivációt jellemző két paraméter (k: meredekség, V_{1/2}: félaktivációs feszültség) átlagai a kontroll és a két betegcsoportból izolált sejtek esetében, hiba: SEM.

Elmondhatjuk, hogy a HC sejtek esetén a mérsékeltebben emelkedett membránkoleszterinszint nem volt elegendő ahhoz, hogy biológiailag szignifikánsan befolyásolja a Kv1.3 ioncsatorna működését. Ezt az elképzelést támasztják alá egy extrém magas (29 mmol/l) szérumkoleszterinnel rendelkező páciens sejtjeinek vizsgálata során kapott eredmények: az

aktivációs és inaktivációs kinetika lassult, és az egyensúlyi aktiváció az in vitro kísérletek során találtakhoz hasonlóan jobbra tolódott ($\tau_{\text{akt}} = 0,97 \pm 0,06$ ms, $n=15$, $\tau_{\text{inakt}} = 289 \pm 10$ ms, $n=7$, $V_{1/2} = -14,3 \pm 4.5$ mV, $n=9$, a kontroll értékeket lásd az **1. táblázatban**). Ezek alapján úgy tűnik, hogy csak a kiugróan magas szérumszinttel rendelkező páciensek esetén lehet biológiailag is jelentős a HC Kv1.3-ra gyakorolt hatása.



17. ábra. A HC betegekből izolált T-sejtek osztódása zavart szenved Az egészséges kontroll és hiperkoleszterinémias T-sejtek CFSE esszével meghatározott osztódási indexe, *: $p < 0.05$.

A hiperkoleszterinémias sejtek vizsgálata során csökkent T-sejt proliferációt találtunk. Mivel a Kv1.3 működése ezen sejtekben nem változott jelentősen, hiszen markáns változást nem találtunk se az expressziós szintben, sem a biofizikai jellemzőkben (kinetikai és egyensúlyi) más oknak kell az eltérés mögött állni. A T-sejt proliferáció szabályozásában a Kv1.3-on kívül számos membrán transzporter, jelátviteli molekula és csatorna vesz részt [3, 237]. Elképzelhető, hogy ezek valamelyike már olyan koncentrációban is érzékeny a membrán koleszterintartalmának megváltozására, ami a Kv1.3 esetében még nem okoz eltérést. A hiperkoleszterinémia során felhalmozódó egyéb lipidek a csatorna működésétől függetlenül a csökkent proliferációért is felelősek lehetnek. A T-sejtek oxidált szterolszármazékokkal történő töltése nem volt hatással az aktiváció során kialakuló kalciumjelre, azonban gátolta az aktivációt követő membrán kondenzációt és az aktin filamentumok reorganizációját [238]. A koleszterin egyik természetes analógja, a koleszterin szulfát koncentrációja szintén megemelkedik hiperkoleszterinémiában, gátolva a T-sejt aktivációjának korai szakaszát [239]. A T-sejt aktiváció és proliferáció különböző szintjeire (TCR aktiváció, kalciumjel, NFAT függő

hajdu.peter.4_343_25

jelátviteli útvonalak, stb.) kiterjedő részletes vizsgálat segíthetne pontosabban meghatározni a hiperkoleszterinémia limfocitákra gyakorolt kórélettani hatásait.

4.1.2 Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindrómás betegek T-sejt Kv1.3 csatorna működés és aktiváció/proliferáció változásának vizsgálata

4.1.2.1 A SLOS sejtek szterolösszetételének vizsgálata GC-MS módszerrel

Mivel az Amplex-Red esszével nem lehet különbséget tenni a koleszterin és oxidált/redukált származékai között, ezért az SLOS betegekből származó sejtek szterol-összetételének vizsgálatához GC-MS módszert alkalmaztunk (ezen kísérleteket Dr. Péter Mária, az SZBK munkatársa végezte). A perifériás vérből származó minták térfogata rendkívül limitált ezért kísérleteinkben limfociták helyett a nagy mennyiségben izolált vörösvértestek (vvt) szterolösszetételét határoztuk meg. A vvt mérés további előnye, hogy fejlett intracelluláris membránrendszerek hiányában a teljes sejt szterolmérése jó megközelítést ad a membrán koleszterinösszetételére. Az irodalmi adatoknak megfelelően minden egyes SLOS mintában sikerült azonosítanunk a kórjelző 7-dehidrokoleszterint, valamint izomerét, a 8-dehidrokoleszterint [202, 240]. Kontroll mintáink esetében nem voltak detektálhatóak ezen vegyületek (**2. táblázat**). Eredményeink alátámasztják a korábbi megfigyeléseket, mely szerint a prekursor molekulák koncentrációjának növekedése mellett a sejtek koleszterinkoncentrációja szignifikánsan csökkent ($p=0,031$) [204, 241]. Az összkoleszterin és 7DHC koncentrációk mellett meghatároztuk a minták 7DHC/CHOL arányát is, mely hasonló értékeket mutatott a korábbi egyetlen átfogó tanulmányban közölt eredményekhez (**2. táblázat**) [204].

4.1.2.2 A Kv1.3 ioncsatorna expresszió vizsgálata SLOS esetén

SLOS esetén a sejtmembrán koleszterinszintjének csökkenésén túl az előalakok (pl. 7DHC, 8DHC) koncentrációja jelentősen megemelkedik. Nem ismeretes azonban az, hogy e vegyületek tudják-e helyettesíteni akár részben akár teljes mértékben a koleszterin élettani funkcióit [199]. Az ioncsatornák működését számos ponton befolyásolhatja a sejtmembrán szteroljainak megváltozott aránya a (trafficking, laterális diffúzió, kapuzás). Az *in vitro* kísérletekben a koleszterin membránból történő kivonása a Kv1.3 expressziójának csökkenéséhez, a kinetikai paraméterek gyorsulásához vezetett [176]. Nincs azonban adat arra vonatkozólag, hogy a csökkent koleszterin mellett az SLOS-ben megjelenő prekursor molekulák milyen hatással vannak a Kv ioncsatornák működésére. Munkánk során az SLOS ioncsatornákra gyakorolt hatását (a hiperkoleszterinémiához hasonlóan) a betegekből izolált limfociták Kv1.3 csatornáin keresztül tanulmányoztuk. A csatorna expresszióját ismételt

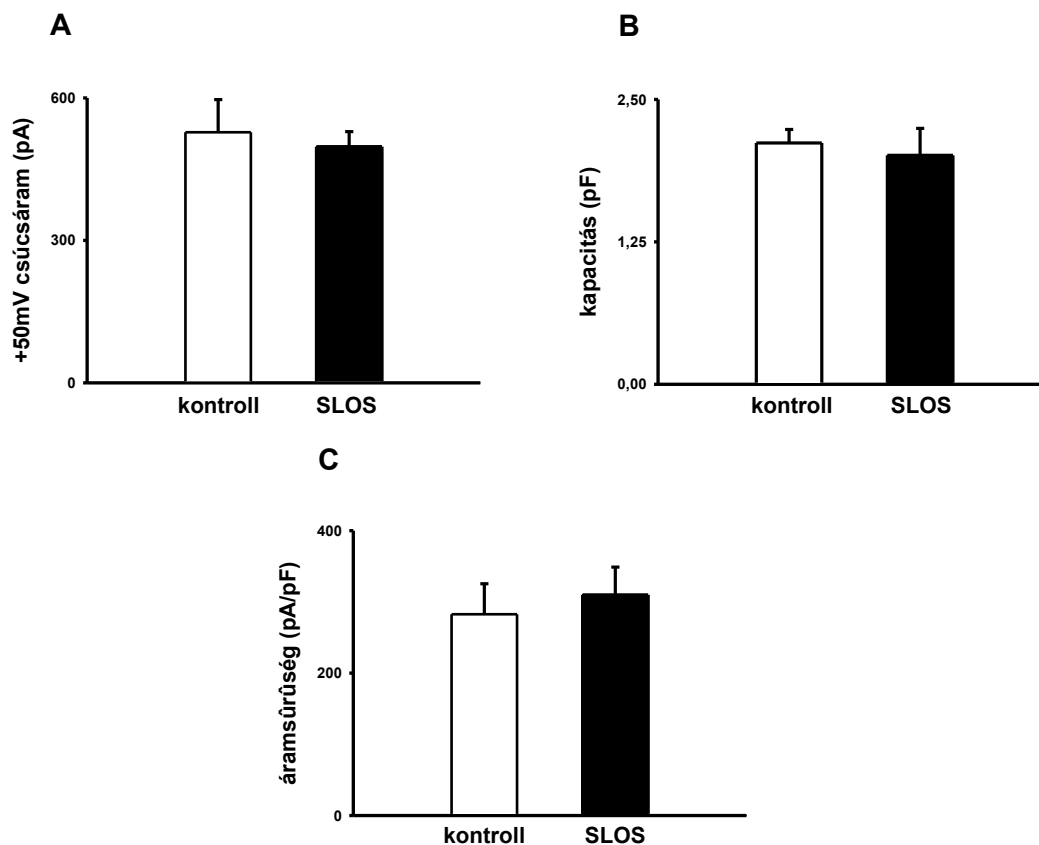
indirekt módon, az áramsűrűség meghatározásával jellemeztük. Az SLOS sejtek esetén a +50 mV tesztpotenciálon mért csúcsáram, a teljes-sejt membránkapacitása és a kettő hányadosaként definiált áramsűrűség nem tért el a kontroll sejtek esetén mért értékektől (18. ábra, 3. táblázat). Az áramsűrűség változatlan értéke arra utal, hogy az egységnyi felületre funkcionális csatornák száma nem változik SLOS-ben.

minta sorszám	klinikai súlyosság	szterolkoncentráció (mmol/L)		
		CHOL	7DHC	7DHC/CHOL
SLO#1	E	0,93	0,10	0,11
SLO#2	E	1,23	0,30	0,25
SLO#3	E	1,48	0,11	0,08
SLO#4	T	1,73	0,93	0,54
SLO#5	T	3,44	0,53	0,16
SLO#6	T	0,13	0,76	5,63
SLO#7	T	0,10	0,67	6,47
átlag±SEM	–	1,29±1,14	0,49±0,32	1,89±2,86
control#1	–	5,08	ND	–
control#2	–	4,75	ND	–
control#3	–	4,36	ND	–
control#4	–	4,83	ND	–
control#5	–	2,46	ND	–
átlag±SEM	–	4,3±0,47	–	–

2. táblázat SLOS és egészséges minták szterolösszetétele. Az egyes minták különböző személyektől származnak. (CHOL: koleszterin; 7DHC: 7-dehidrokoleszterin; ND: nem detektálható; E: enyhe; T: tipikus)

	kontroll	SLOS	p
I_{peak} (pA)	528,0 ± 69 (n=56)	497,5 ± 318 (n=51)	0,695
C_m (pF)	2,1 ± 0,1 (n=56)	2,0 ± 0,2 (n=51)	0,688
$J_{Kv1.3}$ (pA/pF)	282,5 ± 42,9 (n=56)	309,8 ± 39 (n=51)	0,645
τ_a (ms)	0,59 ± 0,02 (n=56)	0,75 ± 0,03 (n=51)	0,001*
τ_i (ms)	227,8 ± 14,2 (n=38)	253,7 ± 21,4 (n = 45)	0,329
$V_{1/2}$ (mV)	-26,9 ± 0,9 (n=41)	-22,0 ± 1,9 (n=35)	0,030*
k	11,7 ± 0,5 (n=41)	10,6 ± 0,5 (n=35)	0,140

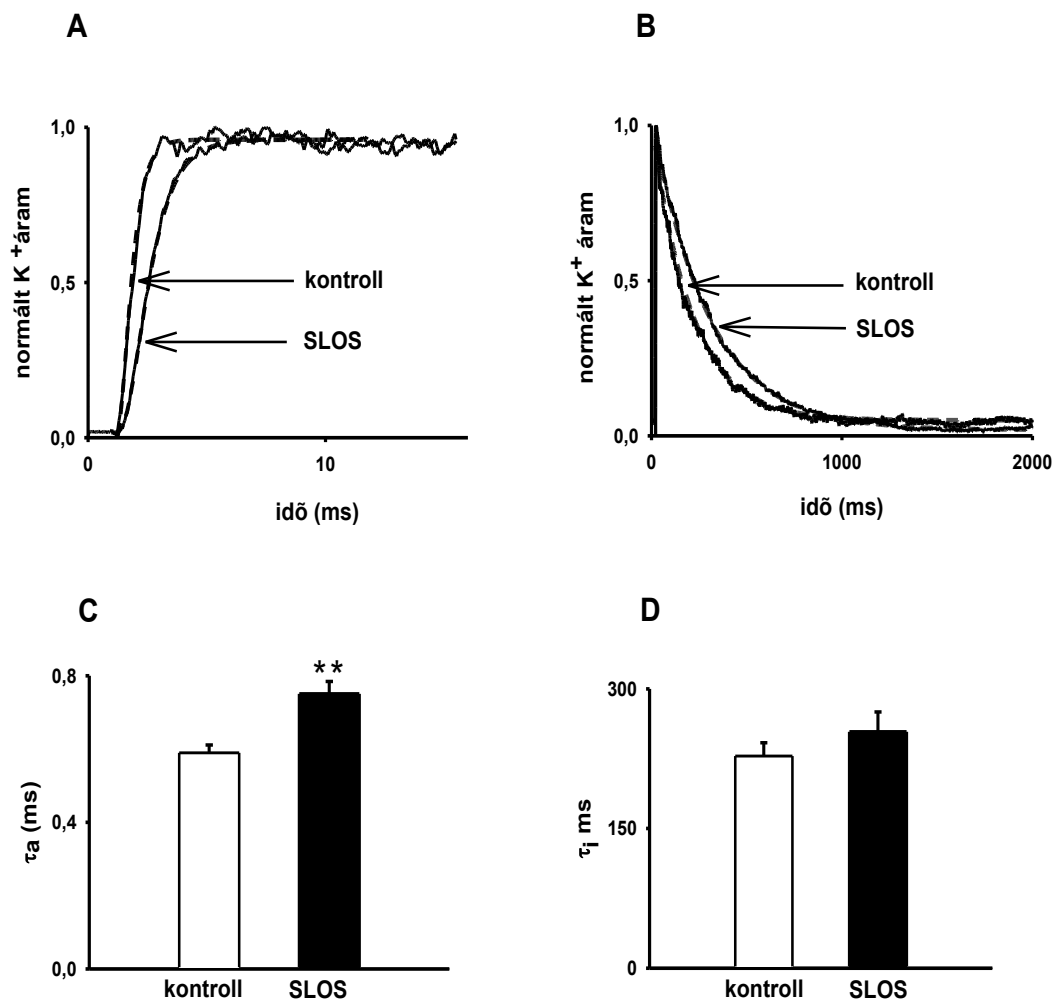
3. táblázat. A Kv1.3 expresszióját és kapuzását jellemző paraméterek összehasonlítása egészséges (kontroll), és SLOS személyekből izolált limfociták esetén. A táblázatban az átlag ± SEM értékeket tüntettük fel. I_{max} : +50mV-on mért csúcsáram, C_m : teljes-sejt kapacitás, $J_{Kv1.3}$: Kv1.3 áramsűrűség, τ_a : aktivációs időállandó, τ_i : inaktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, k: egyensúlyi aktiváció meredekség, n= sejtszám, * jelöli a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést



18. ábra. SLOS hatására nem változik a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak expressziója. Kontroll és SLOS T-sejtek +50 mV-on mért csúcsáramainak (A), teljes-sejt kapacitásainak (B) és áramsűrűségeinek (C) átlagértéke. Mindegyik panelen átlag \pm SEM értéket ábrázoltunk.

4.1.2.3 Kv1.3 kapuzását jellemző biofizikai paraméterek meghatározása SLOS esetén

A kinetikai paraméterek vizsgálatát az Anyagok és módszerek 3.5.1 fejezetében leírtaknak megfelelően végeztük. Az **19. ábra** (A és B panel) egy reprezentatív kontroll és SLOS sejt Kv1.3 áramgörbéit mutatja, melyek alkalmasak az aktivációs és az inaktivációs kinetika jellemzésére. Az áramgörbéket illesztve meghatároztuk az aktivációs és inaktivációs időállandókat (**19. ábra**, C és D panel). Az SLOS sejtek aktivációs időállandója szignifikánsan megnőtt a kontroll sejtekhez viszonyítva, az inaktivációs kinetika esetén azonban nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés (**3. táblázat**). Az aktivációs időállandó növekedéséből a csatorna aktivációjának lassulására következtethetünk, mely negatívan befolyásolhatja a Kv1.3 élettani működését.

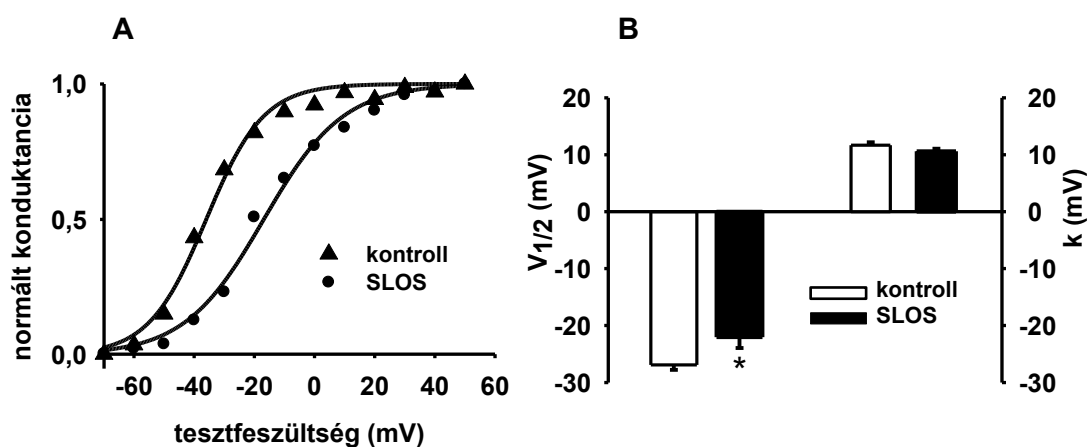


19. ábra. A SLOS hatására lassul a Kv1.3 aktivációs kinetikája. (A) rövid depolarizációs impulzus hatására (15 ms, +50 mV) aktiválódó Kv1.3 ioncsatornák reprezentatív áramgörbéi láthatóak egy SLOS és kontroll sejten regisztrálva. A B ábrán egy kontroll és egy SLOS sejt inaktivációs áramgörbéje látható. Az oszlopdiagrammok az aktivációs (C) és inaktivációs (D) időállandók átlag \pm SEM értékeit tüntették fel, ** jelöli a szignifikáns eltérést ($p < 0,001$).

4.1.2.4 Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése

Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését jellemző félaktivációs feszültség és meredekség az ioncsatornák működésének élettani szempontból az egyik legfontosabb paramétere. Ennek ismeretében meg lehet határozni a nyitott és zárt csatornák arányát egy adott membránpotenciálon. A **20. ábra** A részén egy reprezentatív kontroll és SLOS sejt G-V görbéje látható. Az SLOS-sejt egyensúlyi aktivációját jellemző Boltzmann-görbe a kontrollhoz viszonyítva jobbra tolódott, azaz ugyanolyan nyitási valószínűség eléréséhez az SLOS sejteket pozitívabb értékekre kell depolarizálni, mint a kontroll sejteket. A félaktivációs feszültség

szignifikáns növekedésével szemben az egyensúlyi aktiváció meredeksége nem változott meg (20. ábra B panel, 3. táblázat).

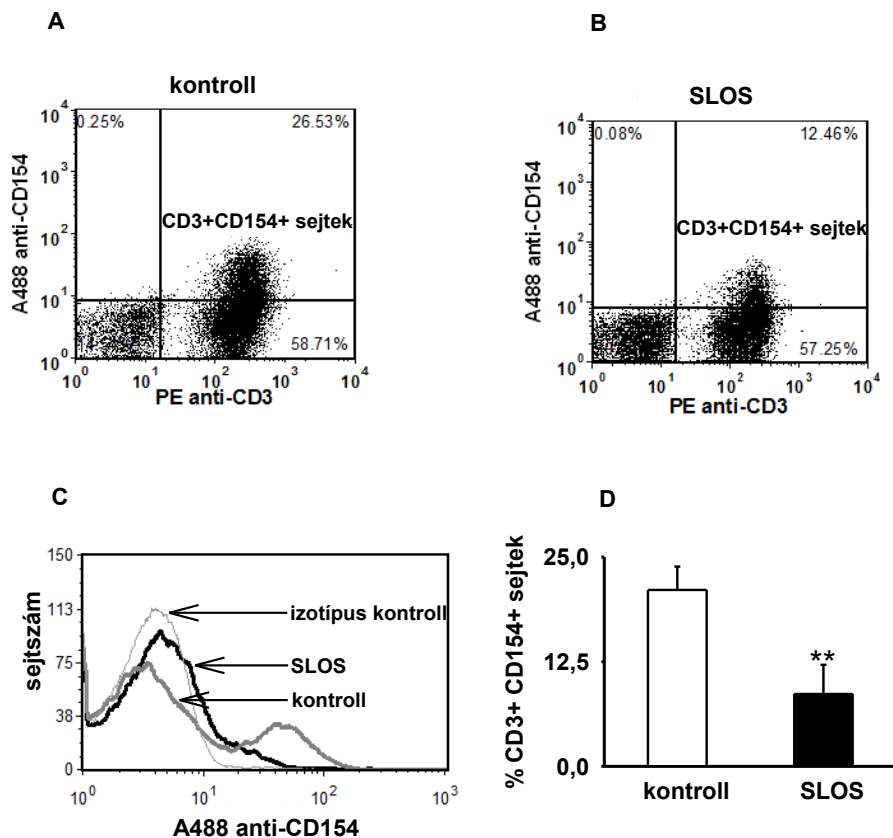


20. ábra. Az egyensúlyi aktiváció jobbra tolódik az SLOS-ből izolált limfociták esetén. Az A ábrán egy kontroll és egy SLOS sejt reprezentatív G-V görbéje látható. (B) Az oszlopdiagramon a félaktivációs feszültség és meredekség átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel, * jelöli a szignifikáns eltérést $p < 0,05$ esetén.

4.1.2.5 SLOS-ből izolált limfociták aktivációjának és proliferációjának vizsgálata

A T-limfociták aktivációjában és proliferációjában központi szerepet játszik a kalciumjel és az ehhez kapcsolódó jelátviteli útvonalak. A kalciumjel kialakításában esszenciálisnak tűnik a feszültségfüggő Kv1.3 és a kalciumraktárak ürülésének hatására aktiválódó CRAC csatornák összehangolt működése. Hipotézisünk szerint a sejtmembrán megemelkedett 7DHC/CHOL aránya negatívan befolyásolja a kalciumjel kialakításában részt vevő (pl. Kv1.3) ioncsatornák működését mely a T-sejt aktiváció és proliferáció károsodásához vezethet. A T-sejt aktiváció következtében számos kalciumfüggő sejtfelszíni molekula expressziója megemelkedik, ezek monitorozása indirekt információt szolgáltat a limfociták aktivációjáról. Kísérleteinkben thapsigargin inkubációt követően vizsgáltuk egy korai T-sejt aktivációs marker, a CD154 (más nomenklatúrában CD40 ligand/CD40L) expresszióját. A CD154 expressziója normál körülmények között az aktivációt követően megemelkedő intracelluláris kalciumszint hatására rövid időn belül megemelkedik [242]. Kísérleteinkben 3 órán keresztül stimuláltunk egészséges és SLOS mononukleáris sejteket. Az aktivációt követően PE-konjugált anti-CD3-mal és Alexa-488 konjugált anti-CD154-gyel jelöltük a sejteket. A T-sejteket a CD3 pozitivitás alapján azonosítottuk. Eredményeink szerint az SLOS betegekből izolált sejtek esetén zavart szenved a T-sejt aktiváció, a CD154 pozitív T-sejtek aránya szignifikánsan csökkent (21. ábra).

A limfociták aktivációját a sejtek osztódása követi. Az SLOS sejtek proliferációjának vizsgálatához a korábban ismertetett CFSE hígulási essét alkalmaztuk. A T-sejteket anti-CD3 és anti-CD28 antitestek segítségével aktiváltuk, majd öt nappal később ellenőriztük a sejtek

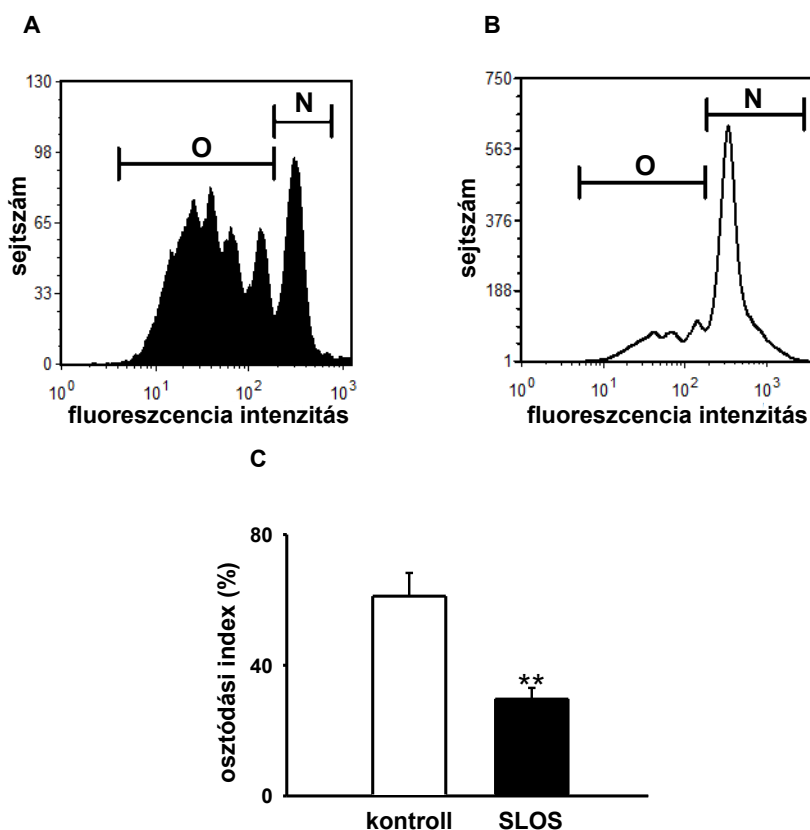


21. ábra. A T-sejt aktiváció zavart szenved SLOS-ben A CD3⁺ T-sejtek aktivációját egy korai aktivációs marker, a CD 154 expressziójával monitoroztuk. Az **A** és **B** ábrán egy aktivált kontroll és SLOS minta PE anti-CD3 és A488 anti-CD154 jelölést követő reprezentatív dot-plotja látható. A **C** ábrán ugyanazon minták CD3⁺ sejtjeinek A488 anti-CD154 fluoreszcencia intenzitása látható az izotípus kontroll feltüntetésével. **(D)** Az oszlopdiaagramon a CD154 pozitív sejtek arányának átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel, ** jelöli a szignifikáns eltérést ($p < 0,001$).

osztódását. Az SLOS betegekből izolált sejtek osztódási indexe jelentősen csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva (**22. ábra**, $OI_{\text{kontroll}}: 61,1 \pm 7,1\%$, $n = 5$; $OI_{\text{SLOS}}: 29,4 \pm 3,5\%$, $n = 6$, $p = 0,002$).

4.1.2.6 SLOS állapot modellezése: a 7DHC szint változtatása M β CD/7DHC komplexszel és hatása a Kv1.3 áramsűrűsége

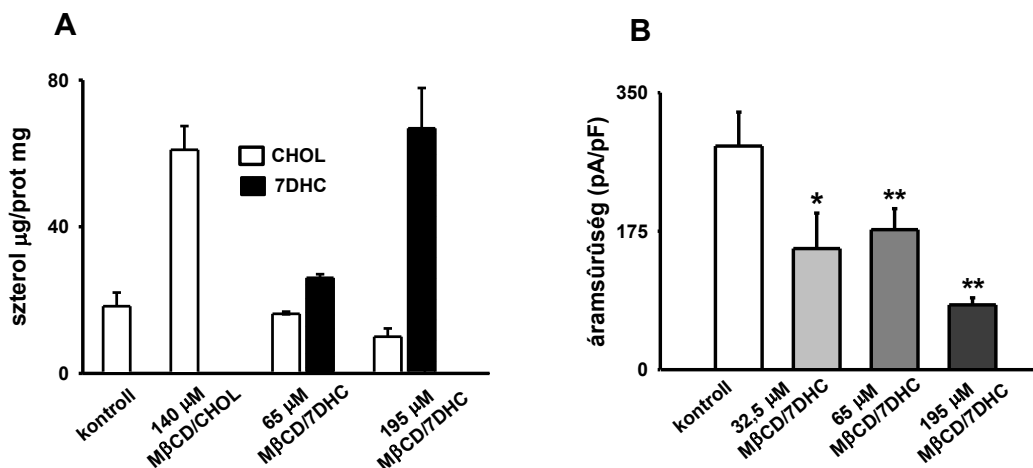
Feltételezhetően a sejtmembrán megváltozott szterol összetétele (elsősorban a 7DHC feldúsulása) tehető felelőssé a megváltozott Kv1.3 ioncsatorna működéséért SLOS T-sejtekben. Ennek igazolására létrehoztunk egy modellrendszert, ahol *in vitro* körülmények között növeltük a T-sejtek 7DHC-tartalmát, létrehozva az SLOS-re jellemző emelkedett



22. ábra. SLOS-ban csökken a T-sejtek osztódási indexe. Az egészséges donorokból izolált kontroll és SLOS sejtek proliferációját CFSE hígulási esszével követtük. Az **A** és **B** ábrán egy kontroll (**A**) és egy SLOS (**B**) minta CFSE eloszlási histogramja látható az öt napos stimulációt követően. N-el jelöltük a kiindulási fluoreszcencia tartalommal rendelkező (nem osztódott) sejteket, míg O jelöli az osztódások következtében alacsonyabb fluoreszcencia intenzitással jellemezhető utódsejteket. (**C**) Az oszlopdiagramon az osztódási indexek átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel, ** jelöli a szignifikáns eltérést ($p=0,002$)

7DHC/CHOL arányt: a töltéshez 7DHC/M β CD komplexszel végeztük. Az egészséges donorokból izolált mononukleáris sejteket több koncentrációban inkubáltuk 7DHC/M β CD-vel, majd GC-MS technikával ellenőriztük a töltés hatékonyságát. Eredményeink szerint a töltés dózis függő módon emelte a sejtek 7DHC koncentrációját és csökkentette a koleszterin tartalmát, kialakítva az SLOS-re jellemző szterol összetételt (**23. ábra**; fehérje tartalomra normált 7DHC

koncentráció 65 μ M M β CD/7DHC töltést követően 26,1 \pm 1,0 μ g/mg, míg 195 μ M M β CD/7DHC töltést követően 66,8 \pm 11 μ g/mg. A fehérje tartalomra normált koleszterin koncentráció: 18,3 \pm 3,7 μ g/mg a kontroll esetén, 65 μ M M β CD/7DHC töltés követően 16,2 \pm 0,2 μ g/mg, míg 195 μ M M β CD/7DHC töltést követően 13,3 \pm 2 μ g/mg). Ezen adatok alapján a 7DHC töltött sejtek alkalmasak lehetnek az SLOS sejtszintű hatásainak modellezésére.



23. ábra. M β CD/7DHC töltés modellezi az SLO szindróma hatását a sejtek szterolösszetételére. (A) Az egészséges donorokból izolált kontroll sejteket különböző koncentrációjú M β CD/7DHC komplexszel töltöttük, majd GC-MS készülék segítségével vizsgáltuk a sejtek szterolösszetételét. Pozitív kontrollként M β CD/CHOL komplexet alkalmaztunk. A minták 7DHC tartalma dóziszfüggő emelkedést mutatott, míg a koleszterin csökkent. A minták 7DHC/koleszterin aránya a SLOS-re jellemzően, szignifikánsan megemelkedett. **(B)** A 7DHC-val töltött sejtek áramsűrűsége a kezelés hatására csökkent.

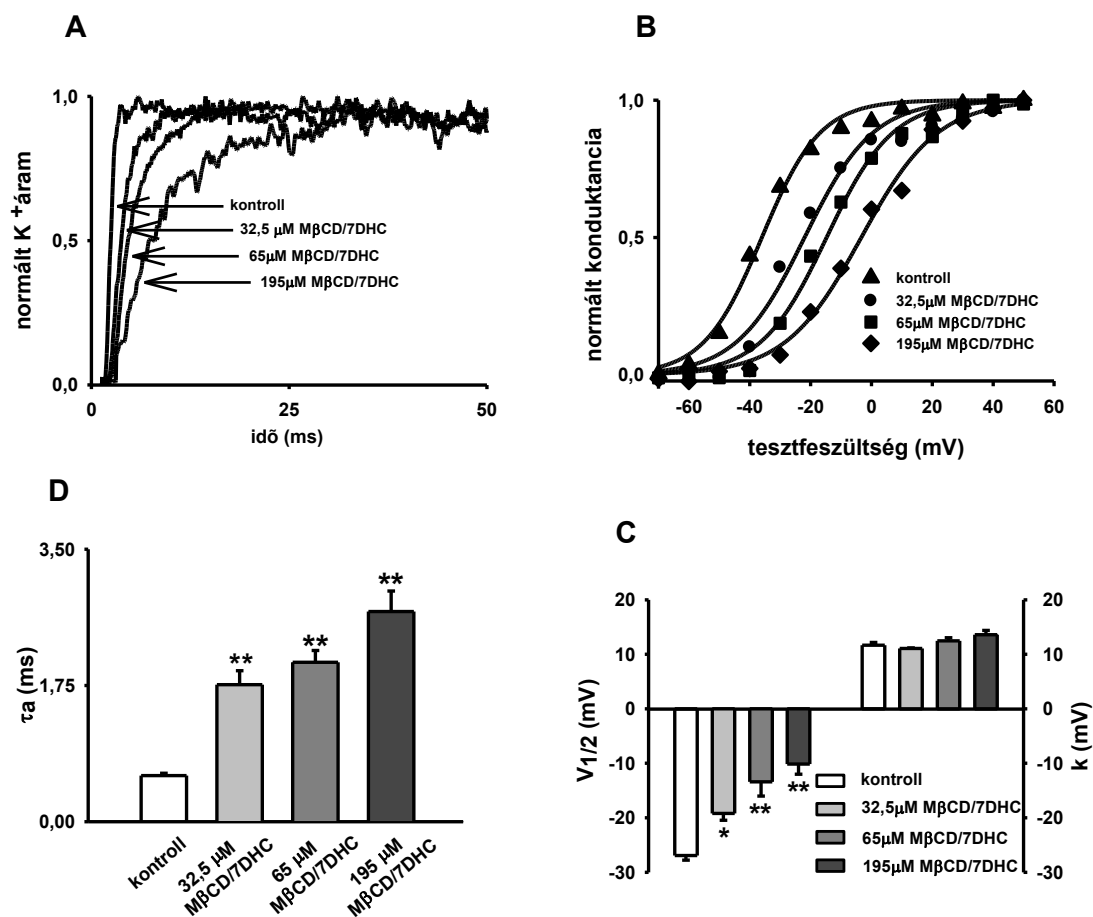
A csatorna expresszióját a korábbiakhoz hasonlóan, az áramsűrűség meghatározásával, indirekt módon jellemeztük. A 7DHC töltés hatására a teljes-sejt kapacitás nem változott, a +50mV-os depolarizációs során mért csúcsáram azonban a kezelés koncentrációjával fordított arányosan változott. A két paraméter hányadosaként definiált áramsűrűség szignifikánsan, dózis-függően csökkent (**23. ábra, 4. táblázat**). SLOS betegek T-sejtjeiben valószínűleg azért nem észleltünk hasonló csökkenést, mert krónikus 7DHC expozíció esetén a sejt kompenzáló mechanizmussal védekezett, míg az általunk alkalmazott kezelés rövidsége miatt ez a folyamat (Kv1.3 csatornák expressziójának megemelése) nem ment végbe.

4.1.2.7 Kv1.3 ioncsatornák kapuzási paraméterei az SLOS modellrendszerben

A 7DHC töltés hatására a csatorna aktivációs és inaktivációs kinetikája egyaránt lelassult (**24. ábra** A és C panele, **4. táblázat**), az M β CD/7DHC koncentrációjának növelésével párhuzamosan az aktivációs, inaktivációs időállandó is dózis függően növekedett. Az egyensúlyi aktiváció esetében a G-V görbe dózis függően jobbra tolódott, a félaktivációs feszültség pedig szignifikánsan megnőtt (**4. táblázat**, **24. ábra** B és D panel). Az egyensúlyi aktiváció meredeksége nem változott. Ezen eltérések iránya megegyezik az SLOS-ben találtakkal, mértékük azonban sokkal kifejezettebb.

	kontroll	32,5 μ M				65 μ M				195 μ M			
		CHOL	ρ	7DHC	ρ	CHOL	ρ	7DHC	ρ	CHOL	ρ	7DHC	ρ
I_{max} (pA)	528,0 \pm 69 (n=56)	311 \pm 23,8 (n=5)	0,023*	296,5 \pm 52,5 (n=7)	0,002*	359,54 \pm 3 6,60 (n=5)	0,060	300,0 \pm 37,4 (n=11)	0,003*	240,11 \pm 51,1 (n=7)	<0,001*	174,8 \pm 9,1 (n=11)	<0,001*
C_m (pF)	2,1 \pm 0,1 (n=56)	2,42 \pm 0,2 (n=5)	0,722	2,20 \pm 0,22 (n=7)	0,80	1,76 \pm 0,27 (n=5)	0,81	2,02 \pm 0,29 (n=11)	0,81	1,89 \pm 0,25 (n=7)	0,614	2,26 \pm 0,21 (n=11)	0,65
J (pA/pF)	282,5 \pm 42,9 (n=56)	132,6 \pm 14,8 (n=5)	0,024*	153,0 \pm 44,8 (n=7)	0,005*	222,81 \pm 3 9 (n=5)	0,257	176,9 \pm 26,5 (n=11)	0,002*	150,97 \pm 46,05 (n=7)	0,012*	81,9 \pm 8,9 (n=11)	<0,001*
τ_a (ms)	0,59 \pm 0,02 (n=56)	0,75 \pm 0,15 (n=5)	0,40	1,76 \pm 0,18 (n=7)	<0,001*	0,99 \pm 0,09 (n=5)	0,059	2,04 \pm 0,15 (n=11)	<0,001*	1,05 \pm 0,09 (n=5)	0,02*	2,70 \pm 0,26 (n=11)	<0,001*
τ_i (ms)	227,8 \pm 14,2 (n=38)	188,96 \pm 9,82 (n=5)	0,101	318,57 \pm 22 (n=5)	0,064	204,47 \pm 3 1,41 (n=5)	0,653	339 \pm 57 (n=6)	0,02*	220,17 \pm 9,96 (n=5)	0,757	362 \pm 26,4 (n=5)	<0,001*
$V_{1/2}$ (mV)	-26,9 \pm 0,9 (n=41)	-24,4 \pm 3,1 (n=5)	0,318	-19,2 \pm 1,3 (n=6)	<0,001*	-17,4 \pm 0,58 (n=5)	0,024 *	-13,4 \pm 2,6 (n=9)	<0,001*	-16,2 \pm 2,72 (n=5)	<0,001*	-10,1 \pm 1,9 (n=9)	<0,001*
k	11,7 \pm 0,5 (n=41)	13,96 \pm 1,9 (n=5)	0,103	11,07 \pm 0,11 (n=6)	0,53	11,282 \pm 1 ,07 (n=5)	0,73	12,48 \pm 0,56 (n=9)	0,34	15,19 \pm 2,07 (n=5)	0,038*	13,58 \pm 0,80 (n=9)	0,03*

4. táblázat. Azonos koncentrációjú koleszterin és 7DHC töltés Kv1.3 ioncsatorna gyakorolt hatása. A táblázatban az átlag \pm SEM értékeket tüntettük fel. I_{max} : +50mV-on mért csúcsáram, C_m : a teljes-sejt kapacitás, J: áramsűrűség, τ_a : aktivációs időállandó, τ_i : inaktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs-feszültség, k: egyensúlyi aktiváció meredeksége; n= sejtszám; * jelöli a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns eltéréseket.

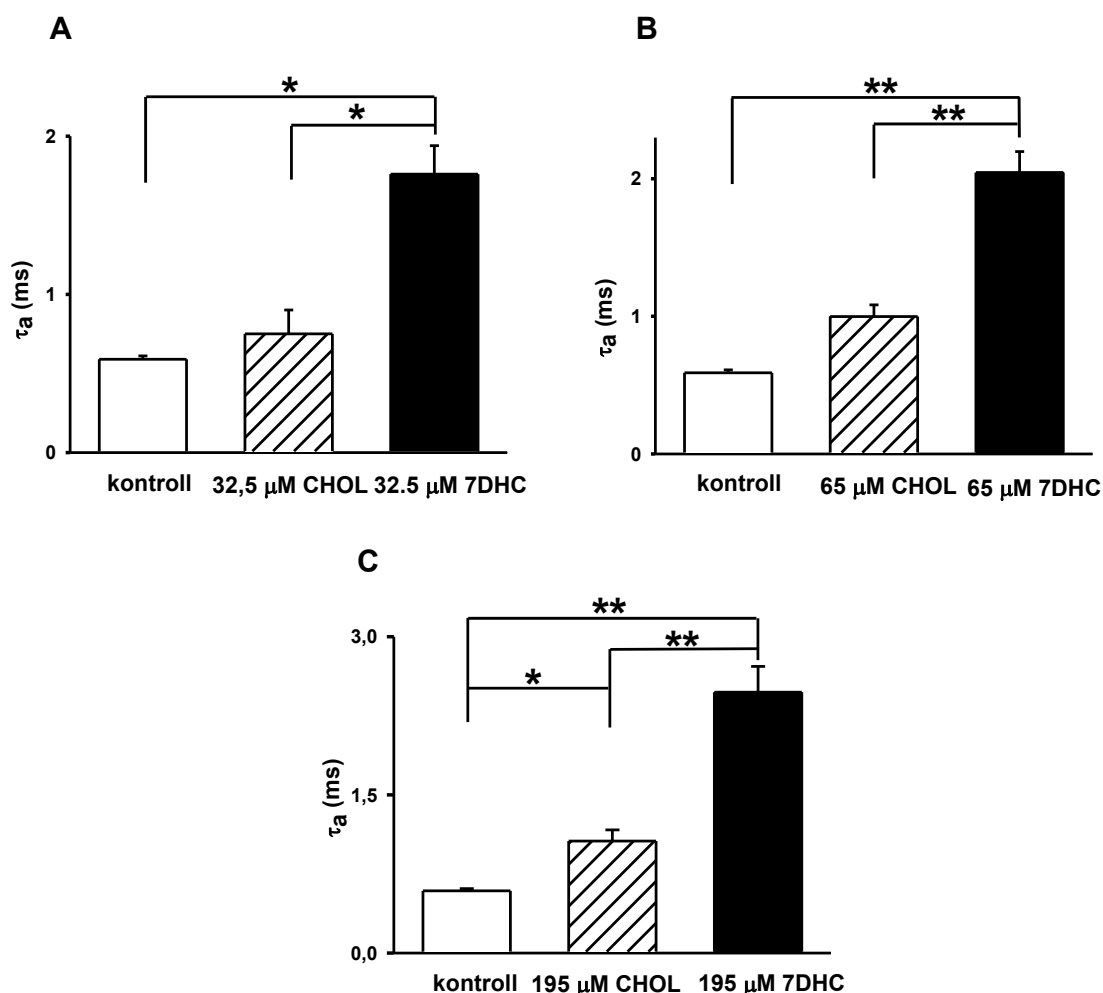


24. ábra MβCD/7DHC komplexszel történő kezeléssel modellezni lehet az SLOS-ban talált eltéréseket. Különböző koncentrációjú MβCD/7DHC töltést követően regisztrált reprezentatív áram (A) és G-V görbék (B). Az oszlopdiagramokon az aktivációs időállandók (C), valamint az egyensúlyi aktiváció félaktivációs feszültségének és meredekségének (D) átlag ± SEM értékeit tüntettük fel. A szignifikáns eltéréseket * (p<0,05) és ** (p<0,001) jelöli.

4.1.2.8 A CHOL és 7DHC Kv1.3 csatornára gyakorolt hatásának összehasonlítása

Korábbi eredményeink szerint az *in vitro* koleszterin töltés a 7DHC töltéshez hasonlóan lassította a Kv1.3 csatorna kinetikai paramétereit, az egyensúlyi aktivációt pedig a pozitívabb membránpotenciálok felé tolta el [176]. Felmerül a kérdés, hogy van-e eltérés a koleszterin illetve 7DHC töltés hatása között, vagy a két molekula teljesen azonos módon, az össz-szterol koncentráció emelésén keresztül hat a csatornákra. Ennek eldöntéséhez azonos koncentrációjú koleszterin és 7DHC töltést alkalmaztunk egészséges donorokból izolált limfociták esetén, majd megvizsgáltuk a Kv1.3 biofizikai paramétereit. Az elektrofiziológiai mérések alapján a két szterol hasonlóan hat a Kv1.3 működésére, azonban a Kv1.3 ioncsatorna sokkal érzékenyebb azonos koncentrációjú 7DHC töltésre, mint koleszterinre. 32,5 μM 7DHC töltés esetén már szignifikánsan növekedett az aktivációs időállandó és a félaktivációs

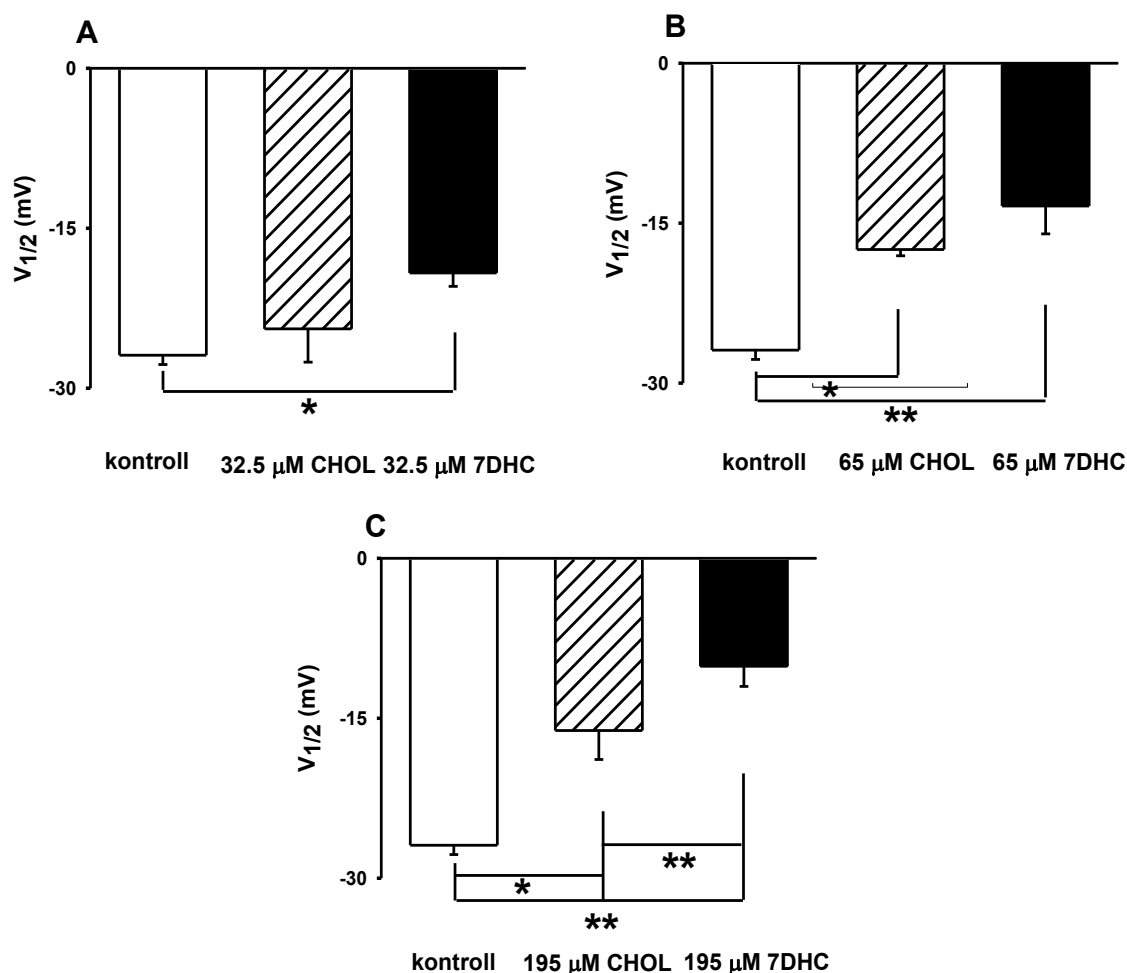
feszültség, míg a koleszterinnel végzett töltésnek ilyen körülmények között nem volt hatása. Magasabb koncentrációjú koleszterin a 7DHC töltéshez hasonlóan szignifikáns eltéréseket okozott azonban a 7DHC hatása minden esetben statisztikailag jelentősebb volt a koleszterinhez viszonyítva (25. ábra, 26. ábra, 4. táblázat).



25. ábra. Az azonos koncentrációjú 7DHC és CHOL töltés eltérő mértékben lassítja a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak aktivációs kinetikáját. Az oszlopdiagramokon 32,5 (A) 65 (B) és 195 (C) μM 7DHC és CHOL töltést követően meghatározott aktivációs időállandók átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel. A szignifikáns eltéréseket *($p < 0,05$) és **($p < 0,001$) jelöli.

Az SLOS donorokból izolált limfociták teljes-sejt konfigurációban történő patch-clamp vizsgálata során azt kaptuk, hogy szignifikánsan megváltozott a Kv1.3 ioncsatorna működése: az aktivációs kinetika lassult, az egyensúlyi aktiváció pedig jobbra tolódott. A koleszterin szintézis károsodásával járó betegségekben a mai napig nem ismert (a klinikai és sejtszintű vizsgálatokban egyaránt), hogy a koleszterinszint csökkenése vagy az enzimblokk következtében felhalmozódó prekursor molekulák megjelenése okozza elsődlegesen a

rendellenességeket. A Kv1.3 működésének megváltozása szempontjából az irodalmi adatokat is figyelembe véve az alábbi okok állhatnak: 1) az enzimblokk következtében felhalmozódó 7DHC, 8DHC és ezek oxidált származékai olyan komplex változást hoznak létre a membrán összetételében, mely befolyásolja a Kv1.3 működését; 2) a csökkent a membránkoleszterin tartalom, mely a felhalmozódó prekursoroktól függetlenül módosíthatja a Kv1.3 működését; 3) a sejtmembrán össz-szterol tartalom emelkedése gátolja a Kv1.3 működését; 4) sejtmembránban felhalmozódó a 7DHC önmagában képes Kv1.3 működésének megváltoztatására. Az 1-es pontban leírtakat cáfolja, hogy M β CD/7DHC töltés hatására az SLOS sejtekkel kvalitatíve megegyező elektrofiziológiai eltéréseket kaptunk, azaz az aktivációs kinetika lassult, az egyensúlyi aktiváció pedig jobbra tolódott 7DHC töltést követően. 2-es



26. ábra. Az azonos koncentrációjú 7DHC és CHOL töltés eltérő mértékben módosítja a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak egyensúlyi aktivációját. Az oszlopdiaagramokon 32,5 (A) 65 (B) és 195 (C) μ M 7DHC és CHOL töltést követően, félaktivációs feszültségek átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel. A szignifikáns eltéréseket *($p < 0,05$) és **($p < 0,001$) jelöli.

pontbeli magyarázatot cáfolja, hogy korábban kimutattuk, hogy a membrán koleszterin M β CD-vel történő drasztikus csökkentése nincs hatással a Kv1.3 kapuzási jellemzőire [236]. A 3. érvelés ellen szól, hogy klinikai minták totál szteroltartalmának vizsgálata esetünkben és tőlünk független tanulmányokban is az SLOS-ben elmarad az egészségesekben mérhető koleszterin tartalomtól [241, 243]. Végezetül az 4. *pont* tűnik elfogadható magyarázatnak, azaz önmagában 7DHC membránbeli felhalmozódása felelős a Kv1.3 ioncsatorna kapuzásának megváltozásáért. Erre a legkézenfekvőbb bizonyítékot *in vitro* modellünk adja, ahol a sejtmembrán 7DHC-val történő töltése a citoplazmatikus regulátoroktól és egyéb szterol származékoktól függetlenül az SLOS-el kvalitatíve megegyező módon befolyásolta a Kv1.3 működését. Az alacsony SLOS betegszám miatt nem volt lehetőségünk korrelációt kimutatni a 7DHC koncentrációja és az elektrofiziológiai eltérések mértéke között. *In vitro* kísérleteink (7DHC töltés) által mutatott dózis-függő eredmények azonban sugallják, hogy az SLOS sejtek 7DHC tartalma és az elektrofiziológiai változások mértéke között összefüggés állhat fenn.

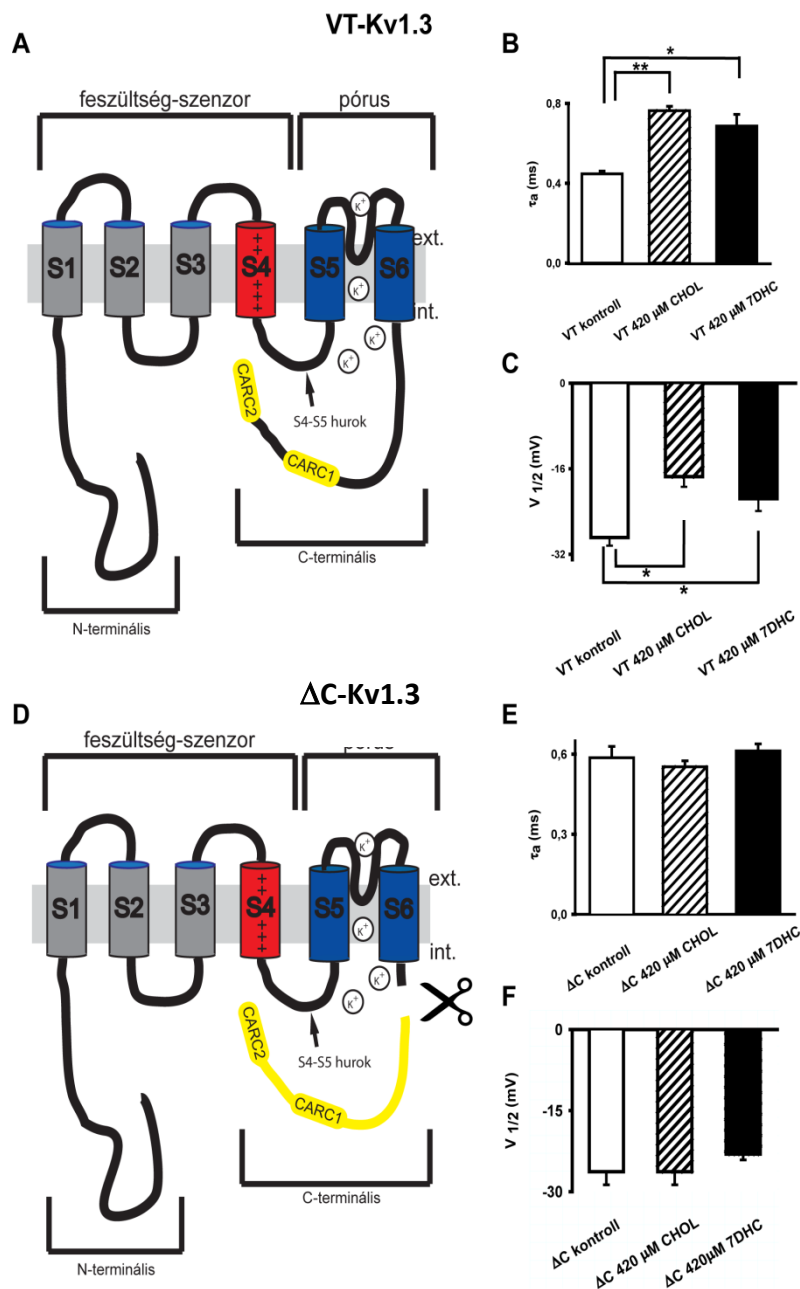
Kv1.3 gátlása a T-sejtek aktivációjának és proliferációjának gátlásához vezethet [11]. Eredményeink szerint az SLOS-ből izolált T-sejtek Ca²⁺-függő aktivációja és proliferációja elmarad a kontroll sejtekhez képest. Az SLOS hatására módosult Kv1.3 működés hozzájárulhat a csökkent T-sejt működéséhez. Ugyanakkor nagyon fontos megemlíteni azt a tényt, hogy a T-sejt aktivációja során kialakuló Ca²⁺jelet ioncsatornák, transzporterek és jelátviteli molekulák sokasága közösen szabályozza. Ezek egy része, mint pl. a CRAC csatorna pórusát kialakító Orai1 vagy a kalciumszenzorként funkcionáló STIM1 önmaga is koleszterin-érzékeny [244, 245]. Így nem kizárható, hogy a megváltozott membrán környezet a Kv1.3-on kívül egyéb transzporterek, jelátviteli molekulák működését is befolyásolja. Szintén nem lehet elhanyagolni az SLOS-ben felhalmozódó 7DHC és egyéb prekursor molekulák toxikus és esetlegesen immunszuppresszív hatását [246-248]. Az immunológiai eltérések nem tartoznak az SLOS diagnosztikai kritériumaihoz, azonban két olyan esettanulmányt is publikáltak, ahol SLOS-ben szenvedő gyermekekben klinikailag nem indokolt súlyosságú tünetek alakultak ki egyszerű fertőzéseket követően [249, 250]. A T-sejtek SLOS-ben talált csökkent T-sejt funkciója háttérben álló mechanizmusok részletesebb elemzése érdekében fontos lenne a kalciumjel kialakításában részt vevő egyéb transzporterek ionáramainak és membránbeli eloszlásának tanulmányozása.

4.1.3 Kv1.3 csatorna és membránbeli szterol közötti kölcsönhatásért felelős fehérje motívumok azonosítása

4.1.3.1 A Kv1.3 C-terminális deléciója a Kv1.3 csatornát szterol inszenszitivvé teszi

A feszültségfüggő ioncsatornák felépítésében részt vevő transzmembrán szegmensek szerkezete és funkciója többnyire ismert. Az feszültségfüggő ioncsatornák szigorú értelemben vett működéséhez (kapuzás, szelektív permeabilitás) nem esszenciális C-terminálisról azonban hiányosak az ismereteink. A Kv1.3 C-terminálisa, mivel tartalmaz CRAC/CARC koleszterinkötő helyeket, fontos szerepet játszhat a csatorna szterolokkal történő interakciójában is. Ennek bizonyítására a vad típusú Kv1.3 (VT-Kv1.3) mellett olyan deléciós mutáns Kv1.3 konstruktot (Δ C-Kv1.3) vizsgáltunk, mely esetében hiányzott a C-terminális jelentős részét kitevő, utolsó 84 aminosav [21]. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint ezen szakasz eltávolítása nem befolyásolta szignifikánsan a csatorna működését, azaz a csatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek nem változtak a vad típusú csatornához képest [21]. Kísérleteinkben a korábbiakhoz hasonló módszerrel töltöttük a Δ C-Kv1.3 és VT-Kv1.3 ioncsatornát stabilan expresszáló CHO sejteket koleszterinnel és 7DHC-val. A töltött sejtek Kv1.3 ioncsatornáit a korábban alkalmazott elektrofiziológiai protokollok szerint vizsgáltuk, azzal az eltéréssel, hogy teljes-sejt helyett outside-out konfigurációt alkalmaztunk. A CHO sejtekben ugyanis a teljes-sejt Kv1.3 csúcsáram +50 mV-on több nA volt, az ebből adódó soros ellenállás hibáját az outside-out konfiguráció a membránfelszín és az ezzel párhuzamos áramerősség-csökkenés miatt eliminálja. A VT-Kv1.3 csatornát expresszáló CHO sejtek koleszterinnel, illetve 7DHC-vel történő töltése (420 μ M) a csatorna kapuzását jellemző kinetikai paraméterek lassulását és az egyensúlyi aktiváció feszültség függésének jobbra tolódását okozza (**27. ábra, 5. táblázat**). A CHO sejtek koleszterinnel, illetve 7DHC-vel történő töltése tehát kvalitatíven hasonló eredményt adott a Kv1.3-at endogéne kifejező limfociták kezelésekor kapotthoz (ld. **24. ábra, 25. ábra, 26. ábra**, valamint [236]). Az outside-out konfigurációban kapott eredmények ezen felül megerősítik azon feltevésünket, hogy a ciklodextrin/szterol komplexek nem az ioncsatorna citoplazmatikus regulátorain keresztül befolyásolják a Kv1.3 működését, ugyanis ez utóbbiak jelentősége outside-out konfigurációban elenyésző, a ciklodextrin/szterol komplexek hatása viszont megmarad. A Kv1.3 csatorna C-terminálisának deléciója megszüntette a csatorna szterolérzékenységét: Δ C-Kv1.3 csatorna esetében a 420 μ M-os

CHOL és 7DHC töltés nem volt hatással a csatorna kapuzására: az aktivációs időállandó és



27. ábra A Kv1.3 C-terminálisának eltávolítása esetén megszűnik a csatorna szterollokkal szembeni érzékenysége. (A) A vad típusú Kv1.3 csatorna két potenciális koleszterinfelismerő CARC szekvenciát tartalmaz a C-terminális disztális végén. **(B, C)** A B és C ábrákon a vad típusú (VT-Kv1.3) csatornával transzfektált CHO sejtek 420 μM 7DHC, illetve koleszterin töltést követően meghatározott aktivációs időállandóknak és a félaktivációs feszültségeinek ($V_{1/2}$) átlag ± SEM értékeit tüntették fel. **(D)** A C-terminális Kv1.3 ioncsatorna szterolok általi regulációjában betöltött szerepének vizsgálatához egy olyan deléciós konstruktot alkalmaztunk, mely esetében a CARC szekvenciák is eltávolításra kerültek (Δ C-Kv1.3). Az **E, F** diagramokon a Δ C-Kv1.3 csatornát kifejező CHO sejtek aktivációs időállandóinak és félaktivációs feszültségeinek átlag±SEM értékeit tüntették fel 420 μM M β CD/CHOL és M β CD/7DHC töltést követően. A szignifikáns eltéréseket * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,001$) jelöli.

félaktivációs feszültség esetében sem volt eltérés a kezelt és kezeletlen sejtek között (**27. ábra** B és E panel, **5. táblázat**). Ezek alapján feltételezhető, hogy a csatorna C-terminális fontos szerepet játszik a csatorna szterolok általi szabályozásában.

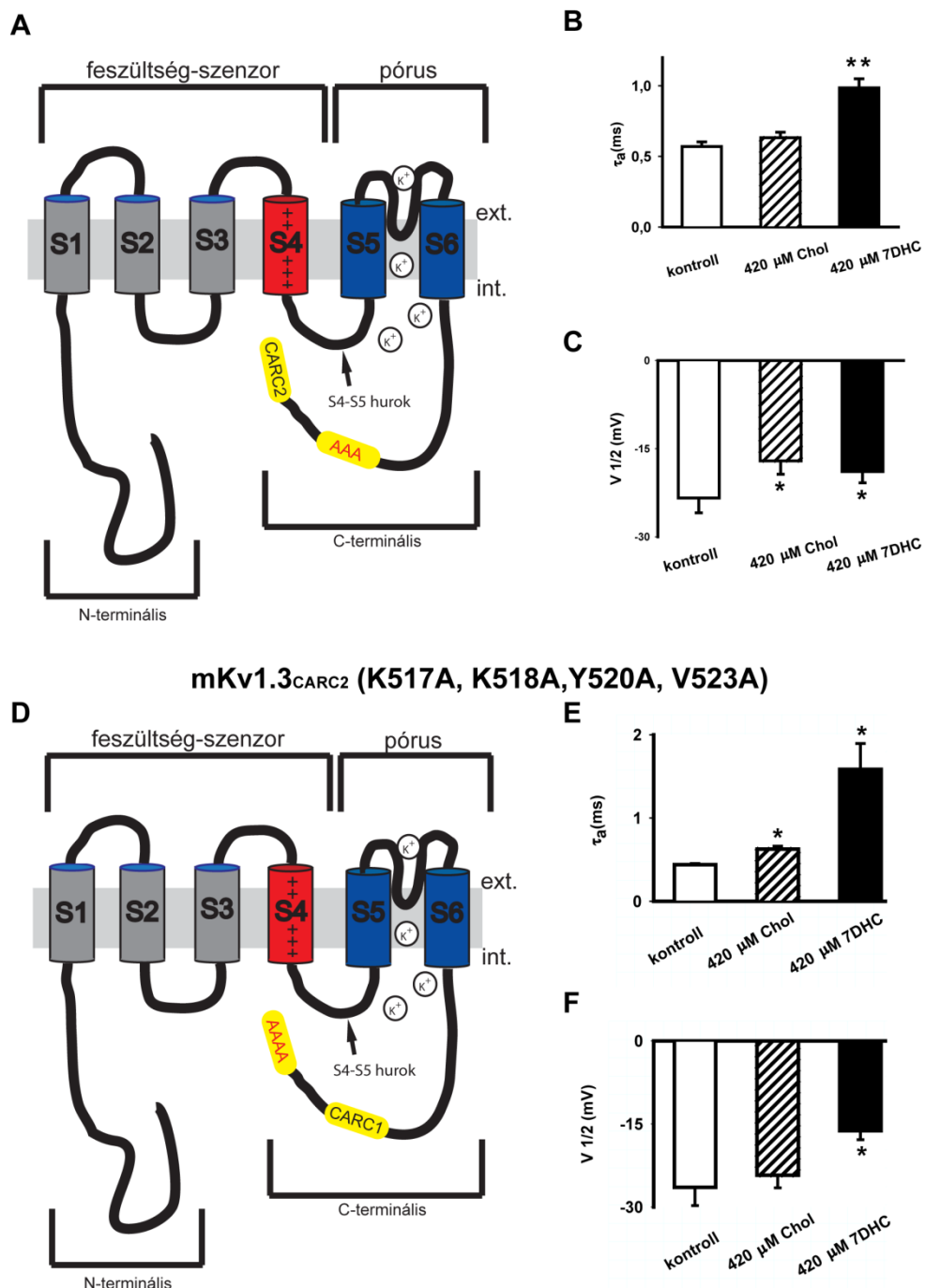
	VT					DC				
		CHOL	p	7DHC	p		CHOL	p	7DHC	p
τ_{akt}	0,45± 0,01 n=4	0,76± 0,02 n=7	0,002*	0,69± 0,06 n=10	0,008*	0,59± 0,04 n=6	0,55± 0,02 n=7	>0,05	0,61± 0,03 n=10	>0,05
$V_{1/2}$	-28,87± 1,5 n=5	-17,48± 1,9 n=7	<0,001*	-19,25± 4,7 n=7	0,028*	-26,73± 2,7 n=6	-26,31± 2,4 n=8	>0,05	-23,05± 1,1 n=6	>0,05

5. táblázat. A vad típusú (VT) és a C-terminális deléciós mutáns (DC) Kv1.3 csatornák összehasonlítása 420 μ M koleszterin (CHOL) vagy 420 μ M 7DHC töltést követően. (τ_{akt} : aktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, * jelöli a szignifikáns eltéréseket)

4.1.3.2 A Kv1.3 kettő szterol kötőhelyel rendelkezik a C terminálisán

Az intracellulárisan elhelyezkedő C-terminális, a transzmembrán régiókkal ellentétben kevésbé lehet érzékeny a sejtmembrán fizikai paramétereiben bekövetkező változásokra. Ezek alapján feltételeztük, hogy a koleszterin nemcsak a sejtmembrán biofizikai paramétereinek befolyásolásán keresztül, de specifikus lipid-fehérje interakciókon keresztül is módosíthatja a Kv1.3 kapuzását. A C-terminális aminosav szekvenciáját elemezve két potenciális koleszterinkötő helyet találtunk (Kv1.3_{CARC1} és Kv1.3_{CARC2}, **27. ábra**). A CARC1 és CARC2 szterolok általi szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatához alaninra cseréltük a vad típusú Kv1.3 csatorna koleszterinkötő szekvenciáinak esszenciális aminosavait (**28. ábra**, A és D panelek). A mKv1.3_{CARC1} esetén a 474. pozícióban található lizint, a 477 pozícióban lévő tirozint és a 479 pozícióban elhelyezkedő valint, a mKv1.3_{CARC2} esetén az 517. és 518. pozícióban a lizinet, a 520. fenilalanint és a 523. pozícióban található valint cseréltük alaninra. A Δ C-Kv1.3 konstrukt alapján várható volt, hogy a C-terminálison létrehozott pontmutációk nem fogják jelentősen módosítani a csatorna működését, azonban első lépésként összehasonlítottuk a mutáns és a vad-típusú csatornák kapuzási paramétereit. A mKv1.3_{CARC1} és mKv1.3_{CARC2} konstruktok ionáramai, aktivációs kinetikája és az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése a Δ C-Kv1.3 csatornához hasonlóan nem tért el a vad típusú csatornától, a mutációk nem módosították jelentősen a csatorna működését (**6. táblázat**). A továbbiakban a mKv1.3-mal transzfektált CHO sejteket 420 μ M koleszterinnel és azonos

koncentrációjú 7DHC-vel töltöttük, majd vizsgáltuk a $mKv1.3_{CARC1}$ és $mKv1.3_{CARC2}$ mutáns csatornák biofizikai paramétereit. A mutációk hatására mindkét csatorna koleszterinnel $mKv1.3_{CARC1}$ (K474A, Y477A, V479A)



28. ábra. A C-terminális CARC1 és CARC2 szekvenciáinak pontmutációi megváltoztatja a csatornák szterollokkal szembeni érzékenységét. (A,D) A CARC szekvenciák ioncsatorna regulációban betöltött szerepének vizsgálatához alaninra cseréltük a feltételezett szterolkötőhelyek kritikus aminosavait. A mutáns csatornákat CHO sejtekbe transzfektáltuk, majd M β CD/CHOL és M β CD/7DHC töltést követően outside-out patch konfigurációban vizsgáltuk az ionáramokat. Az oszlopdiagramokon az $mKv1.3_{CARC1}$ (B,C), illetve $mKv1.3_{CARC2}$ (E,F) csatornák aktivációs időállandóinak és félaktivációs feszültségeinek átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel 420 μM 7DHC, illetve koleszterin töltést követően. A szignifikáns eltéréseket * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,001$) jelöli.

szembeni érzékenysége módosult. Az mKv1.3_{CARC1} esetén a félaktivációs feszültség jobbra tolódott, azonban az aktivációs időállandó nem mutatott eltérést a kezeletlen csatornához viszonyítva a koleszterin kezelést követően (**28. ábra** B és C panel, **7. táblázat**). Az azonos koncentrációjú 7DHC töltés az aktivációs kinetikát szignifikánsan lassította, a félaktivációs feszültséget pedig jobbra tolta. A mKv1.3_{CARC2} esetén a koleszterin töltés lassította az aktivációs kinetikát, de nem volt hatása az egyensúlyi aktivációra (**28. ábra** E és F része, **7. táblázat**). A 7DHC kezelés viszont a vad típusú csatornához hasonlóan módosította az mKv1.3_{CARC2} aktivációs kinetikáját és egyensúlyi aktivációját (**28. ábra** E és F panele, **7. táblázat**).

	VT	mKv1.3 _{CARC1}	p	mKv1.3 _{CARC2}	p
τ_{akt}	0,45± 0,01 n=4	0,57± 0,03 n=14	0,072	0,44± 0,01 n=11	0,769
$V_{1/2}$	-28,9± 1,5 n=5	-26,37± 1,6 n=8	0,315	-26,45± 3,3 n=5	0,524

6. táblázat. A vad típusú (VT) és a potenciális koleszterinkötő helyeken mutált (mKv1.3_{CARC1}, mKv1.3_{CARC2}) Kv1.3 csatornák összehasonlítása. (τ_{akt} : aktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, * jelöli a szignifikáns eltéréseket.)

	mKv1.3 _{CARC1}					mKv1.3 _{CARC2}				
	N.K.	CHOL	p	7DHC	p	N.K.	CHOL	p	7DHC	p
τ_{akt}	0,57± 0,03 n=14	0,62± 0,04 n=14	0,248	0,98± 0,06 n=3	<0,001**	0,44± 0,01 n=11	0,63± 0,03 n=14	<0,001**	1,59± 0,31 n=5	<0,001**
$V_{1/2}$	-26,37± 1,6 n=8	-17,09± 2,27 n=8	0,005*	-18,89± 1,94 n=3	0,03*	-26,45± 3,3 n=5	-24,26± 2,27 n=9	0,59	-16,23± 1,61 n=5	0,024*

7. táblázat CHOL és 7DHC töltés hatása a potenciális koleszterinkötő helyeken mutált (mCARC1, mCARC2) Kv1.3 csatornákra. A mutáns csatornákkal transzfektált CHO sejtekben kontroll körülmények között, valamint 420 μ M 7DHC, illetve koleszterin töltést követően meghatároztuk a csatornkapuzás releváns biofizikai paramétereit (átlag \pm SEM, τ_{akt} : aktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, N.K.: nem kezelt, CHOL: koleszterin, 7DHC: 7-dehidrokoleszterin, * jelöli a szignifikáns eltéréseket)

Mindezek alapján arra következtethetünk, elsősorban a C-terminális eltávolítása során tapasztalt szterol-hatás megszűnése alapján, hogy a koleszterin és 7DHC hasonló mechanizmusokon keresztül szabályozza a csatornák működését. A CHOL és a 7DHC hatása a Kv1.3 kapuzási paramétereire azonban kvantitatíven különböző volt, a Kv1.3 kapuzás megváltozása 7DHC töltésre érzékenyebb volt: e különbség hátterében egyrészt az állhat, hogy a sejtek eltérő mértékben/doménekbe veszik fel a CHOL-t vagy a 7DHC-t, másrészt CHOL és a 7DHC specifikus kölcsönhatását a Kv1.3 C-terminálissal eltérő affinitású. A két

hajdu.peter.4_343_25

kötőhely mutációs analízise további bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a C-terminális CARC1 és CARC2 motívuma egyértelműen szerepet játszik a Kv1.3 csatorna szterol kötődésében. Ezen kísérletek alapján az is elmondható, hogy a 7DHC affinitása ezen kötőhelyek felé valószínűleg magasabb, ezért látható a nagyobb mértékű változás az aktivációt jellemző paraméterekben. Ennek kétséget kizáró eldöntéséhez *in silico* modellezés, valamint további mutációs analízis kivitelezésére lenne szükséges.

4.2 A T-sejt ioncsatornák plazmamembánbeli eloszlásának molekuláris háttere és funkcionális következményei

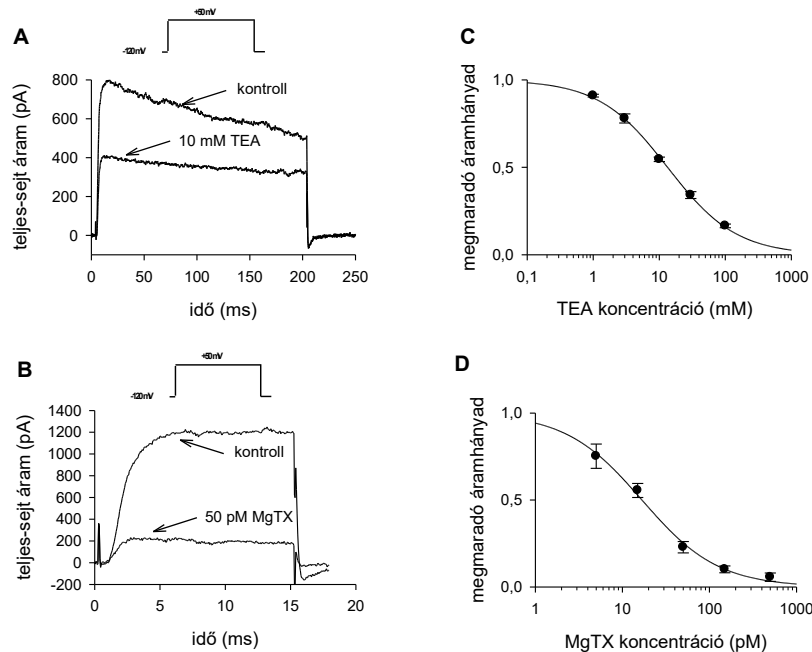
4.2.1 A Kv1.3 csatorna az immunológiai szinapszisba rendeződésének funkcionális következménye

4.2.1.1 Egér T sejt vonal (D10) ioncsatornáinak biofizikai és farmakológiai azonosítása

Elektrofiziológiai kísérleteink során először az egér T sejt vonalon (D10) sejt vonalon regisztrált kálium ionáramok biofizikai paramétereinek meghatározásakor az aktivációs és inaktivációs kinetikát, valamint az egyensúlyi aktiváció membránpotenciál-függését tanulmányoztuk. Az aktivációs időállandóra (τ_a) $1,36 \pm 0,06$ ms ($n = 18$), az inaktivációs időállandóra (τ_{in}) 365 ± 27 ms ($n = 17$), míg az egyensúlyi aktivációt jellemző paraméterekre, félaktivációs-feszültségre ($V_{1/2}$) $-26,4 \pm 1,5$ mV és a meredekségre (k) $7,6 \pm 0,5$ mV, ($n = 12$) adódott (a mérési protokollok és kiértékelés módszere megegyezett az előző fejezetekben leírtakkal). Bár az áramgörbék (nem került bemutatásra) és a meghatározott paraméterek értékei alapján a Kv1.3 csatorna jelenlétére következtettünk. Viszont a kálium csatornák kizárólag biofizikai jellemzők alapján történő azonosítása nem egyértelmű; néhány rágszáló T-limfocita sejt vonal Kv3.1 csatornákat is kifejezhet, ami szintén hozzájárulhat a D10 sejt vonal teljes-sejt áramához. Ezért a K^+ csatornák általános, és a Kv1.3 csatornák nagy affinitású gátlószerével, a tetraetilammonium (TEA, $K_d \approx 10$ mM)) és a MgTX ($K_d \approx 50$ pM) alkalmazásával farmakológiai karakterizálást végeztünk. 10 mM TEA jelenlétében a gátlás mellett C-típusú inaktiváció lassulását is megfigyeltük (**29. ábra** A panel). 50 pM MgTX a kontroll körülmények között mért teljes-sejt ionáram csúcsértékét megközelítőleg 22 %-ára csökkentette (**29. ábra** B panel). Ezen két gátlószer dózis-hatás görbéje a **29. ábra** C (TEA) és D (MgTX) panelén látható. A dózis-hatás görbékre két-paraméteres Hill egyenletet illesztettünk, amely alapján meghatároztuk a K_d értékeket: 13,4 mM értéket kaptunk a TEA-ra, míg 16,8 pM értéket a peptid toxinra. Ezek alapján egyértelműen eldönthető volt, hogy a D10 sejtek Kv1.3 kálium csatornákat expresszálnak.

4.2.1.2 A TASK csatornák feltételes jelenlétének vizsgálata a D10 sejt vonalon

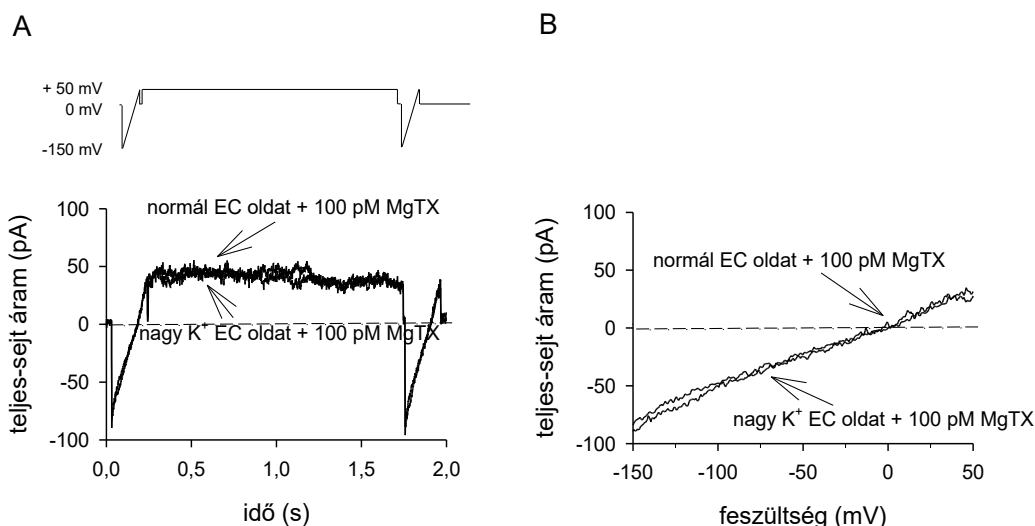
A „Functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse” című közleményünkre érkezett kritikai megjegyzéseket tárgyaló cikkben a szerzők azt fejtették ki, hogy a D10 sejt vonal teljes-sejt áramához a Kv1.3 csatornák mellett a kétpórusú TASK-1 és TASK-3 csatornák is hozzájárulnak. Annak érdekében, hogy kizárjuk az



29. ábra. D10 sejtek K^+ -áramainak farmakológiai vizsgálata. Az **(A)** ábrán látható áram görbéket 200 ms hosszú + 50 mV-os depolarizáló impulzusok alkalmazása során regisztráltuk kontroll körülmények között és 10 mM TEA oldat jelenlétében (-120 mV tartófeszültség mellett). A **(B)** ábrán bemutatott K^+ -áram görbe 50 pM margatoxin (MgTX) D10 sejtre kifejtett gátló hatását szemlélteti, mely görbéket 15 másodpercenként bekövetkező, 15 ms hosszú +50 mV-os depolarizáló impulzusok alkalmazásával regisztráltunk (-120 mV tartófeszültség mellett). **(C)** A megmaradó áramhányadokat a TEA-koncentráció függvényében ábrázoltuk. Minden adatpontot 3-4 egymástól független kísérlet alapján határoztunk meg (SEM). A megmaradó áramhányadokat a gátlószer jelenlétében és hiányában kapott csúcsáramok hányadosaként állapítottuk meg. Az ábrázolt görbe az adatpontokra illeszkedő Hill egyenletet szemlélteti $K_d = 14,3$ mM értékkel ($n_H = 0,83$). **(D)** Változó koncentrációban alkalmazott MgTX dózis-hatás görbét mutatjuk be, ahol minden mérési pont szintén 3-4 egymástól független mérés eredménye. Hill egyenlettel illesztett adatsor alapján a $K_d = 16,8$ pM ($n_H = 0,99$).

említett kétpórusú K^+ csatornák jelenlétét, kísérleteinket a D10 sejtekben expresszálandó TASK-1 és TASK-3 csatornák vizsgálatára irányítottuk. A karakterizálás során, mivel a TASK csatornák idő- és feszültségfüggetlenek, feszültség-rámpa protokoll segítségével megmértük a teljes-sejt áramokat D10 sejtekben. KCl-alapú, Ca^{2+} -mentes belső oldatot alkalmaztunk, hogy a Ca^{2+} aktivált ioncsatornák (pl. KCa3.1) hozzájárulását elhanyagolhatóvá tegyük a vizsgált limfocitákban. A feszültségfüggő Kv1.3 csatornák eliminálására 100 pM margatoxint alkalmaztunk, valamint a tartófeszültséget 0 mV-ra állítottuk (a Kv1.3 csatornák ennél a feszültségnél inaktiválódnak) az ún. dupla-rámpa protokoll alkalmazása mellett (**30. ábra A** panel). A megfordítási potenciálra -4 mV-nak adódott (**30. ábra B** panel), amely sokkal pozitívabb, mint ami a TASK csatornák jelenlétében várható lett volna (elméleti érték az

oldatok összetételének alapján -85 mV). Ezen túl, 150 mM K^+ -tartalmú oldat jelenlétében nem tapasztaltunk jelentős jobbra tolódást az áram-feszültség görbében, a TASK csatornák jelenléte a D10 sejtvonalon ez alapján kizárható.



30. ábra. TASK csatornák karakterizációja D10 sejtekben. (A) A D10 sejteken minden 15. másodpercben dupla-rámpa protokollt alkalmaztunk 0 mV tartófeszültségről indulva a Kv1.3 áramok kizárása céljából: a két 200 mV-os feszültség-rámpát egy $1,5$ másodperc hosszú, $+50$ mV-os depolarizáló lépés választja el. **(B)** I-V kapcsolat; a teljes-sejt áramokat normál extracelluláris oldat, és 150 mM K^+ oldat jelenlétében 0 mV tartófeszültségről indulva feszültség-rámpa protokoll segítségével -150 mV és $+50$ mV közötti feszültségtartományban regisztráltuk. Mindkét oldat 100 pM MgTX-t tartalmazott.

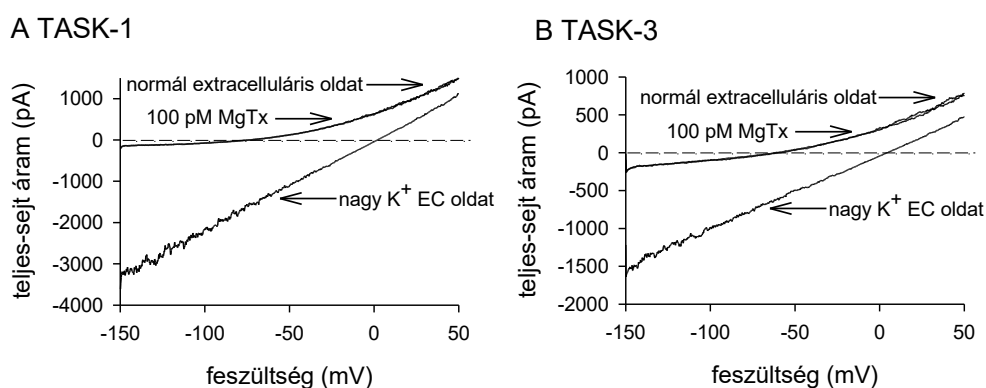
4.2.1.3 A kétpórusú K^+ csatornák nem érzékenyek margatoxinra

A kétpórusú csatornák jelenlétét tovább vizsgálva HEK-tsA sejtekben expresszáltattuk a TASK-1 (egér) és TASK-3 (humán) csatornákat, majd megvizsgáltuk 100 pM MgTX hatását ezekre a csatornákra. Korábban kimutattuk, hogy a margatoxin, mely széles körben elfogadott nagy affinitású Kv1.3 csatorna gátlószer, ebben a koncentrációban a Kv1.3 csatornák több mint 85%-át gátolja. Ugyanez a koncentráció hatástalannak bizonyult a HEK-tsA sejtekben kifejezett TASK-1 és TASK-3 csatornák esetében (31. ábra A és B része). Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a D10 sejt vonal teljes-sejt K^+ áramait Kv1.3 csatornák adják, és a TASK-1 és TASK-3 csatornák a teljes-sejt áramhoz való hozzájárulása elhanyagolható.

4.2.1.4 TASK gátlók hatása a Kv1.3 csatornára

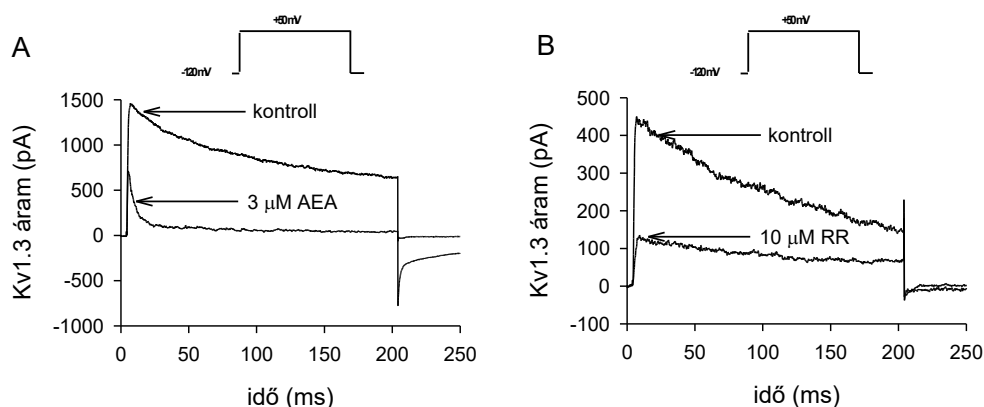
Megvizsgáltuk az anandamid (AEA) és ruténium vörös (RR) HEK-tsA sejtekbe transzfektált Kv1.3 csatornákra kifejtett gátló hatását. Az anandamid elfogadott Kv1.2, Kv1.5 és Kv4.3 gátlószer, a ruténium vörösről eddig nem közöltek adatot a Kv1.3 csatornák gátlásával

kapcsolatban. Az anandamidot 3 és 30 μM koncentrációban, a ruténium vöröset 10 μM koncentrációban alkalmaztuk (**32. ábra** A és B panele). Mindkét anyagot a Kv1.3 csatornák hatékony gátlószereinek találtuk, a Kv1.3 csatornák áramamplitúdóit szignifikánsan csökkentették, és a Kv1.3 esetében megbecsült K_d értékek jó egyezést mutattak a kétpórusú csatornákra leírtakkal (AEA: 3 μM , RR: 4 μM). Továbbá, anandamid alkalmazása során az



31. ábra. Margatoxin hatása TASK-1 és TASK-3 csatornákra. -150 és +50 mV-os feszültségtartományban 15 másodpercenként bekövetkező, 500 ms hosszú feszültségrámpát alkalmaztunk HEK-tsA 201 sejtek TASK-1 (**A**) és TASK-3 (**B**) áramaira 0 mV tartófeszültség mellett.

inaktivációs kinetika gyorsulását tapasztaltuk. Azért, hogy minimálisra csökkentjük az endogén Kv1.3 csatornák teljes-sejt áramhoz való hozzájárulását, a csatornákat túlexpresszáltuk a HEK-tsA sejtekben, és outside-out konfigurációt alkalmaztunk az áramok regisztrálása során. Ezek az eredmények azt szemléltetik, hogy mind az anandamid, mind a



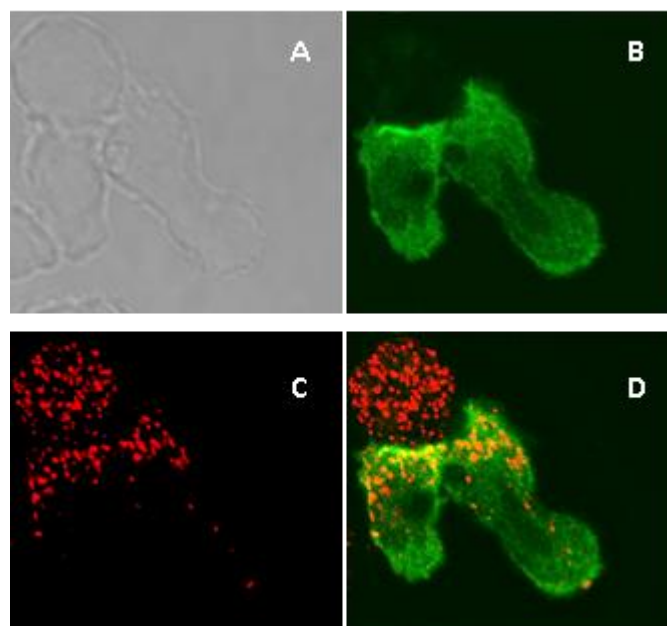
32. ábra Anandamid (AEA) és ruténium vörös (RR) hatása HEK tsA sejtekben kifejezett Kv1.3 csatornákra. Az áramgörbéket 200 ms hosszú, 15 másodpercenként bekövetkező +50 mV-os depolarizáló impulzusokkal, -100 mV tartófeszültség alkalmazása mellett, outside-out konfigurációban regisztráltuk normál extracelluláris oldat és (**A**) 3 μM anandamid (AEA) valamint (**B**) 10 μM ruténium (RR) vörös jelenlétében.

ruténium vörös, a TASK csatornáknál alkalmazott koncentrációkkal összevethetően, a Kv1.3 csatornák gátlószerei is, ezért a két csatornatípus ezeknek a vegyületeknek az alkalmazásával nem különíthető el (**32. ábra**). Úgy gondoljuk, hogy az anandamid alkalmazása mellett regisztrált inaktivációs kinetikában bekövetkező változások az anandamid Kv1.3 csatornákra kifejtett hatásának, mintsem a TASK csatornák szelektív kiiktatásának következménye. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a D10 sejtek nem, vagy csak nagyon kis mértékben fejeznek ki TASK csatornákat a membránjukban.

4.2.1.5 A Kv1.3 csatornák kapuzása megváltozik az immunológiai szinapszisban

Az immunológiai szinapszis kialakulását számos membrán- és citoszolikus fehérje átrendeződése kíséri. Korábban [23] valamint a D10-CH12-LX sejtpár alkotta szinapszisban is kimutattuk, hogy a Kv1.3 csatornák a két sejt közötti kontaktrégiójába rendeződnek (**33. ábra**).

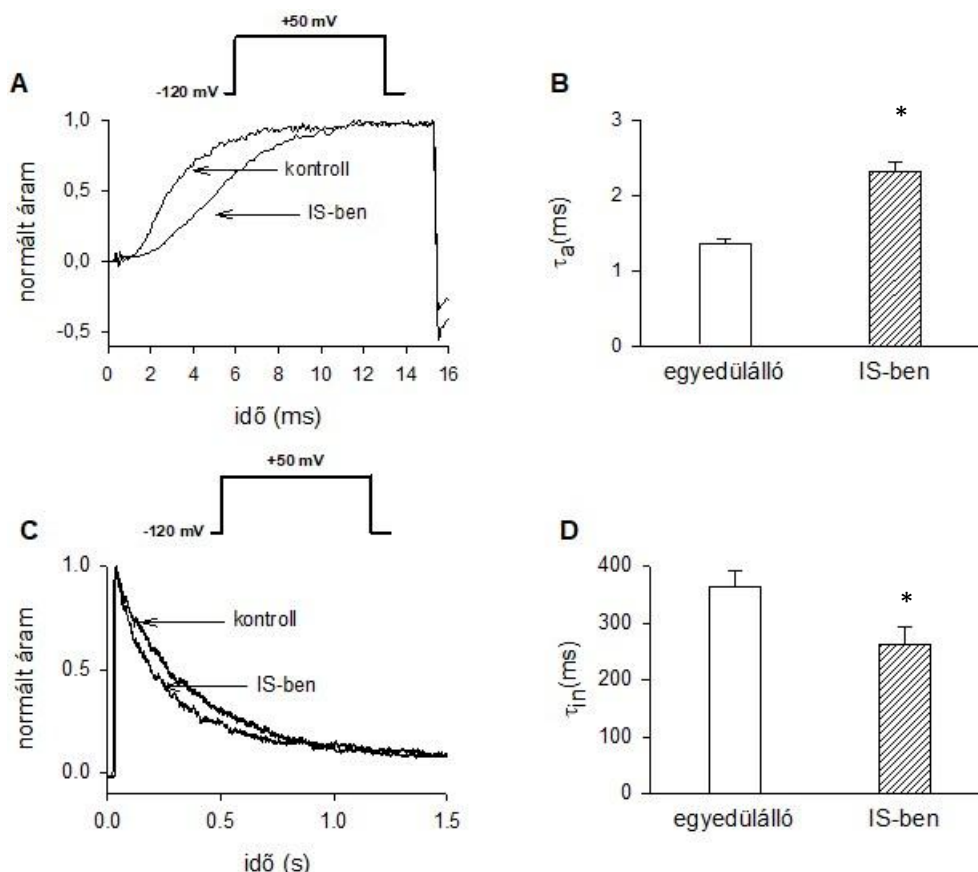
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, milyen következményekkel jár ez a folyamat, azaz a csatornafunkció más fehérjék általi módosítása milyen mértékben valószínűsíthető, az APC-hez kapcsolódó, azaz IS-ben lévő D10 sejteknek is megvizsgáltuk a teljes-sejt áramait. Az APC-



33. ábra. Kv1.3 csatornák átrendeződése az immunológiai szinapszisba. (A) Transzmissziós kép, **(B)** GFP-vel konjugált PKC- θ enzim fluoreszcens jele, **(C)** Kv1.3 csatornák jele (piros **(D)** a 488 nm-es és 543 nm-es csatornák átfedő jele (B + C). A konfokális mikroszkóppal készített szeletek vastagságát 1 μm -re állítottuk be. A felvételen két D10 sejt középső és egy CH12-LX sejt felső szelete látható. A T sejt – B sejt konjugátumokat előzőleg poly-L-lysine-es fedőlemezre tapasztottuk ki, a sejtek keverését és centrifugálását követően 10 perc múlva fixáltuk 4% paraformaldehid oldattal, majd Kv1.3 ellenes antitesttel jelöltük indirekt módon.

hez kapcsolódó és egyedülálló D10 sejten kifejeződő Kv1.3 csatornák normált áramgörbéit

összehasonlítva mind az aktivációs kinetikában ($\tau_{a,c} = 1,36 \pm 0,06$ ms, $\tau_{a,IS} = 2,36 \pm 0,13$ (n = 7), $p < 0,001$), mind az inaktivációs kinetikában ($\tau_{in,c} = 365 \pm 27$ ms, $\tau_{in,IS} = 263 \pm 29$ (n = 7), $p = 0,037$) bekövetkezett különbségeket szignifikánsnak találtuk, vagyis az IS-ben lévő D10 sejtekben a Kv1.3 csatornák aktivációja jelentősen lelassult (**34. ábra A és B panel**), az inaktivációs kinetika pedig jelentős mértékű gyorsulást mutatott és (**34. ábra C és D panel**).

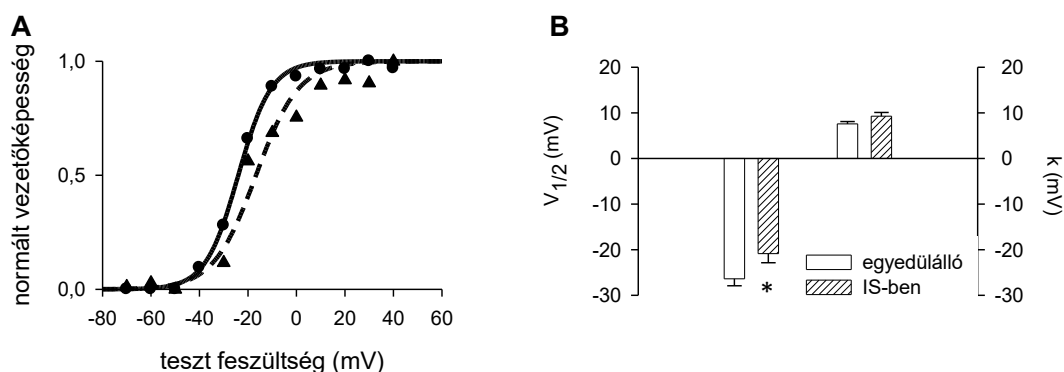


34. ábra. Kv1.3 csatornák kapuzása az immunológiai szinapszisban. Az aktivációs kinetika tanulmányozása során 15 ms-os +40 mV-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az **(A)** ábrán egy egyedülálló és egy szinapszisban lévő D10 sejt normált K^+ -áramai láthatók. Az ábrán látható áramgörbékhez tartozó aktivációs időállandó értékek a következők: $\tau_{a,c} = 1,56$ ms és $\tau_{a,IS} = 2,28$ ms. **(B)** Az egyedülálló és szinapszisban lévő T sejtek aktivációs időállandója.. **(C)** Az inaktivációs kinetika tanulmányozása során 1,5 ms-os +50 mV-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Az **(C)** ábra jól szemlélteti a szinapszisban lévő sejt inaktivációs kinetikájának felgyorsulását. Az inaktivációs időállandók e sejtekre a következők: $\tau_{in,c} = 350$ ms és $\tau_{in,IS} = 251$ ms. **(D)** Az egyedülálló és szinapszisban lévő T sejtek inaktivációs időállandója. Az átlag \pm SEM van feltüntetve, *: szignifikáns különbség.

Feltételeztük, hogy a kinetikában bekövetkező változások az aktiváció egyensúlyi paramétereit is módosíthatják. A tesztfeszültség függvényében ábrázolt normált

vezetőképességek alapján azt találtuk, hogy szinapszisban lévő Kv1.3 csatornák egyensúlyi aktivációjának membránpotenciál függése a pozitív feszültségek irányába tolódott el ($V_{1/2,c} = -26,4 \pm 1,5$ mV ($n = 12$), $V_{1/2,IS} = -20,9 \pm 2$ mV ($n = 7$), $p < 0,05$). Az IS-ben lévő Kv1.3 csatornák meredekség értéke is magasabb volt, bár a különbség statisztikailag nem szignifikáns ($k_c = 7,6 \pm 0,5$ mV, $k_{IS} = 9,3 \pm 0,8$ mV, $p = 0,115$) (35. ábra A és B panel). Az inaktivációs kinetikai paraméterek változása alapján arra következtettünk, hogy valamilyen foszforilációs vagy defoszforilációs folyamat áll a jelenség hátterében.

Az APC-hez kapcsolódó és egyedülálló T-sejtek Kv1.3 áramsűrűségét is megvizsgáltuk (+40 mV-nál áramamplitúdó / sejt kapacitása) ($CD_c = 154 \pm 16$ pA/pF, $CD_{IS} = 104 \pm 19$ pA/pF), ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak.

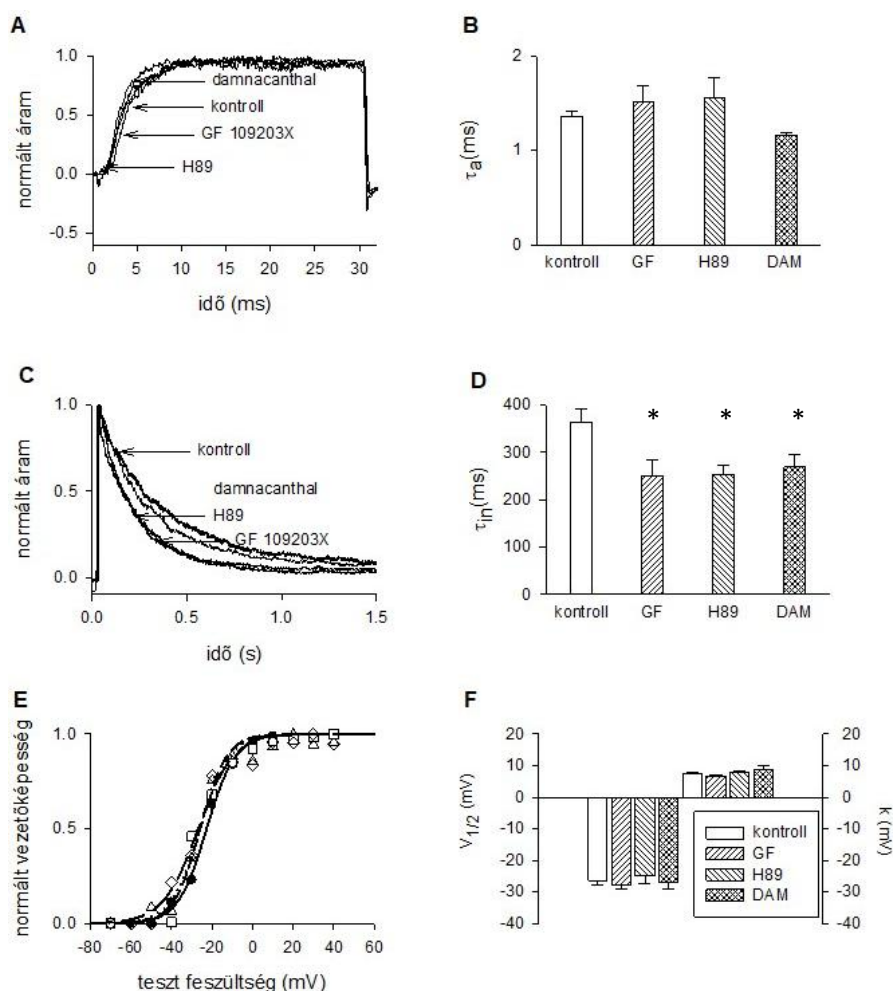


35. ábra. Kv1.3 csatorna aktiváció membránpotenciál függése megváltozik az IS-ben. (A) A normált vezetőképesség feszültségfüggése egy egyedülálló kontroll (●) és szinapszisban lévő T sejt (▲) esetén Boltzmann-függvénnyel ábrázoltuk. A meredekség és félaktivációs feszültség értékek az ábrán bemutatott sejtre vonatkozóan: $k_c = 6,8$ mV, $V_{1/2,c} = -24$ mV; $k_{IS} = 8,8$ mV, $V_{1/2,IS} = -16,6$ mV. **(B)** Az egyedülálló és szinapszisban lévő T sejtek egyensúlyi paraméterei: meredekség (k) és félaktivációs feszültség ($V_{1/2}$), átlag \pm SEM, *. szignifikáns különbség.

4.2.1.6 A protein-kináz (PK) antagonisták gyorsítják a Kv1.3 inaktivációját

Mivel nem ismert, hogy a D10 sejtekben a Kv1.3 csatornához mely protein kináz/foszfataz képes asszociálni, ezért megvizsgáltunk két PK és egy $p56^{lck}$ inhibitor Kv1.3 csatornák áramaira gyakorolt hatását, amelyek a következők voltak: a PKA-t gátló H89 ($K_d \approx 50$ nM), a PKC inhibitor GF109203X (GF, $K_d \approx 14$ nM) valamint a $p56^{lck}$ kináz gátló Damnachantal (DAM, $K_d \approx 17$ és 620 nM). Ezeknek a vegyületeknek közvetlen gátló hatása is van ioncsatornákra, pl. a H89 Kv1.3 csatorna gátlószer ($IC_{50} = 1,7$ μ M), a GF Kv1.5 gátlószer ($K_d = 1-2$ μ M), ezért a kísérletekben alkalmazott koncentrációkat úgy állítottuk be, hogy elkerüljük

ezen vegyületek blokkoló hatását, ugyanakkor még effektíven inaktíválják a protein kinázokat. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak: H89: 0,1 μ M, GF: 0,5 μ M, DAM: 1 μ M. Az aktivációs kinetika a PK antagonisták hatására nem változott szignifikánsan ($\tau_{a,c} = 1,36 \pm 0,06$



36. ábra. A protein kinázok gátlása gyorsítja az inaktívációs kinetikát. (A) Egy kontroll és három különböző kezelés mellett regisztrált sejt normált áramgörbéi láthatók. Az ábrán bemutatott kontroll és kezelt sejtek aktivációs időállandói a következők: $\tau_{a,c} = 1,56$ ms, $\tau_{a,GF} = 1,43$ ms, $\tau_{a,H89} = 1,41$ ms, $\tau_{a,DAM} = 1,44$ ms. A (B) ábra oszlopdiaagramokon szemlélteti az aktivációs időállandó értékek átlagait és SEM-et. (C) Egy kontroll és három különböző kezelés utáni sejten rögzített normált áramgörbéi láthatók, hosszú protokollal. Az inaktívációs kinetikát egy-exponenciális függvényvel illesztettük. Az inaktívációs időállandók az ábrán bemutatott áramgörbékre a következők: $\tau_{in,c} = 350$ ms, $\tau_{in,GF} = 203$ ms, $\tau_{in,H89} = 190$ ms, $\tau_{in,DAM} = 261$ ms. (D) Oszlopdiaagramokon az inaktívációs időállandó értékek átlagait és SEM-jét tüntettük fel. (E) Egy kontroll (\bullet) valamint egy GF109203X- (Δ), H89- (\square) és damnacanthal- (\diamond) kezelt sejt normált vezetőképességének feszültségfüggése látható. Az adatokat Boltzmann-függvényvel együtt ábrázoltuk: kontroll (folytonos vonal), GF109203X (rövid szaggatott vonal), H89 (pontozott vonal) és Damnacanthal (hosszú szaggatott vonal). A meredekség és félaktivációs feszültségértékek az ábrán szemléltetett sejtek esetén a következők: $k_c = 7,1$ mV, $V_{1/2,c} = -22,7$ mV; $k_{GF} = 6,5$ mV, $V_{1/2,GF} = -25,9$ mV; $k_{H89} = 7,3$ mV, $V_{1/2,H89} = -25,8$ mV; $k_{DAM} = 8,6$ mV, $V_{1/2,DAM} = -26,9$ mV. (F) A meredekség (k) és félaktivációs feszültség értékek átlagait és szórásait. *: statisztikailag szignifikáns eltérés.

ms, (n = 18) $\tau_{a,GF} = 1,51 \pm 0,17$ ms (n = 9), $p = 0,3$; $\tau_{a,H89} = 1,56 \pm 0,2$ ms (n = 13) $p = 0,3$; $\tau_{a,DAM} = 1,16 \pm 0,19$ ms (n = 6) $p = 0,22$) (**36. ábra** A és B panel).

Az inaktivációs kinetika vizsgálata során azonban mind a H89, mind a GF109203X vegyületekkel, mind pedig a Damnachantallal történő kezelés során azt tapasztaltuk, hogy a Kv1.3 csatornák inaktivációja gyorsul, az inaktivációs időállandó szignifikánsan csökkent a kezeletlen kontrollokhoz képest a D10 sejtekben ($\tau_{in,c} = 365 \pm 27$ ms, (n = 17) $\tau_{in,GF} = 252 \pm 32$ ms (n = 9); $\tau_{in,H89} = 254 \pm 20$ ms (n = 12); $\tau_{in,DAM} = 269 \pm 27$ ms (n = 7) $p < 0,05$) (**36. ábra** C és D panel).

Az aktiváció egyensúlyi és kinetikai jellemzőit is tanulmányoztuk; az egyensúlyi aktiváció paraméterei, feszültségfüggése és meredeksége nem változtak meg szignifikánsan a PK inhibitorokkal történő kezelés hatására ($(V_{1/2,c} = -26,4 \pm 1,5$ mV (n = 12); $(V_{1/2,GF} = -27,6 \pm 1,3$ mV (n = 7); $(V_{1/2,H89} = -24,8 \pm 2,4$ mV (n = 10); $(V_{1/2,DAM} = -27,0 \pm 2,1$ mV (n = 5); $k_c = 7,6 \pm 0,5$ mV; $k_{GF} = 6,6 \pm 0,6$ mV; $k_{H89} = 7,7 \pm 0,6$ mV; $k_{DAM} = 8,6 \pm 1,2$ mV, $p = 0,05$) (**36. ábra** E és F panel). Minden kezelés esetében meghatároztuk az áramsűrűségeket (CD) is, a H89 (PKA) és Damnacanthal ($p56^{lck}$) esetében szignifikáns csökkenés következett be ($CD_c = 154 \pm 16$ pA/pF, $CD_{H89} = 89,4 \pm 14$ pA/pF, $CD_{DAM} = 85,9 \pm 20$ pA/pF, $p < 0,05$), míg a GF kezelés, méréseink szerint, nem befolyásolta jelentősen a csatornaaktivitást ($CD_{GF} = 163,1 \pm 25$ pA/pF).

Mindezek alapján, a PKC és a PKA, $p56^{lck}$ antagonistákkal végzett kísérleteknek megfelelően feltételezzük, hogy a Kv1.3 ioncsatorna immunológiai szinapszisba való rendeződésekor defoszforilálódik. Ezt a feltételezést az immunológiai szinapszisban résztvevő D10 sejtek gyorsabb inaktivációs kinetikája és kisebb áramsűrűsége támasztja alá. Azt gondoljuk, hogy a Kv1.3 szinapszisba vándorlása a defoszforiláció előfeltétele. A szinapszisban bekövetkező csatornamódosítás molekuláris mechanizmusa nem tisztázott, bár nagy valószínűséggel bizonyos protein foszfatázok (pl. CD45) magyarázhatják a Kv1.3 áramban bekövetkező változásokat, mint az leírták korábban [21]. A lassúbb aktivációs kinetika és az egyensúlyi aktiváció depolarizáló feszültségek felé való eltolódása a Kv1.3 csatorna mikro környezetében bekövetkező változásokat (magasabb viszkozitású) valószínűsíti, miközben az a szinapszisba szegregál. Ezt támasztja alá egy korábbi tanulmányunk, melyben a Kv1.3 csatornák esetében hasonló jelenséget figyelhetünk meg T-sejtekben: a membránviszkozitás növelésével, amelyet a membrán koleszterinszintjének növelésével értünk el, az aktivációs sebesség csökkent és az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése

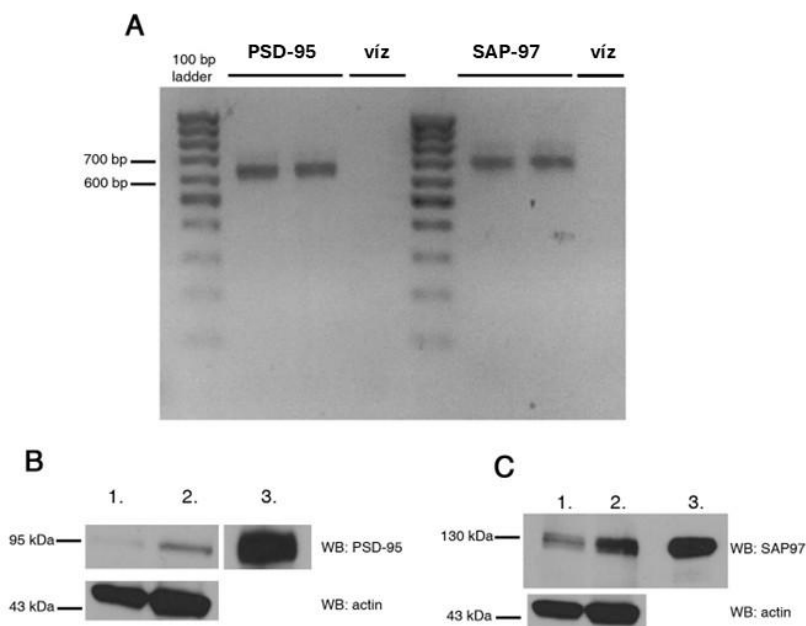
hajdu.peter.4_343_25

eltolódott [176]. Ezt a feltevést erősítik a PK antagonistákkal végzett kísérleteink: a PK inhibitorok csak az inaktivációs kinetikát módosítják, az aktiváció sem egyensúlyi, sem kinetikai paramétereinek változásában nem játszanak szerepet.

4.2.2 Kv1.3 ioncsatorna IS-be történő berendeződése: PDZ-domén fehérjék szerepe

4.2.2.1 A Jurkat sejtek PSD-95-öt és SAP97-et expresszálnak

A PSD-95 és a SAP97 egyaránt az idegsejtekben expresszálandó scaffolding fehérje, melyek különböző Kv-csatornák lokalizációját szabályozzák [140]. Annak megértéséhez, hogy ezek a fehérjék hatással lehetnek-e a Kv1.3 csatornák eloszlására a humán T-sejtekben (Jurkat), meg kellett vizsgálnunk, hogy ezekben a sejtekben is expresszálandó-e ezek a fehérjék. Ezért teljes RNS-t izoláltunk Jurkat sejtekből, és PSD-95 és SAP97 specifikus primerpárt használtunk a reverz transzkripció PCR elvégzéséhez. A termékeket agaróz gélen futtattuk, majd az elvárt bázispárméret alapján azonosítottuk a specifikus termékeket (**37. ábra A panel**), valamint szekvenciaazonosságát szekvenálással is ellenőriztük. A PSD-95 és a SAP97 fehérje szintű expressziójának megerősítésére Jurkat teljessejt lizátum western blot analízisét hajtottuk

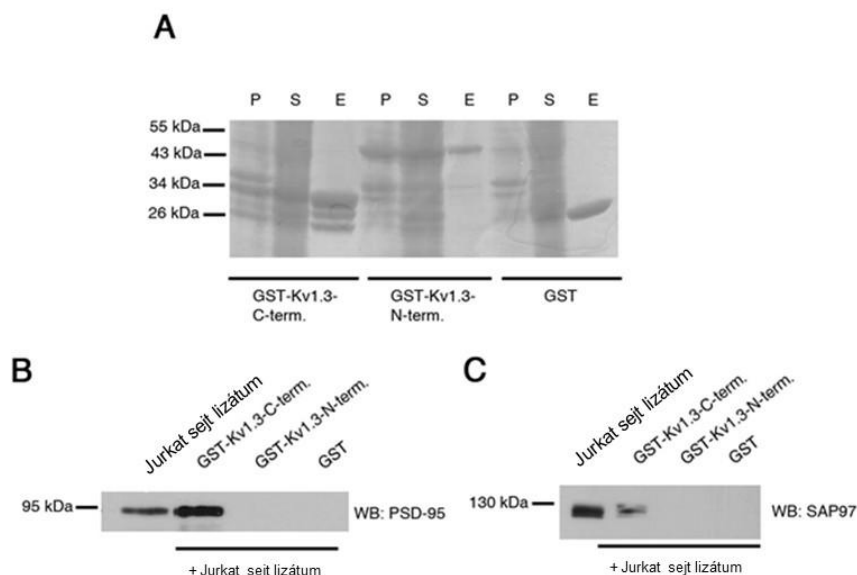


37. ábra. A Jurkat sejtek expresszálnak PSD-95-öt és SAP97-et. (A) A PSD-95 és SAP97 kódoló szekvenciák PCR-amplifikációját mutatja a teljes Jurkat cDNS-ből. A termékek mérete 629 bp (PSD-95), illetve 774 bp (SAP97) volt. (B-C) Teljes sejt lizátumok western blot analízise PSD-95 (B) vagy SAP97 (C) elleni antitest használatával. Pozitív kontrollként PSD-95 vagy SAP97 transzfektált HEK sejtek szolgáltak. Aktin blotot is végeztünk a PSD-95 és a SAP97 expressziós szintjének vizsgálatára a különböző sejtvonalakban. 1) Jurkat, 2) Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT, 3) PSD-95-tel (B) vagy SAP97-tel (C) transzfektált HEK tsA-201 sejtekben.

vége, pozitív kontrollként PSD-95 vagy SAP97 transzfektált HEK tsA-201 sejteket használtunk. A két fehérje méretének megfelelően 95 és 130 kDa körül specifikus sávokat tudtunk

kimutatni, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a Jurkat sejtek expresszálják mind a PSD-95-öt, mind a SAP97-et (**37. ábra** B és C panele).

4.2.2.2 A PSD-95 és a SAP97 kölcsönhatásba lép a Kv1.3 C-terminális régiójával



38. ábra. PSD-95 és a SAP97 a Kv1.3 C-terminálisához kötődik. (A) A bakteriálisan letermeltetett GST, a Kv1.3 C-terminális doménjének GST-taggal jelölt (GST-Kv1.3-C-term) és a Kv1.3 N-terminális doménjének GST-taggal jelölt (GST-Kv1.3-N-term) fehérjék Coomassie-festése. A bakteriális lizátumokat szonikálást követően centrifugáltuk, majd az így kapott pelletet (P) és felülúszót (S) a GST pull-down assay eluátumával (E) együtt SDS-PAGE gélen megfuttattuk. A pull-down kísérletek eluátumait PSD-95 (B) vagy SAP97 (C) antitestekkel jelöltük a western-blot során, amelyeket a teljes Jurkat-sejt lizátumok sepharose-gyöngyökkel immobilizált fúziós fehérjékkel (GST, GST-Kv1.3-N-terminus vagy GST-Kv1.3-C-terminus) történő inkubálásával nyertünk (pozitív kontroll: Jurkat-sejtek lizátum). A PSD-95 és a SAP97 csak a GST-Kv1.3-C-terminális fúziós fehérje eluátumban és a Jurkat-sejtek lizátumában volt kimutatható.

Továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a Kv1.3 csatorna kölcsönhatásba lép-e a PSD-95 és a SAP97 fehérjékkel, és ha igen, akkor a csatorna melyik része vesz részt ebben a kölcsönhatásban. A potenciális kölcsönhatási helyek (PDZ és SH3 kötő domének) a csatorna N- és C-terminális régiójában található, ezért olyan GST-taggal ellátott bakteriális expressziós plazmidokat hoztunk létre, amelyek a Kv1.3 első 184 (GST-Kv1.3-N-term) vagy utolsó 94 aminosavát (GST-Kv1.3-C-term) tartalmazzák. A teljes Jurkat sejt lizátumot a pull-down kísérleteinkben a rekombináns Kv1.3 csatorna-terminálisokkal vagy csak a GST-vel inkubáltuk. A GST oszlopról eluált fehérjékből a PSD-95 és SAP97 jelenlétét a két fehérje ellen termeltetett antitestek felhasználásával, western blottal mutattuk ki. A Coomassie-festés egyértelműen mutatja, hogy mindkét Kv1.3 konstruktot hatékonyan expresszáltuk és tisztítottuk a bakteriális

lizátumból (**38. ábra** A panel). A western blot alapján nyilvánvaló, hogy mind a PSD-95, mind a SAP97 csak a Kv1.3 C-terminális régiójához kötődik, a csatorna N-terminálisán keresztül nem tudunk kölcsönhatást azonosítani (**38. ábra** B és C panel).

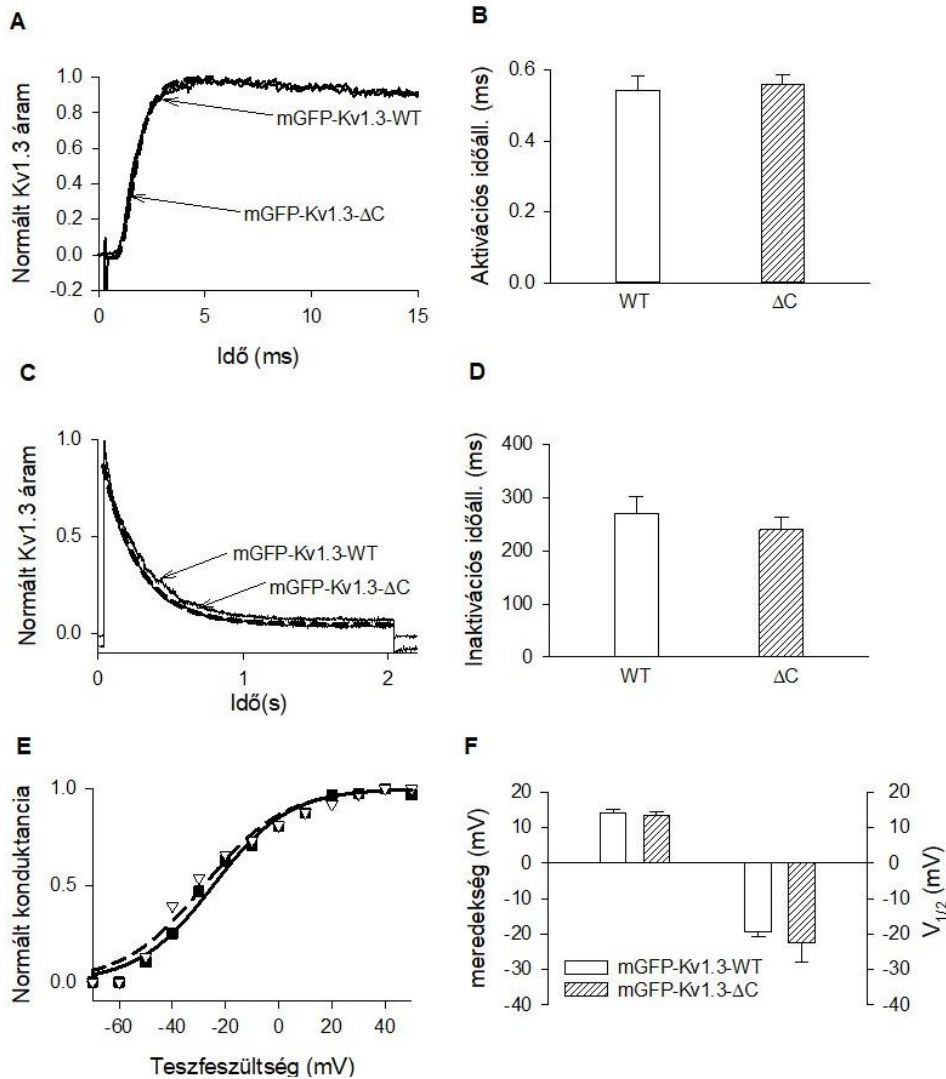
4.2.2.3 *Az mGFP-taggelt vad-típusú és C-terminális deletált Kv1.3 csatornák biofizikai sajátosságai*

A Kv1.3 lokalizációjának konfokális mikroszkópiával történő vizsgálata miatt olyan Kv1.3 konstruktokat hoztunk létre, amelyeket fluoreszcens fehérjével jelöltünk: monomer zöld fluoreszcens fehérjét (mGFP) a vad típusú Kv1.3-hoz (mGFP-Kv1.3-WT) és a csatorna C-terminális deletált mutáns (mGFP-Kv1.3- Δ C) N terminálisa elé klónoztuk. Az mGFP-Kv1.3- Δ C mutáns csatornából a PSD-95 és a SAP97 potenciális kötőhelyeket távolítottuk el (utolsó 84 aminosavat a szekvenciából).

Mielőtt a mutáns ioncsatornákat mikroszkópos kísérletekhez használtuk volna, elengedhetetlen volt annak vizsgálata, hogy az mGFP tag és/vagy a C-terminális csonkítás okozott-e bármilyen változást a Kv1.3 biofizikai jellemzőiben. Patch-clamp technikát alkalmazva, outside-out patch konfigurációban összehasonlítottuk a CHO sejtekben retrovírusos transzdukcióval expresszált mGFP-Kv1.3-WT és mGFP-Kv1.3- Δ C csatornák kapuzási paramétereit. Azt találtuk, hogy az mGFP-Kv1.3-WT és az mGFP-Kv1.3- Δ C áramok aktivációs kinetikája azonos: a 15 ms-os, +50 mV-ra történő depolarizációs impulzusok által kiváltott áramgörbék megközelítőleg identikusak, és mGFP-Kv1.3-WT és az mGFP-Kv1.3- Δ C csatornák aktivációs időállandója nem különbözött ($0,54 \pm 0,04$ ms mGFP-Kv1.3-WT (n=10) és $0,56 \pm 0,02$ ms az mGFP-Kv1.3- Δ C (n=9) esetében, $p=0,698$) (**39. ábra**, A és B panel). A hosszú depolarizáló impulzus során regisztrált mGFP-Kv1.3-WT és mGFP-Kv1.3- Δ C áramgörbék átfedésben vannak, ami azt jelzi, hogy a C-terminális „csonkítása” nem módosítja az inaktivációs kinetikát: az inaktivációs időállandók statisztikailag nem különböztek az mGFP-jelölt WT és a C-terminális deletált Kv1.3 csatornák esetében (271 ± 31 ms volt az mGFP-Kv1.3-WT (n=7) és 240 ± 23 ms (n=6) az mGFP-Kv1.3- Δ C esetében $p=0,158$, (**39. ábra**, C és D panel)).

Végül mindkét csatorna fenotípus esetében meghatároztuk az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének paramétereit: az mGFP-Kv1.3- Δ C csatornák normalizált konduktancia-tesztpotenciál görbéinek kis mértékű balra tolódása nem volt szignifikáns (a meredekségi tényező $14,2 \pm 1$ mV és $13,5 \pm 1$ mV volt az mGFP-Kv1.3-WT (n=7) és mGFP-Kv1.3- Δ C (n=5), $p=0,458$); míg $V_{1/2}$ értéke $-19,5 \pm 1,2$ mV volt az mGFP-Kv1.3-WT (n=7) és $-25,4 \pm 5,4$ mV az

mGFP-Kv1.3.3- Δ C (n=5) esetében, $p=0,282$, (**39. ábra**, E és F panel)). Úgy véljük, hogy mivel az mGFP-Kv1.3-WT és a mGFP-Kv1.3- Δ C csatornák biofizikai jellemzői azonosak, a csatornák IS kialakulásakor bekövetkező átrendeződésben mutatkozó különbség nem tulajdonítható a C-terminális deletált csatornák megváltozott biofizikai sajátságainak.

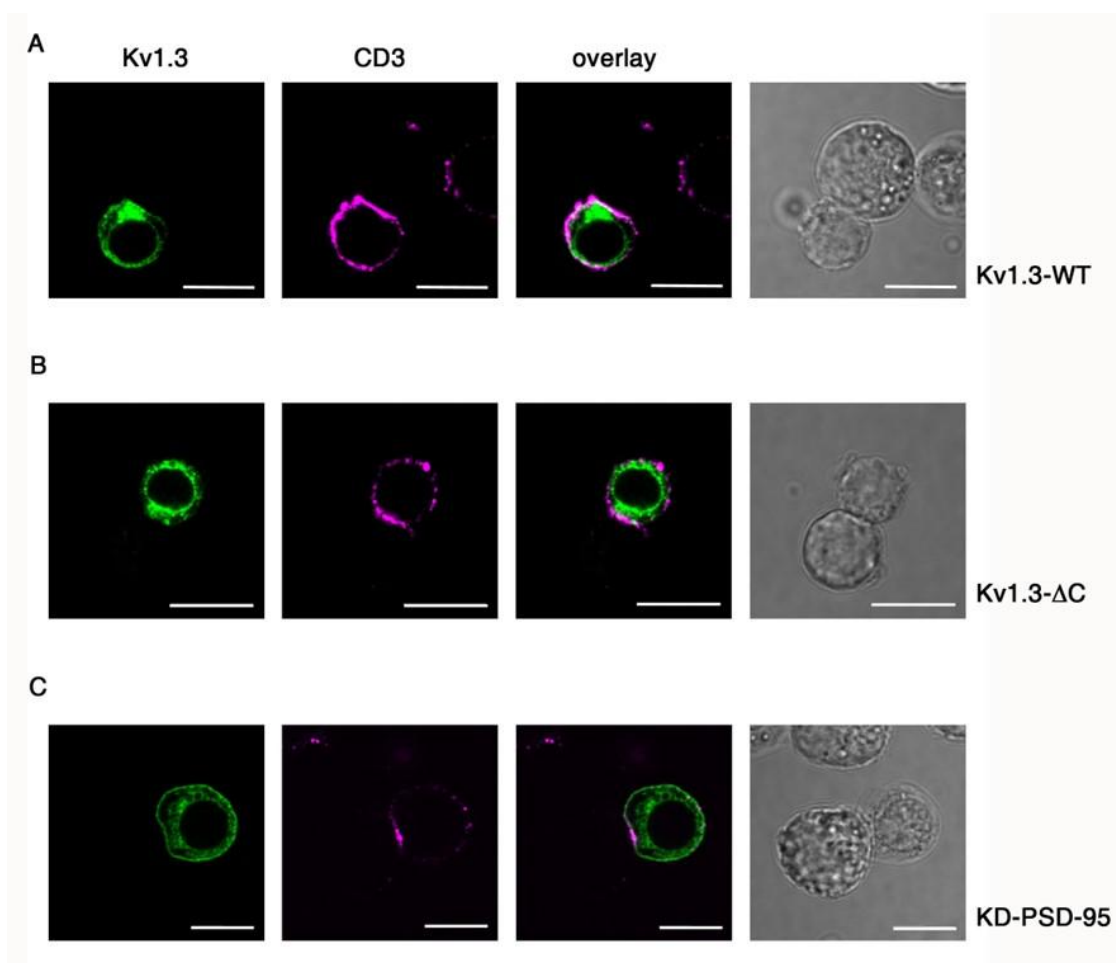


39. ábra. A Kv1.3 csatorna konstrukciók biofizikai tulajdonságai. (A) mGFP-Kv1.3-WT és az mGFP-Kv1.3- Δ C áram aktivációs kinetikájának vizsgálatához a CHO patcheket (outside-out) 15 ms-ig +50 mV-ra depolarizáltuk -120 mV-ról (on-line leak korrekciót alkalmaztunk). A reprezentatív áramgörbéket a Hodgkin-Huxley-moddal kapott illesztett görbékkel együtt tüntettük fel. **(B)** Az mGFP-Kv1.3-WT (WT) és az mGFP-Kv1.3- Δ C (Δ C) csatornák aktivációs időállandója (átlag \pm SEM, $n>6$). **(C)** Az áramok inaktivációs kinetikájának tanulmányozásához a patch-eket 2 másodpercig +40 mV-ra depolarizáltuk -120 mV-os tartópotenciálról. Az mGFP-Kv1.3-WT és az mGFP-Kv1.3- Δ C konstrukció tipikus áramfelvételei láthatóak az illesztett görbékkel együtt. **(D)** Az mGFP-Kv1.3-WT (WT) és az mGFP-Kv1.3- Δ C (Δ C) csatornák inaktivációs időállandója (átlag \pm SEM, $n>6$). **(E)** A normált konduktancia-tesztpotenciál függése egy mGFP-Kv1.3-WT (fekete négyzet) és mGFP-Kv1.3- Δ C (üres háromszögek) expresszázó patch esetében, valamint az illesztett Boltzmann-függvények. (folytonos vonal: mGFP-Kv1.3-WT, szaggatott vonal: mGFP-Kv1.3- Δ C) **(F)** Az egyensúlyi aktiváció paraméterei (meredekség (k) és középpont ($V_{1/2}$)) a két csatornakonstrukció esetében (átlag \pm SEM, $n=7$ és 5 az mGFP-Kv1.3-WT és az mGFP-Kv1.3- Δ C esetében).

4.2.2.4 A Kv1.3 C-terminális deléciója vagy a PSD-95 expresszió hiánya gátolja a Kv1.3 felhalmozódását az immunológiai szinapszisban

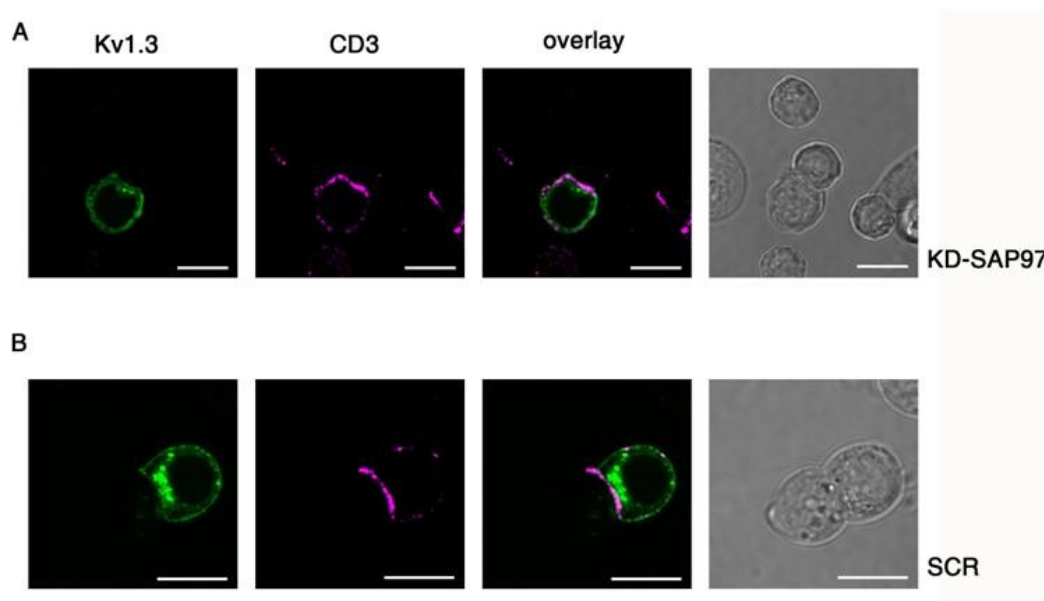
Annak feltárására, hogy a PSD-95 vagy a SAP97 befolyásolja-e a Kv1.3 berendeződését az immunológiai szinapszisba, IS-t hoztunk létre a (különböző Kv1.3 konstruktokat expresszáló) Jurkat T-sejtek és Raji B-sejtek között (**40. ábra, 41. ábra**) A sejteket az IS-képződés után öt különböző időpontban (1, 5, 10, 20 és 30 perc) fixáltuk, hogy feltárjuk a Kv1.3 redistribúció kinetikáját a plazmamembránban. Mivel az irodalomból ismert, hogy a CD3 molekulák átrendeződnek az immunológiai szinapszisba, a szinapszisképződés ellenőrzésére és az IS fizikai határainak meghatározására anti-CD3 immunfluoreszcens jelölést használtunk pozitív kontrollként [21]. A Kv1.3 csatornák IS kialakulásakor bekövetkező átrendeződésének számszerűsítésére bevezettük az akkumulációs arányt (AR), amely arányos a Kv1.3 többlet mennyiségével az IS területén a csatornák egyenletes eloszlásához képest a nem IS-ben lévő sejtek membránjában. Kiértékelési módszerünk negatív kontrolljaként egyedülálló sejteket is elemeztünk: véletlenszerűen kiválasztottunk a plazmamembrán az IS-hez hasonló területű részt, amely reprezentálja a szinapszist képző sejtek közötti kontakt régiót, és kiszámítottuk az AR-t. Elméletileg az önálló sejtek AR-jának megközelítőleg 1-nek kellene lennie. Azonban a Kv1.3 membránbeli eloszlásának foltos jellege miatt, ami a lipid raftokban való lokalizációjának következménye lehet, esetenként a számított AR-értékek ezekben a sejtekben is 1-nél magasabbak voltak. Annak érdekében, hogy kizárjuk ezeket a hamis pozitív adatokat, a Kv1.3 berendeződését az IS-be csak olyan AR értékek esetén fogadtuk el, amelyek 1,5 vagy annál magasabbak voltak.

A PSD-95 és a SAP97 T-sejt Kv1.3 csatornáinak IS-be történő berendeződésében betöltött szerepének további vizsgálatához (nem csak a Kv1.3-on lévő kötőhelyeik eltávolításával) mindkét fehérje expresszióját leszabályoztuk nem transzdukált ill. az mGFP-Kv1.3-WT-t expresszáló Jurkat sejtekben. A lentivirális transzdukációs módszert alkalmaztunk a specifikus shRNS bejuttatására a sejtekbe, a csendesítés hatékonyságát western blot segítségével ellenőriztük, valamint puromycin antibiotikum alkalmazással szelektáltuk ki a géncsendesített sejteket.



40. ábra. A Kv1.3 és a CD3 berendeződése az immunológiai szinapszisba Jurkat sejtekben. Reprezentatív ábrák az immunológiai szinapszis kialakulását mutatják SEE-indukált Raji B és **(A)** az mGFP-Kv1.3-WT-t (Kv1.3-WT), **(B)** mGFP-Kv1.3-ΔC-t (Kv1.3-ΔC) vagy **(C)** a PSD-95 géncsendesített, mGFP-Kv1.3-WT-t (KD-PSD-95) expresszáló Jurkat sejt között. Az 1. oszlop a Kv1.3 jelet mutatja, (mGFP, zöld). A Jurkat sejteket anti-CD3 elsődleges és Alexa Fluor 647 GAMIG másodlagos antitesttel is jelöltük a szinapszisok azonosítására (2. oszlop, lila). A 3. oszlopban a Kv1.3 és az anti-CD3 fluoreszcenciás jelek fúziója (overlay), míg a 4. oszlopban az IS-t alkotó sejtek fáziskontrasztos képe látható. A skála 10 μm.

Az mGFP-jelölt vad típusú csatornák nagy arányban halmozódnak fel az immunológiai szinapszisban: az AR a sejtek kb. 30%-ában 1 perccel az IS kialakulása után volt 1,5-nél magasabb, és a Kv1.3 polarizált sejtek frakciója monoton csökkent a 30. percig (**42. ábra A** panel). Ezzel szemben a C-terminális deletált csatornák (mGFP-Kv1.3-ΔC) eltérő akkumulációs kinetikát mutattak: a sejtek kevesebb mint 10%-a mutatott Kv1.3 polarizációt bármely időpontban, és az AR paraméter nem mutatott időfüggést (**42. ábra A** panel). Körülbelül 30

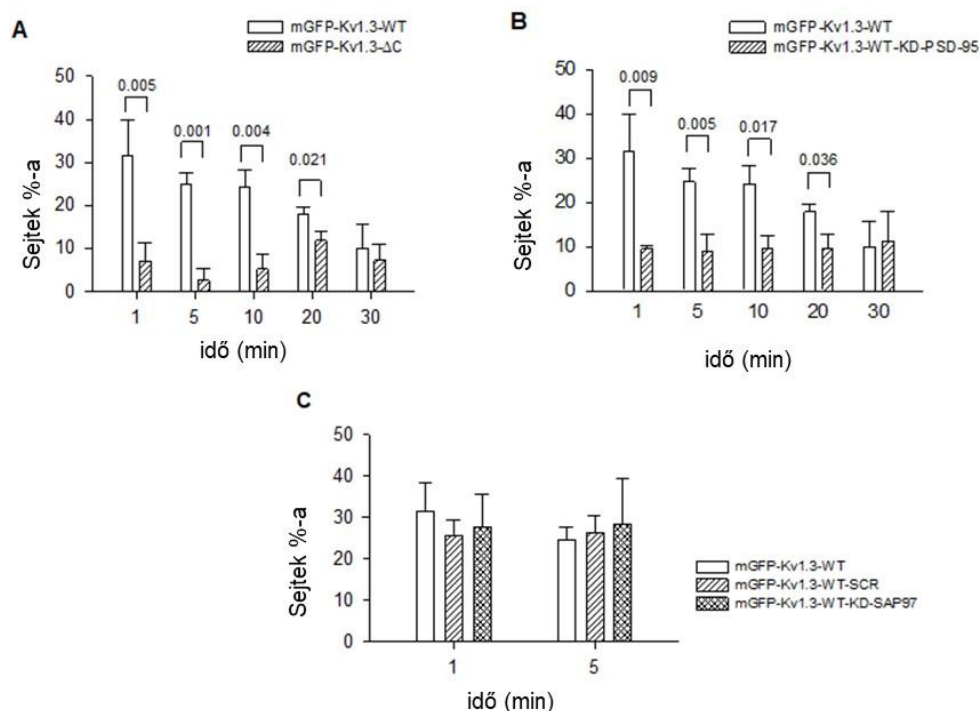


41. ábra. A Kv1.3 és a CD3 berendeződése az immunológiai szinapszisba scramble vagy SAP97 shRNS-t, vad típusú Kv1.3-at expresszáló Jurkat sejtekben. Reprezentatív ábrák az immunológiai szinapszis kialakulását mutatják SEE-indukált Raji B és (A) a SAP97 géncsökkentett, mGFP-Kv1.3-WT-t (KD-SAP97), (B) scramble shRNS -sel transzdukált, mGFP-Kv1.3-WT-t (SCR) expresszáló Jurkat sejt között. Az 1. oszlop a Kv1.3 jelet mutatja, (mGFP, zöld). A Jurkat sejteket anti-CD3 elsődleges és Alexa Fluor 647 GAMIG másodlagos antitesttel is jelöltük a szinapszisok azonosítására (2. oszlop, lila). A 3. oszlopban a Kv1.3 és az anti-CD3 fluoreszcenciás jelek fúziója (overlay), míg a 4. oszlopban az IS-t alkotó sejtek fáziskontrasztos képe látható. A skála 10 μ m.

perccel az IS kialakulása után a Kv1.3-polarizált sejtek aránya megegyezett a két sejtvonal esetében.

A Kv1.3 teljes C-terminális régiójának levágása nem specifikusan akadályozhatja meg mindenféle intracelluláris kihorgonyzó fehérjék kötődését a csatornához. Ezért annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a PSD-95 és a SAP97 Kv1.3 csatorna redisztribúciójára gyakorolt specifikus hatását, összehasonlítottuk a Kv1.3 polarizációját kontroll, PSD-95 és SAP97 géncsökkentett Jurkat sejtekben az IS kialakulásakor. Azt találtuk, hogy a PSD-95 géncsökkentett sejtek hasonlóan viselkedtek, mint a C-terminálisán „megcsonkított” csatornát expresszáló sejtek: a Kv1.3 polarizált sejtek aránya 1 perc után szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll sejtekhez képest, és az AR a 30. perccig nem mutatott időfüggést (42. ábra B panel). Ezzel szemben a SAP97 „kiiktatása” vagy a nem specifikus scramble kontroll shRNS transzdukciója nem volt hatással a Kv1.3 IS-beli berendeződésére (42. ábra C panel) a kontroll Jurkat sejtekhez képest. Ezek az eredmények alátámasztják hipotézisünket, miszerint

a PSD-95 adapter fehérje kulcsfontosságú szerepet játszik a Kv1.3 ioncsatornák immunológia szinapszisba történő átrendeződésében.

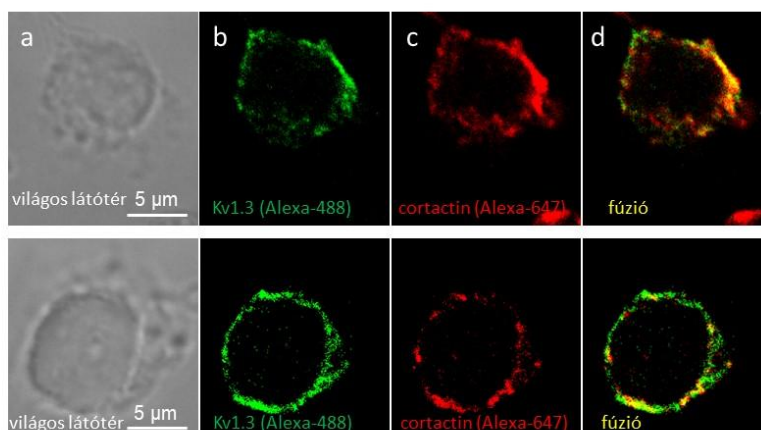


42. ábra. Kv1.3 csatornák felhalmozódása az IS-ben: a Kv1.3 C-terminális és a PSD-95 szerepe. Az IS kialakulása során polarizált Kv1.3 eloszlást mutató sejtek százalékos aránya (sejtek %-a) **(A)** vad típusú (Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT, fehér oszlopok) vagy C-terminális deletált (Jurkat-mGFP-Kv1.3-ΔC, sraffozott oszlopok) Kv1.3 konstruktot expresszáló Jurkat sejtekben, valamint **(B)** kontroll (Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT) vagy PSD-95 géncsendesített (Jurkat-mGFP-Kv1.3-W-KD-PSD-95) Jurkat sejtekben, amelyek ugyanazt az mGPF-Kv1.3-WT-ot expresszálják. A p-értékek csak akkor tüntettük fel, ha statisztikai különbség volt. **(C)** A Kv1.3 csatornák felhalmozódását az IS-ben nem befolyásolja a SAP97 vagy a scramble shRNS-sel történő transzdukció. Az IS kialakulása során polarizált Kv1.3 expressziót mutató sejtek százalékos aránya a vad típust (Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT, fehér oszlop), a SAP97 csendesített (Jurkat-mGFP-Kv1.3-WT-KD-SAP-97) vagy scramble shRNS transzdukált Jurkat sejtekben (Jurkat-mGFP-Kv1.3-SCR), mindhárom mGPF-Kv1.3-WT csatornát expresszált.

4.2.3 Kv1.3 ioncsatorna immobilizációjának molekuláris háttere

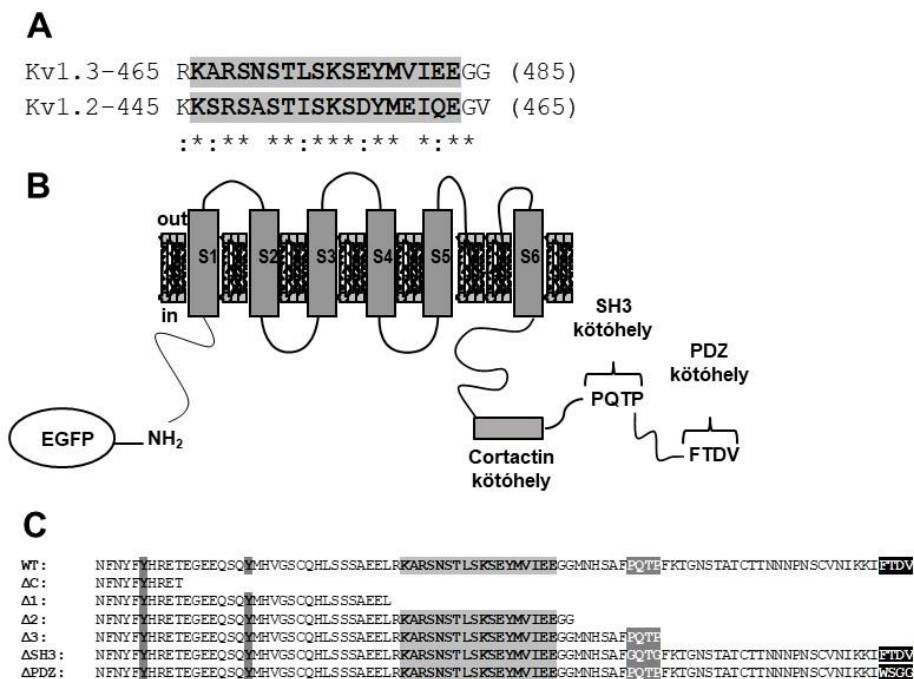
4.2.3.1 Kv1.3 csatorna és a cortactin ko-lokalizál, cortactin/SH3/PDZ kötőhely Kv1.3 mutánsok

Mivel számos Kv-csatorna rendelkezik cortactin kötőhellyel és kimutatták ezen ioncsatornákkal a kölcsönhatást, ezért megvizsgáltuk, hogy a Kv1.3 csatornák ko-lokalizálnak-e a cortactinnal [251-256]. Immuncitokémiai kísérleteket végeztünk FLAG-Kv1.3 csatornát stabilan expresszáló HEK-293 sejtvonalon: a plazmamembránban lokalizált Kv1.3 csatornákat fixált, de nem-permabilizált sejteken jelöltük, majd ezt követte a cortactin intracelluláris festése. A **43. ábra** konfokális felvételei azt mutatják, hogy a membránbeli jelölt FLAG-Kv1.3 csatornák (zöld) és a cortactin (piros) fluoreszcens jelei nagymértékben átfednek egymással, ami azt jelzi, hogy ezek a fehérjék egymás közelében helyezkedhetnek el, és előrevetíti a közöttük lévő lehetséges kölcsönhatást.



43. ábra. A Kv1.3 csatornák ko-lokalizálódnak a cortactinnal. Két reprezentatív FLAG-Kv1.3-at expresszáló HEK-293 sejt 1 μm szeletvastagságú konfokális felvételei FLAG (egér) és cortactin (nyúl) ellenes antitestekkel jelölve. A panelek a következőket mutatják: *a*: a sejt világos látóterű képe, *b*: Kv1.3 (zöld), *c*: cortactin (piros), *d*: a piros és zöld csatornák átfedése.

Összehasonlítva a Kv1.2 és a Kv1.3 C-terminálisát sikerült a Kv1.3-ban egy, a Kv1.2-ben meglévő cortactin-kötőhelyhez hasonló (későbbiekben cortactin kötőhelyként hivatkozunk rá), 19 aminosavból álló domént azonosítottunk (**44. ábra** A panel) [251]. Továbbá egy SH3- (PxxP) és egy PDZ kötő (FTDV) motívum is található a Kv1.3 C-terminálisán a feltételezett cortactin kötőhelyhez képest „downstream” (**44. ábra** B része). Ezen elemzés alapján a számos

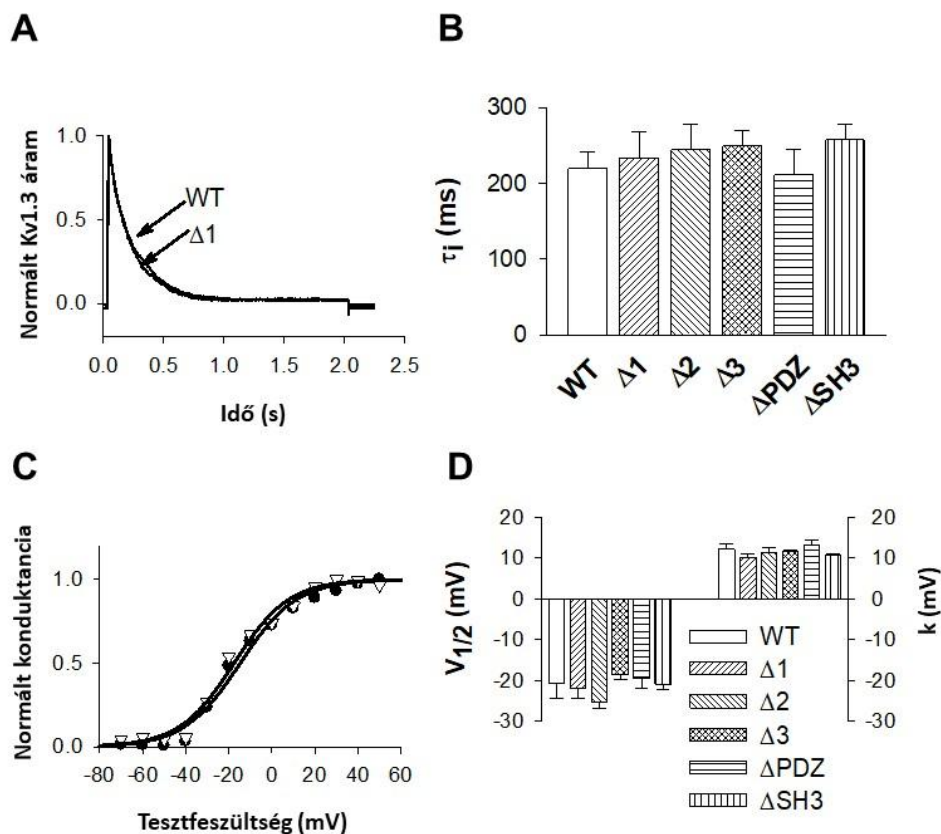


44. ábra. A vad típusú Kv1.3 csatorna és a C-terminális mutációi. (A) A Kv1.2 cortactin-kötőhely és a Kv1.3 C-terminusának összevetése. **(B)** A vad típusú (WT) Kv1.3 pórusképző alfa alegység sematikus ábrázolása EGFP taggel, cortactin-, SH3- és PDZ-kötő régiókkal. **(C)** A WT Kv1.3 és a mutáns Kv1.3 C-terminálisok aminosav-szekvenciái a 431. aminosavtól kezdődően. ΔC mutáns: a teljes C-terminus, kivéve a membrán-targetáláshoz szükséges HRET-szekvencia, el van távolítva. A Δ1 mutáció: Kv1.3 C-terminális a cortactin-kötőhely előtt. Δ2 mutáns: cortactin kötőhely után történt a deléció. Δ3: a Kv1.3 C-terminus levágása közvetlenül az SH3 kötőhely után. ΔSH3 mutáns: a PQTG-ről GQTG-re történő aminosav-szekvencia változtatás csupán. ΔPDZ: az FTDV-ről WSGG-re történő aminosav-szekvencia átalakítás.

Kv1.3 C-terminális mutánst terveztünk: 1) nem volt egyik kötőhely (cortactin, SH3, PDZ) sem (Δ1); 2) csak cortactin-kötő motívummal (Δ2) rendelkezett; 3) cortactin- és SH3-kötő domén (Δ3) volt meghagyva; néhány aminosav mutációjával pedig teljes hosszúságú Kv1.3 csatornákat SH3-kötő domén (ΔSH3) vagy PDZ-kötő szekvencia (ΔPDZ) nélkül (**44. ábra C** része). Egy korábban tervezett C-terminális deléciós mutánst, a ΔC-t is felhasználtuk (lásd az előző fejezetben). A ΔPDZ Kv1.3 mutáns PDZ fehérjék kötődésének elmaradását ko-immunprecitációval igazoltuk (ábrát nem mutatunk). Mindezek a mutánsok információt nyújthatnak arról, hogy a Kv1.3 és a cortactin kölcsönhat-e, valamint, hogy egyéb adapter fehérjék (hDlg1, PSD95) szükségesek-e e kötődés kialakításához.

4.2.3.2 Mutáns csatornák biofizikai sajátosságai

A Kv1.x csatornák C-terminusának delécioja a fehérjék funkcióvesztéséhez vagy a membrán expresszió elmaradásához is vezethet [257, 258]. Következésképpen meghatároztuk a mutáns

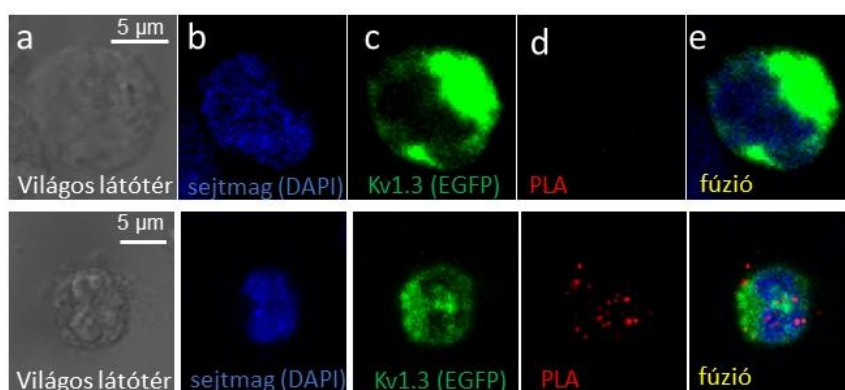


45. ábra. Kv1.3 mutánsok biofizikai jellemzése. (A) Az inaktivációs kinetika meghatározásához az outside-out patcheket -120 mV-os tartópotenciálról 2 másodpercig +40 mV-ra depolarizáltuk. Az EGFP-vel jelölt WT és $\Delta 1$ konstrukció tipikus áramfelvételei láthatók. **(B)** Inaktivációs időállandó (τ_i) a különböző Kv1.3 mutánsok esetében. **(C)** A normált konduktancia a tesztpotenciál függvényében egy WT (fekete körök) és egy $\Delta 1$ (üres háromszögek) konstruktot expresszáló patch esetében, valamint az illesztett Boltzmann-függvény (folytonos vonalak) ábrázoltuk. **(D)** Az egyensúlyi aktiváció paraméterei (meredekség, k , félaktivációs feszültség $V_{1/2}$) az egyes mutánsok esetében. A **(B)** és **(D)** paneleken 5-11 sejt átlagát és a SEM-et ábrázoltuk.

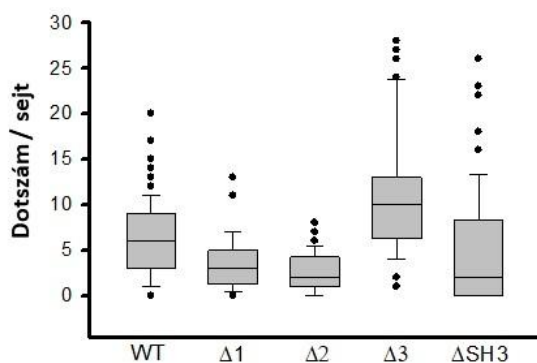
Kv1.3 csatornák elektrofiziológiai sajátosságait. A Kv1.3 variánsokat tranziens módon transzfektáltuk HEK-293 sejtekbe, majd outside-out patch-clamp konfigurációban rögzítettük az áramgörbéket. **45. ábra** alapján elmondható, a WT és $\Delta 1$ plazmidot expresszáló patch-ben a 2 szekundum hosszúságú depolarizáció során kapott áramgörbék szinte teljesen megegyeznek (a láthatóság kedvéért nem minden mutánst tüntettünk fel). Az inaktivációs időállandók értéke statisztikailag azonos volt az összes konstrukt esetén: WT: 219 ± 22 (n=8),

$\Delta 1$: 233 ± 36 (n=5), $\Delta 2$: 244 ± 33 (n=7), $\Delta 3$: 249 ± 20 (n=8), $\Delta SH3$: 257 ± 22 (n=8), ΔPDZ : 211 ± 34 (n=11) ($p=0,831$) (**45. ábra B panel**). Továbbá minden csatorna fenotípus esetében meghatároztuk az aktiváció feszültségfüggésének egyensúlyi paramétereit: a normált konduktanciát ábrázoltuk a tesztpotenciál függvényében, és Boltzmann-függvényeket illesztettünk az adatpontokra (**45. ábra C panelén** csak a WT és a $\Delta 1$ esetében látható). Azt találtuk, hogy mind a félmaximális aktivációs feszültség ($V_{1/2}$), mind a meredekség (k) nem különbözött statisztikailag egyetlen Kv1.3 mutáns esetében sem (k értékei: WT: $12,2 \pm 1,2$ mV (n=5), $\Delta 1$: $10,1 \pm 1$ mV (n=4) $\Delta 2$: $11,3 \pm 1,1$ mV (n=6), $\Delta 3$: $11,6 \pm 0,4$ mV (n=6) $\Delta SH3$: $10,6 \pm 0,4$

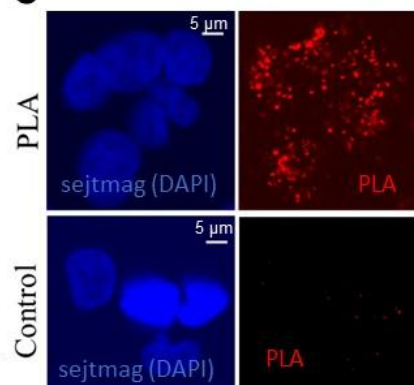
A



B



C



46. ábra. A cortactin és a Kv1.3 csatorna kölcsönhatása HEK-293 sejtekben. (A) Vad típusú (WT), EGFP-Kv1.3-transzfectált HEK-293 sejtekkel végzett PLA-kísérletek. Felső sor: negatív kontroll, csak másodlagos antitesteket adtunk, alsó sor: mind elsődleges (anti-GFP és anti-cortactin), mind másodlagos antitesteket használtunk. Az fehérjék kölcsönhatását piros pontok jelentik. **(B)** PLA dotok sejtenkénti számának boxplotja. WT: 93, $\Delta 1$: 44, $\Delta 2$: 34, $\Delta 3$: 60 és $\Delta SH3$: 78 sejtet analizáltunk. Minden csoport szignifikánsan különbözik egymástól ($p < 0,001$), kivéve a $\Delta SH3$ és $\Delta 2$. **(C)** Az aktin és a cortactin közötti kölcsönhatás HEK-293 sejtekben. A HEK-293 sejteket nyúl anti-humán cortactin és egér anti-humán aktin antitestekkel (felső sor) vagy azok nélkül (alsó sor, csak PLA/másodlagos antitestek) jelöltük. Sejtmag festés (DAPI, kék) és PLA jel (piros).

mV (n=5) Δ PDZ: és $13,2 \pm 1,2$ mV (n=7) $p=0,285$; $V_{1/2}$ -re: WT: $-20,8 \pm 3,5$ mV (n=5), $\Delta 1$: $-22,0 \pm 2,4$ mV (n=4) $\Delta 2$: $-25,2 \pm 1,6$ mV (n=6), $\Delta 3$: $-18,7 \pm 1,1$ mV (n=6) Δ SH3: $-20,9 \pm 1,1$ mV (n=5) Δ PDZ: és $-19,6 \pm 2,5$ mV (n=7), $p=0,32$, **45. ábra** D része). Következésképpen a deléciók és a pontmutációk nem változtatták meg a csatornák biofizikai jellemzőit.

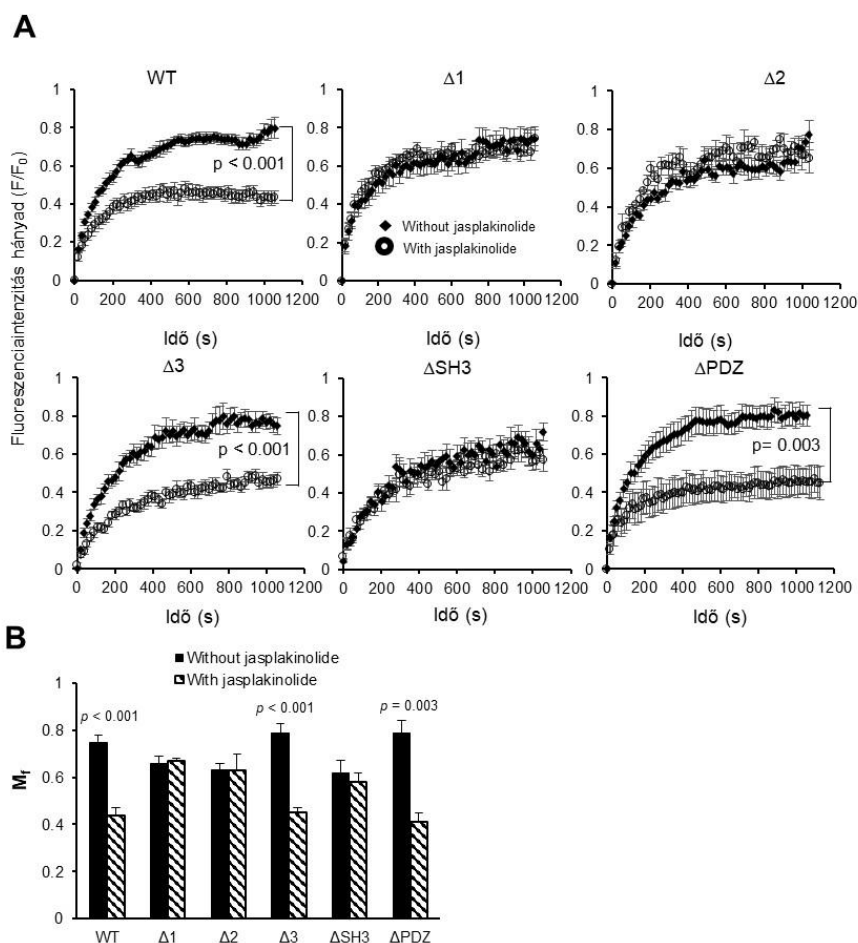
4.2.3.3 *Kv1.3 interakciója a cortactinnal*

PLA (proximity ligation assay) használatával meghatároztuk, hogy a cortactin és a Kv1.3 csatornák kölcsönhatásba lépnek-e egymással HEK-293 sejtekben, és hogy a csatornafehérje mely része fontos ebben a kapcsolódásban. Ez a módszer lehetővé teszi a <40 nm távolságban lévő fehérjék közötti kölcsönhatás kimutatását, melyet a mikroszkópos felvételen fluoreszcens foltok (dotok) megjelenése mutat [259]. Amint azt **46. ábra** A panele is mutatja, a vad típusú EGFP-Kv1.3 klónt expresszáló HEK-293 sejtek PLA jel pozitivitást mutatnak: piros dotok láthatók a sejtben. Ugyanezeket a kísérleteket elvégeztük $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, Δ SH3 mutánsokkal transzfektált sejtekkel, majd meghatároztuk a konfokális képeken a fluoreszcens foltok/dotok számát: a dotszám/sejt a WT Kv1.3 esetében szignifikánsan különbözött az összes Kv1.3 mutánshoz képest ($p < 0,001$). Továbbá a $\Delta 3$ mutánsban a PLA dotok száma szignifikánsan magasabb, mint a $\Delta 1$, $\Delta 2$ és Δ SH3 mutánsokban ($p < 0,001$, és WT-hoz képest is). Ez mind arra utal, hogy a cortactin képes a Kv1.3-hoz kötődni, valamint a két fehérje közötti kapcsolódás az SH3-kötő doménon keresztül történik. További PLA-kísérletek megerősítették a cortactin és az aktin szoros közelségét és kölcsönhatását, mely a Kv1.3 cortactin által az aktin citoszkeletonhoz való kapcsolódásában betöltött szerepére utal (**46. ábra** C panel) [153]. Ezután megvizsgáltuk, hogy a Kv1.3 laterális membránbeli diffúzióját befolyásolja-e az aktin polimerizáció, valamint a cortactin felelős-e a Kv1.3 aktinhoz történő kötődéséért.

4.2.3.4 *A Kv1.3 csatorna variánsok laterális mobilitása*

Az aktin citoszkeleton és a cortactin Kv1.3 laterális, membránbeli diffúziójában játszott szerepét FRAP-technikával tanulmányoztuk. Az EGFP-vel jelölt mutáns és vad-típusú Kv1.3 csatornák során kapott FRAP görbéket, azaz a EGFP fluoreszcens jelének visszatérését egy kiválasztott ROI-n belül az **47. ábra** mutatja. A FRAP kísérlet során kapott fluoreszcencia intenzitás visszatérés elemzésével megbecsültük a Kv1.3 csatornák mobil frakcióját (M_f) (**47. ábra**, A és B panel). Meghatároztuk a Kv1.3 membrán mobilitásának aktin-polimerizáció által indukált változását, hogy megállapítsuk az aktin szerepét a csatorna mobilitásában: a *Jaspis johnstoni* (egy tengeri szivacs) ciklikus peptidjével, a jasplakinolide-dal 50 percig előinkubáltuk

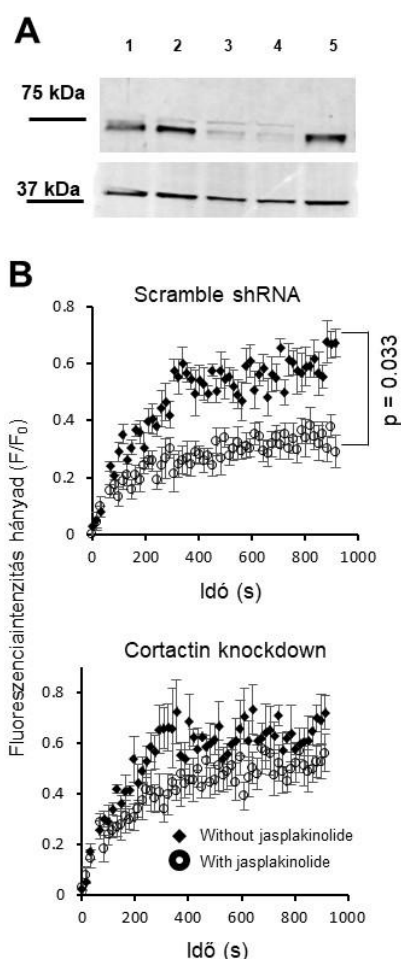
a sejteket, hogy aktin-polimerizációt és a filamentumok stabilizálódását indukáljuk [260, 261]. A jasplakinolide hozzáadása a vad típusú, $\Delta 3$ és ΔPDZ mutánsok M_f -jének jelentős, 40-50%-os csökkenését okozta a nem kezelt sejtekhez képest, de nem befolyásolta a $\Delta 1$, $\Delta 2$ és $\Delta SH3$ mutánsok M_f -jét (**47. ábra**). Az összes csatorna mutáns átlagos M_f értéke jasplakinolide előkezelés nélkül $0,71 \pm 0,01$ volt ($n=41$, **47. ábra**). A vad típusú, $\Delta 3$ és ΔPDZ csatornák átlagos M_f -je jasplakinolide-dal kezelve $0,43 \pm 0,01$ volt ($n=18$), míg a $\Delta 1$, $\Delta 2$ és $\Delta SH3$ csatornák átlagos M_f -je jasplakinolide-dal kezelve $0,63 \pm 0,01$ ($n=15$). Ezek az eredmények alátámasztják az SH3-kötő domén fontosságát a csatorna és az aktin citoskeleton közötti funkcionális kölcsönhatásban.



47. ábra. A WT és mutáns Kv1.3 csatornák laterális diffúziója (FRAP). (A) Minden ábrán a fluoreszcenciaintenzitás-arány (EGFP-jelölt Kv1.3 csatorna konstruktok jele) időbeli visszatérését mutatja jasplakinolide előkezelés nélkül (◆) vagy előkezeléssel (○). (n jasplakinolide nélkül/jasplakinolide-dal: 7/7 a WT, 6/6 a $\Delta 1$, 7/3 a $\Delta 2$, 7/7 a $\Delta 3$, 6/6 a $\Delta SH3$ és 8/4 a ΔPDZ). Az adatpontok átlagot és az SD-t jelölik. (B) Mobil frakció (M_f , átlag \pm SEM) minden egyes mutáns és WT Kv1.3 esetében.

4.2.3.5 A cortactin szerepe a Kv1.3 mobilitásban

A mutáns csatornákkal végzett FRAP-kísérletek megerősítették, hogy a cortactin és az aktin szerepet játszik a Kv1.3 csatorna immobilizációjában. A cortactin szerepének további vizsgálata céljából olyan HEK-293 sejtvonalat hoztunk létre, melyben lentivirális shRNS transzdukcióval csendesítettük a cortactint (**48. ábra**). Következő lépésben EGFP-jelölt vad típusú Kv1.3 csatornákat expresszáltunk ezekben a sejtvonalakban, és FRAP-kísérleteket végeztünk rajtuk jasplakinolide kezelés során illetve anélkül (**48. ábra** B panel). A Kv1.3 csatornák M_f értéke a cortactin csendesített sejtekben nem függött attól, hogy a sejteket jasplakinolide-dal előinkubáltuk-e vagy sem (M_f : $0,61 \pm 0,03$ a kontroll ($n=5$) és $0,50 \pm 0,08$



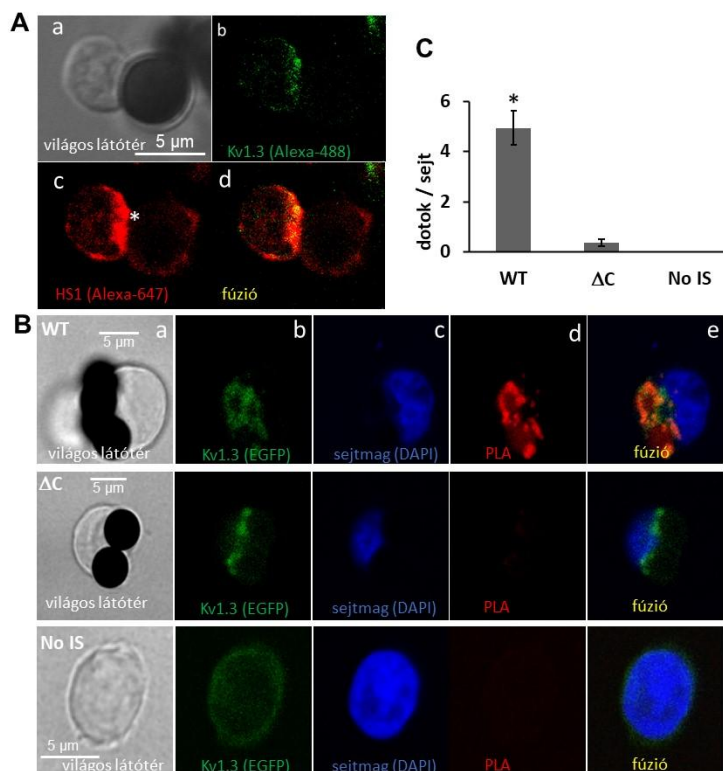
48. ábra. A cortactin csendesítés annullálja a jasplakinolide hatását.

(A) A cortactin vagy scramble shRNS vírusrészcscékkel transzdukált HEK-293 sejtek lizátumának Western blotja cortactin antitesttel jelölve (1,2: scramble shRNS; 3,4: cortactin shRNS, 5: nem transzdukált HEK-293). Nyúl anti-cortactin antitesttel jelöltünk, míg eger anti- β -aktint használtunk loading kontrollként. (B) A EGFP-jelölt Kv1.3 vad típusú csatorna FRAP görbéi scramble control (felső) v. cortactin (alsó) csendesített HEK-293 sejtekben, jasplakinolide előkezelés nélkül (\blacklozenge) vagy kezeléssel (\circ). Az adatpontok az egyes sejteken mért értékek átlagát és SD-jét jelölik ($n = 4-5$).

jasplakinoliddal ($n=5$), $p=0,43$). Ezzel szemben a vad típusú csatornák mobilitása jelentősen csökkent a kontroll shRNS transzdukált sejtekben, amikor az aktin stabilizálódását jasplakinolide-dal indukáltuk (M_f : $0,66 \pm 0,04$ a kontroll ($n=4$); és $0,41 \pm 0,09$ a jasplakinolid ($n=4$), $p=0,033$). Ezek a vizsgálatok még inkább alátámasztják, hogy a cortactin szerepet játszik a Kv1.3 F-aktinhoz történő kihorgonyzásában és laterális motilitásában.

4.2.3.6 A Kv1.3 és a HS1 kölcsönhatása a T-limfocitákban

E fejezet során részletezett kísérleteink azt igazolták, hogy HEK-293 sejtekben a Kv1.3 csatornák és a cortactin képes összekapcsolódni, mely befolyásolja a csatorna laterális



49. ábra. HS1 és a Kv1.3 kölcsönhatásba lép az immunológiai szinapszisban. (A) Konfokális mikroszkópos képek (1 μm -es szeletvastagság) a CD3/CD28 gyöngyökkel 30 perc-ig IS-ben lévő humán primer T-sejtről (a c panelben csillaggal jelölve a gyöngy). A sárga szín a Kv1.3 és a HS1 ko-lokalizációját jelöli d panelben. **(B)** WT mGFP-Kv1.3 csatornákat (WT, felső sor) és C-terminális deléciókat tartalmazó mGFP-Kv1.3 csatornákat (ΔC , középső sor) stabilan expresszáló Jurkat sejteken végzett PLA-kísérletek során rögzített konfokális képek, IS képződés után 30 perc elteltével lettel rögzítve. A WT mGFP-Kv1.3-t egyedülálló (No IS) expresszáló Jurkat sejt (az alsó sor). A HS1 és Kv1.3 között kialakuló kölcsönhatást a piros fluoreszcens dotok jelzik **(C)** Sejtenkénti PLA dotszám, átlag \pm SEM értéket ábrázoltuk WT (53 sejt), ΔC (86 sejt) és No IS (91 sejt)-re. Statisztikailag szignifikáns különbség volt megfigyelhető a WT vs. ΔC és a WT vs. „No IS” csoportokban ($p < 0,05$), míg a ΔC és a „No IS” csoportok között nem volt szignifikáns különbség.

mobilitását. Primér T-sejteken végzett immuncitokémiai kísérletek azt mutatták, hogy a natív Kv1.3 csatornák és a HS1 (a T-sejtekben expresszálódó cortactin analóg) kolokalizálódik az IS-ben (**49. ábra** A panel). A Kv1.3 és a HS1 kölcsönhatását az IS-ben a GFP-jelölt WT és ΔC mutáns Kv1.3 csatornákat stabilan expresszáló Jurkat T-sejteken végzett PLA-kísérletekkel vizsgáltuk (**49. ábra**, B és C panel). A PLA pozitív jel (piros dotok/foltok) megjelent az IS-ben, ahol a Kv1.3 felhalmozódik, amennyiben a teljes C-terminálissal rendelkező Kv1.3 volt jelen. Ezzel

szemben, amikor a PLA-t olyan sejteken végeztük, amelyek mGFP-Kv1.3- ΔC (ΔC -Kv1.3) csatornákat fejezték ki kölcsönhatást jelző PLA dotok nem detektálhatóak, mely a HS1-gyel történő kölcsönhatás elmaradását jelzi (**49. ábra**, B panel). Hasonlóképpen, a WT Kv1.3 csatornák nem hatnak kölcsön a HS1-gyel egyedülálló T-sejtekben, azaz amelyek nem voltak IS-ben egy CD3/CD28 gyönggyel. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a Kv1.3-HS1 kölcsönhatás csak a T-sejtek aktiválásakor következik be, és szigorúan az IS-ben történik. Továbbá bizonyítják, hogy a HS1 a T-limfocitákban, akár csak a cortactin a HEK293 sejtekben, a csatorna karboxil terminálján keresztül lép kölcsönhatásba a Kv1.3-mal.

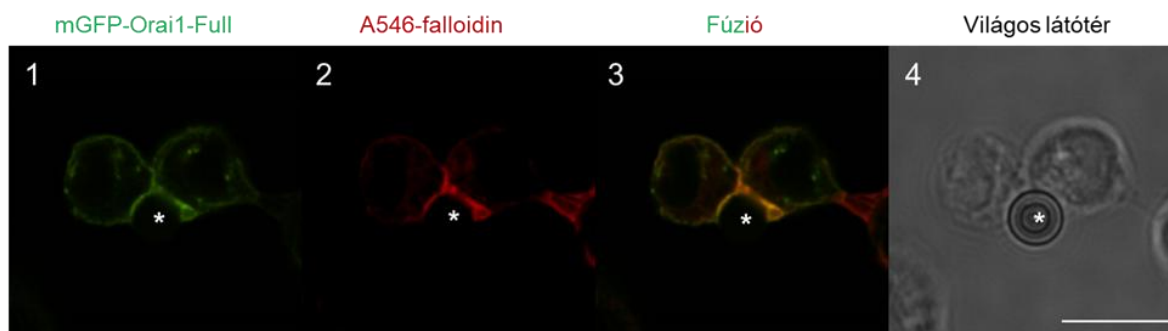
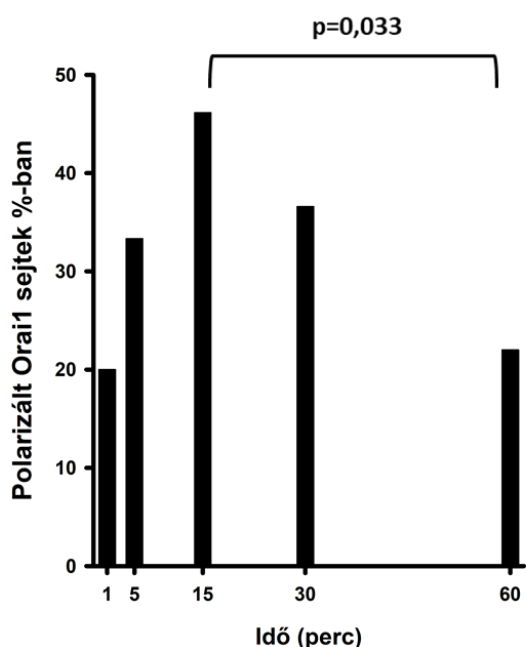
4.2.4 Az Orai1 IS-beli tartózkodása megváltoztatja a T-sejtek Ca^{2+} -válaszát

4.2.4.1 Az Orai1 immunológiai szinapszisba történő felhalmozódásának kinetikája

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 [128].

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 Jurkat sejtekben expresszáltattuk az mGFP-Orai1-Full konstruktot. 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) (**50. ábra** A panel). 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 polarizáltak definiáltuk [21]. 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 (15 perc vs. 60 perc: $p=0,033$) (**50. ábra** B panel). Mindezek alapján azt kívántuk tanulmányozni, hogy az Orai1 IS-beli tartózkodását mely fehérjék szabályozzák Jurkat T-sejtekben.

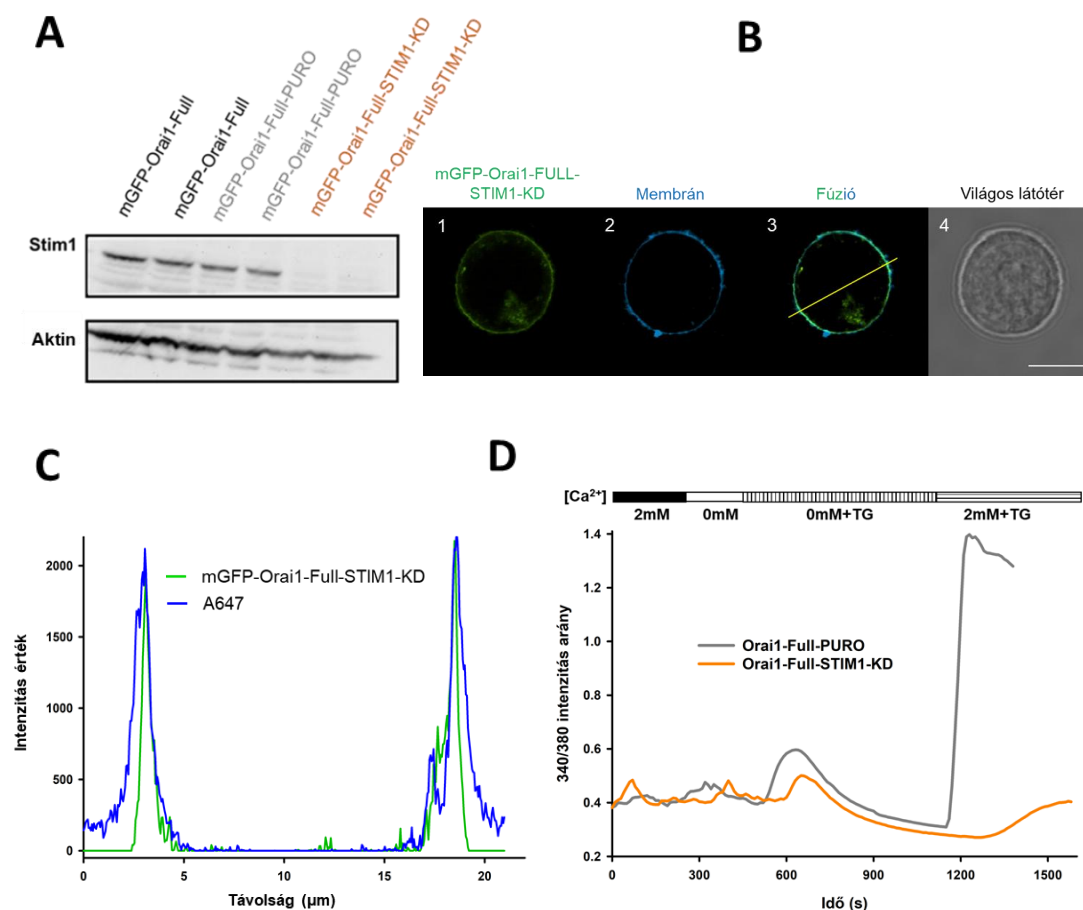
A**B**

50. ábra. Az mGFP-Orai1-Full berendeződése az immunológiai szinapszisba. (A) Reprezentatív konfokális képek az mGFP-Orai1-Full-t kifejező Jurkat sejtek és CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakult immunológiai szinapszistról. **1)** az mGFP-Orai1-Full csatornákat zölddel, **2)** az Alexa546-falloidin jelölést (IS létrejöttének indikátoraként) pirossal ábrázoltuk. **3)** Az mGFP-Orai1-Full (zöld) és Alexa546-falloidin (piros) fluoreszcens csatornák fúziója. **4)** Világos látótér felvétel az mGFP-Orai1-Full csatornát kifejező sejtekről (1-3). A gyöngyöket csillaggal jelöltük. A skála 10 μm -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.

4.2.4.2 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 [29]. 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 sejtvonala). A STIM1 csendesítés hatékonyságának teszteléséhez a STIM1 expressziós szintet western blottal ellenőriztük. A STIM1-specifikus shRNS-sel transzdukált-sejtvonalaik esetében, a STIM1-sáv intenzitása jóval alacsonyabb volt,

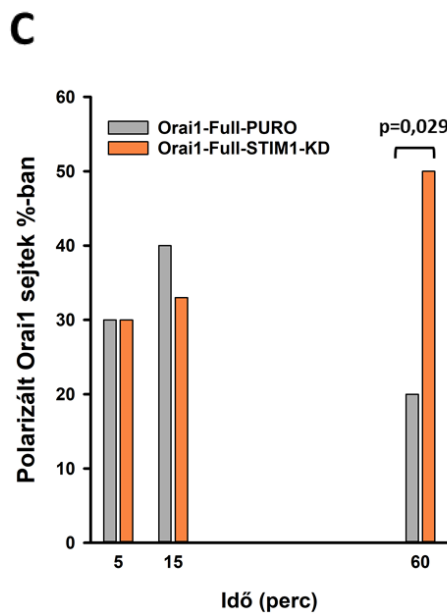
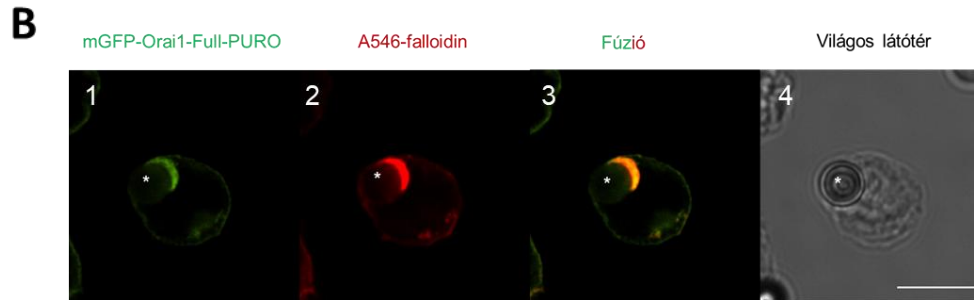
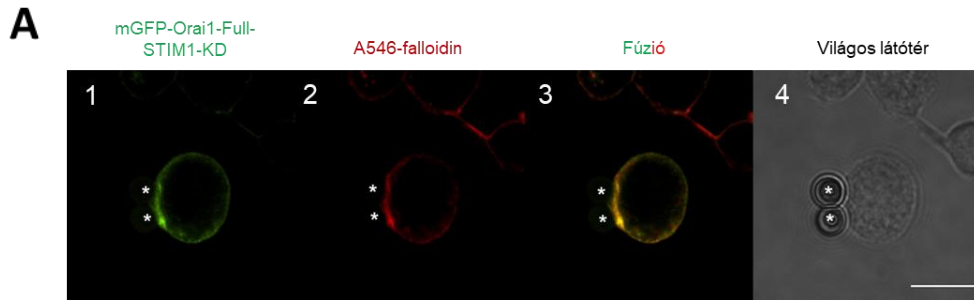


51. ábra. A STIM1 csendesítése gátolja a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} -beáramlást **A)** Western blot kísérletek az mGFP-Orai1-Full csatornát expresszáló Jurkat (fekete), az mGFP-Orai1-PURO (szürke) és az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD (narancssárga) sejtek esetén, melynek során specifikus STIM1 ellenes 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 Fluor™ 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 10 μ m 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 Fluor™ 647 NHS észterrel jelölve). **D)** Citoszólikus Ca^{2+} mérések FURA-2-vel töltött mGFP-Orai1-Full-PURO (szürke) és mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD (narancssárga) sejtekben. A citoszólikus Ca^{2+} 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) kiítlagolt Ca^{2+} -válasza látható.

mint a transzdukciós-kontroll (mGFP-Orai1-Full-PURO) és az mGFP-Orai1-Full sejteké (**51. ábra** A panel). 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 sejtvonalakban. Az Orai1 alegység jól láthatóan a plazmamembránban lokalizálódott, ugyanis a membránfestés és az mGFP-Orai1-Full fehérjék fluoreszcens jele átfedésben van (**51. ábra** B és C panel).

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 ráciometrikus festék alkalmazásával. A Ca^{2+} mérés jellemző időbeli lefutását a **51. ábra** D panele mutatja: először 2mM Ca^{2+} oldatot engedtünk a sejtekre, majd az extracelluláris oldatot abszolút 0 mM Ca^{2+} tartalmú oldatra cseréltük, hogy teszteljük a plazmamembrán integritását és az életképességét. Ezután Ca^{2+} mentes oldatban 1 μ M thapsigargin (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 sejtekkel 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 (**51. ábra** D panel) [128, 262, 263].

Ezt követően meghatároztuk az Orai1 alegységek IS-beli felhalmozódásának időfüggését mGFP-Orai1-Full-PURO és mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtvonalakban. Amint azt korábban részleteztük, IS-t generáltunk e két-sejtvonal és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között, majd három időpontban (5., 15. és 60. percnél) fixáltuk őket, és meghatároztuk az Orai1 IS-redistribúciót (és F-aktin polarizációt) mutató sejtek arányát (**52. ábra** A és B panel). 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 percnél tetőzött (kb. 40%), majd visszaesett kb. 25 százalékra, csakúgy, mint az mGFP-Orai1-Full (vadtípus) esetében a „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 ($p = 0,029$) (**52. ábra** C panel).



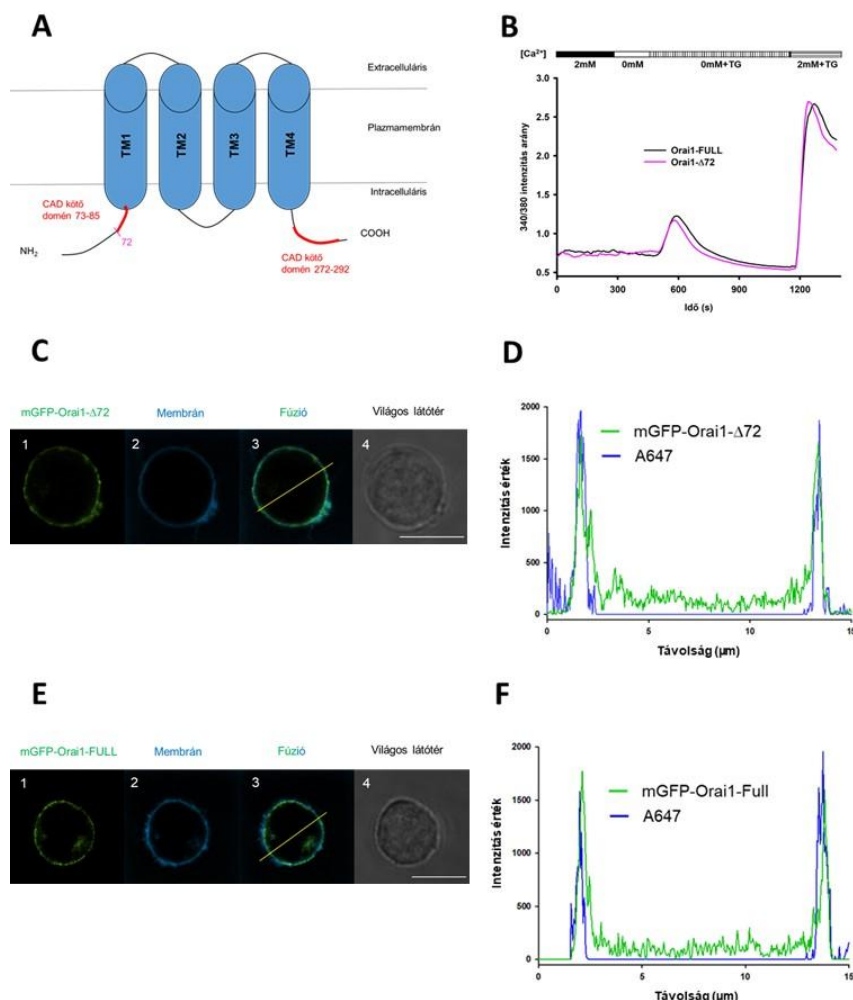
52. ábra. A STIM1 csendesítése az Orai1-Full tartós felhalmozódásához vezet IS-ben. (A) Reprezentatív konfokális képek az mGFP-Orai1-Full csatornát kifejező STIM1-KD és **(B)** PURO Jurkat sejtek és CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között kialakult immunológiai szinapszistról. **A1)** és **B1)** 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.

4.2.4.3 *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 [37, 264-267]. 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. (**53. ábra** A panel)

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 [37, 267]. Az mGFP-Orai1-Full és mGFP-Orai1- Δ 72-öt expresszáló sejtek Ca^{2+} válaszána időbeli lefutását a **53. ábra** B panele 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 **53. ábra** C és D panelén egyértelműen látható az Orai1- Δ 72 csatornakonstruktok plazmamembránbeli lokalizációja: az intenzitás-profil elemzés is azt mutatja, hogy az Alex647 festés (membránjelölés) és az mGFP jel intenzitási csúcsai ugyanúgy átfednek egymással, mint a vad típusú Orai1-nél (**53. ábra** E és F panel). Következésképpen az mGFP-Orai1- Δ 72 csatornák képesek kijutni a sejtmembránba.

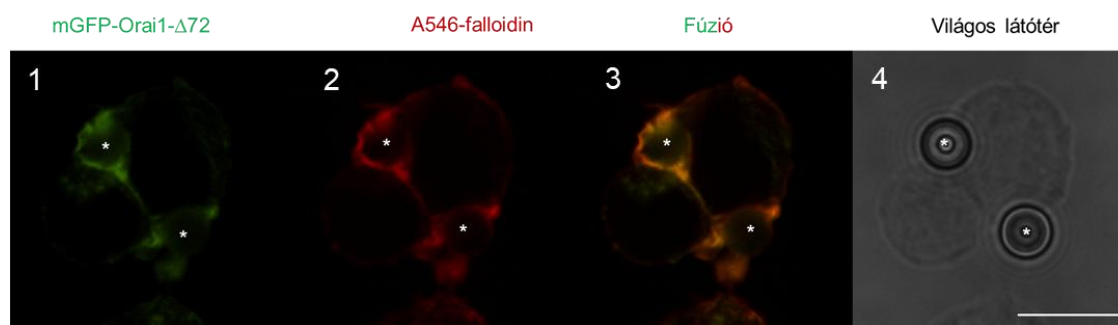


53. ábra. Az Orai1 N-terminálisának eltávolítása (mGFP-Orai1-Δ72) nem befolyásolja a csatorna membránexpresszióját és működését. (A) A vad típusú Orai1 csatorna felépítésének sematikus rajza, mely tartalmazza az intracelluláris C- és N-terminálisokat. A CRAC aktivációs doméneket (CAD) pirossal jelöltük az N-terminálison (73-85aa) és a C-terminálison (272-292aa), valamint a 72. aminosavat, amely a deléziós mutánst reprezentálja és rózsaszínnel emeltük ki. **(B)** Citoszólikus Ca²⁺ mérések FURA-2-vel töltött mGFP-Orai1-Full (fekete) és mGFP-Orai1-Δ72 (rózsaszín) sejtekben. A citoszólikus Ca²⁺ koncentráció meghatározásához a FURA-2 340nm és 380nm-es gerjesztésnél mért intenzitás arányát használtuk. A reprezentatív ábrán legalább 63 sejt kiátlagolt Ca²⁺ válasza látható csatornatípusonként. **(C)** és **(E)** Reprezentatív konfokális képek az mGFP-Orai1-Δ72 és mGFP-Orai1-Full csatornákat stabilan expresszáló sejtekről. **C1)** és **E1)** Az mGFP-Orai1-Δ72 és mGFP-Orai1-Full csatornák mGFP szignálja (zöld). **C2)** és **E2)** Az Alexa Fluor™ 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 csatornákat expresszáló sejtekről. A skála érték mindkét esetben 10-10μm. A „pixel-by-pixel” intenzitás profil analízis eredményeit az **(D)** mGFP-Orai1-Δ72 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 Fluor™ 647 NHS Észterrel jelölve).

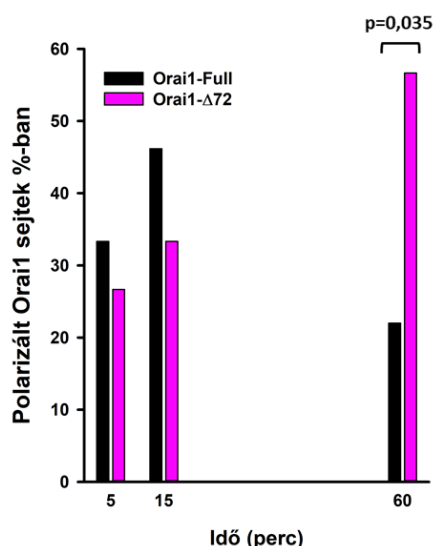
Ezen kívül IS-t hoztunk létre az N-terminálisán trunkált Orai1 csatornákat stabilan expresszáló Jurkat T-sejtek és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök között (5., 15., 60. perc után fixáltuk a sejteket). A reprezentatív konfokális felvételek azt mutatják, hogy az mGFP-Orai1-Δ72 képes az IS-ben feldúsulni **(54. ábra A panel)**, azonban az Orai1 alegység IS-beli

felhalmozódásának kinetikája különbözött a vad-típustól: a trunkált Orai1-expresszázó mGFP-polarizált T-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- $\Delta 72$ összevetve), hasonlóan az mGFP-Orai1-Full-STIM1-KD sejtekhez (54. ábra B panel).

A



B



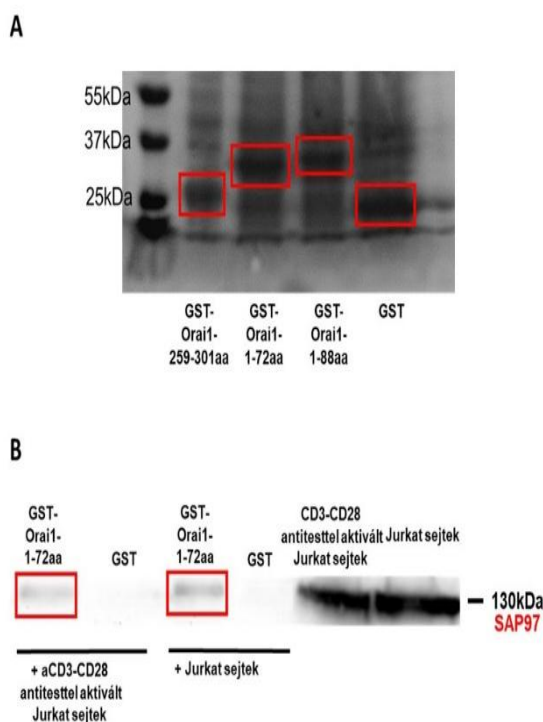
54. ábra. Az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ csatornák a szinapszisban „ragadnak”. Konfokális képek az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ csatornát kifejező Jurkat sejtek és CD3-CD28 gyöngyök között kialakult immunológiai szinapszistról. **A1)** Az mGFP-t tartalmazó Orai1- $\Delta 72$ csatornák (zöld). **A2)** Alexa-546-falloidin (piros) az IS indikátoraként. **A3)** Az Orai1- $\Delta 72$ (zöld) és Alexa-546-falloidin (piros) fluoreszcens szignálok fúziója. **A4)** Világos látótér az mGFP-Orai1- $\Delta 72$ csatornát kifejező sejtekről (A1-A3). A gyöngyöket csillaggal jelöltük. A skála 10 μ m-t jelent. **B)** Az Orai1 polarizációt mutató sejtek százalékos aránya mGFP-Orai1-Full (fekete) és mGFP-Orai1- $\Delta 72$ (rózsaszín) sejtek esetén 5, 15 és 60 perccel az IS létrejötte után. Minden időpillanat esetén legalább 30 sejtet vontuk be a kísérletbe.

4.2.4.4 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- $\Delta 72$ deléción) 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 szinapszis-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”.

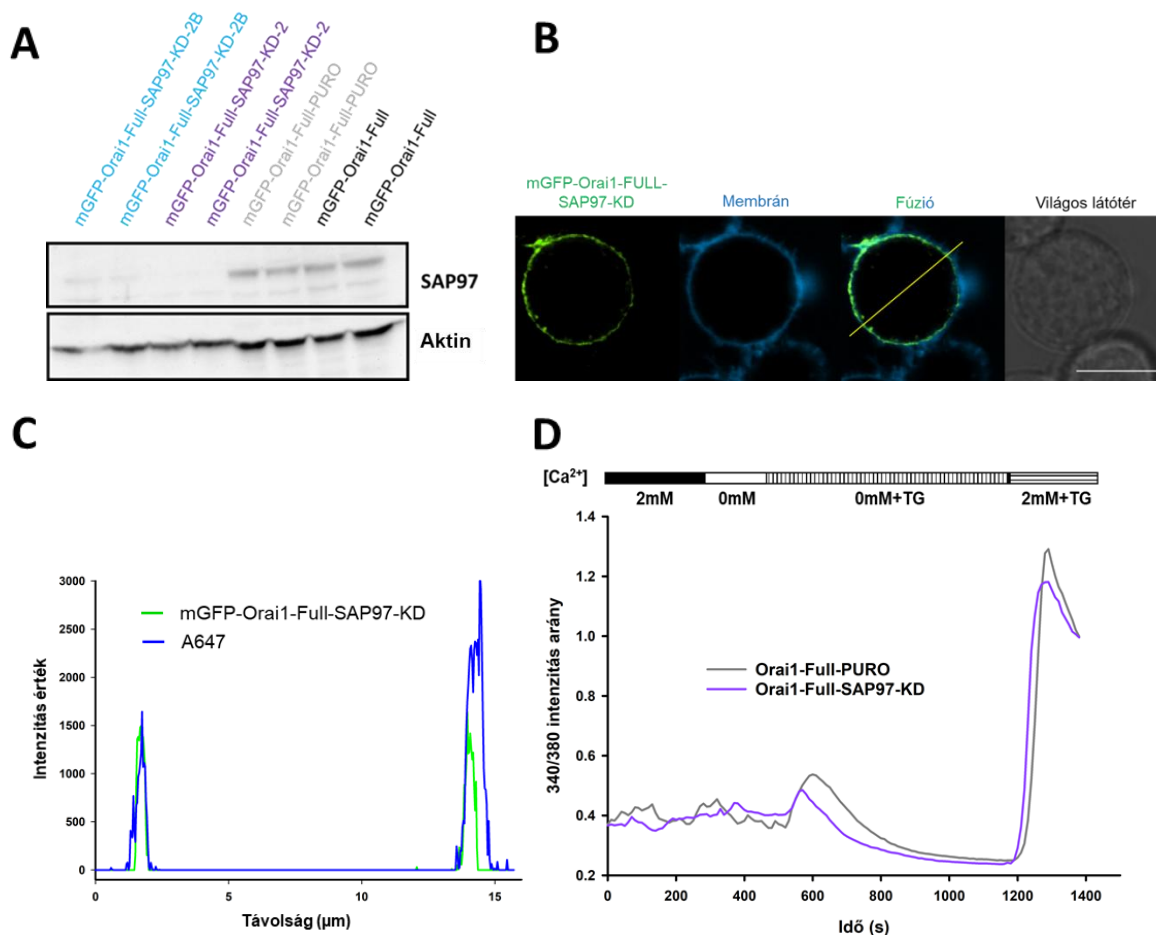
Korábban már leírták, hogy a SAP97 (szinapszis-asszociált fehérje 97) vagy hDlg1 adapter fehérje akkumulálódik az IS-ben és kb. 15 perccel a stimuláció után már nem mutat feldúsulást a T-sejt és a CD3-CD28 antitesttel bevont gyöngyök közötti kontakt zónában [145]. A SAP97, a MAGUK család fehérjéinek (Membrane Associated Guanylate Kinases) tagja, amely szerepet játszik az ioncsatornák és a citoszólikus fehérjék membránba való kijutásában [21, 140, 142, 143]. Mivel a vad-típusú mGFP-Orai1-Full csatornák feldúsulásának maximuma 15 percnél volt az immunszinapszisban (valamint képes fizikai interakció kialakítására az Orai1 N-terminálisával, **55. ábra**), azt feltételeztük, hogy a SAP97 irányíthatja az Orai1 szinaptikus régióból való eltávolítását.

A SAP97 szerepének kiderítésére a SAP97 expressziós szintjét leszábolyoztuk olyan Jurkat sejtekben, amelyek az mGFP-Orai1-Full csatornát stabilan kifejezik (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD). A transzdukción kontrolljaként ismételtén a pLKO.1-puro plazmidot alkalmaztuk, mint azt már korábban is tettük (mGFP-Orai1-Full-PURO sejtvonala). A SAP97 csendesítés hatékonyságát western blottal ellenőriztük. A SAP97 knock-down sejtvonalakban (mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD-2 vagy mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD-2B) a SAP97 sáv intenzitása



55. 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.

jelentősen alacsonyabb volt a transzdukción kontrollhoz (mGFP-Orai1-Full-PURO), vagy az mGFP-Orai1-Full sejtekhez képest. A blot alapján a továbbiakban az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD2 sejtvonalaat használtuk a kísérletekhez (melyet a továbbiakban mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD néven említünk) (**56. ábra** A panel).

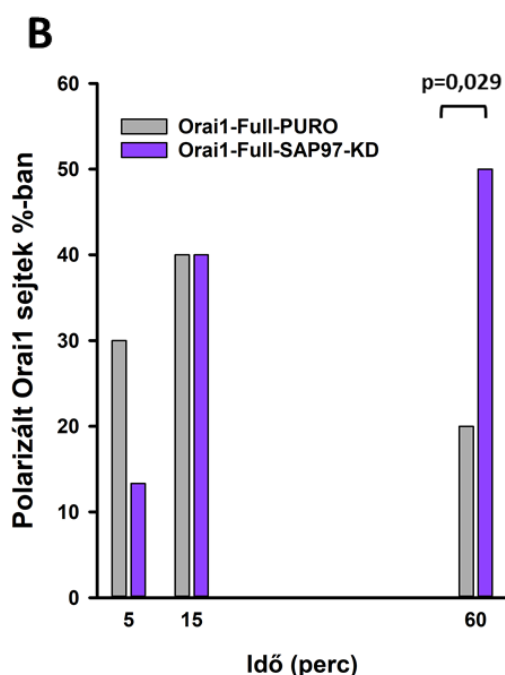
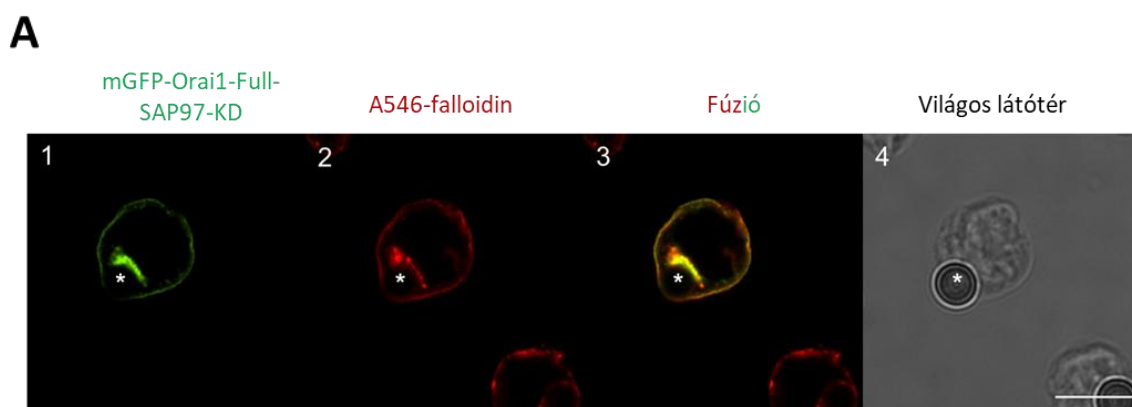


56. ábra. A SAP97 csendesítése Jurkat sejtekben nem befolyásolja a csatorna funkciót és membránexpressziót. (A) Western blot kísérletek az mGFP-Orai1-Full csatornát expresszáló Jurkat (fekete), az mGFP-Orai1-PURO (szürke), az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD2 (lila) (a későbbiek során ezt a sejtvonalat használtuk 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 Fluor™ 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 Fluor™ 647 NHS Észterrel jelölve). **(D)** Citoszólikus Ca²⁺ méréseket végeztünk FURA-2-vel töltött mGFP-Orai1-Full-PURO (szürke) transzdukciós kontroll és az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD (lila) sejtekben. A citoszólikus Ca²⁺ koncentráció meghatározásához a FURA-2 340 nm és 380 nm-es gerjesztésnél mért intenzitás arányát használtuk. A reprezentatív ábrákon 18 mGFP-Orai1-Full-PURO és 21 mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejt kiátlagolt Ca²⁺ válasza látható

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 (56. ábra B és C panel).

Az Orai1 csatornák funkcionalitásának teszteléséhez az mGFP-Orai1-Full-SAP97-KD sejtekben a citoszólikus Ca^{2+} változásokat a ráciometrikus Ca^{2+} indikátor (FURA-2) segítségével határoztuk meg. A 56. ábra D panele alapján kijelenthetjük, hogy az mGFP-Orai1-Full sejtekben a SAP97 shRNS konstrukcióval történő transzdukció nem gyakorolt szignifikáns hatást a Jurkat sejtek CRAC áramára.



57. ábra. Az mGFP-Orai1-Full csatornák tartós szinapszisba rendeződést mutatnak a SAP97 géncsendesített 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.

Ezt követően meghatároztuk az Orai1 IS-akkumulációs kinetikáját olyan Jurkat sejtekben, amelyek expresszálják az mGFP-Orai1-Full csatornákat, de a SAP97 fehérje „hiányzik” belőlük (57. ábra A panel). A SAP97 géncsendesített 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- Δ 72-et expresszáló sejtekhez (**57. ábra** B panel).

4.2.4.5 *Az Orai1 az IS-beli tartózkodása szabályozza a T-sejtek Ca^{2+} -válaszát*

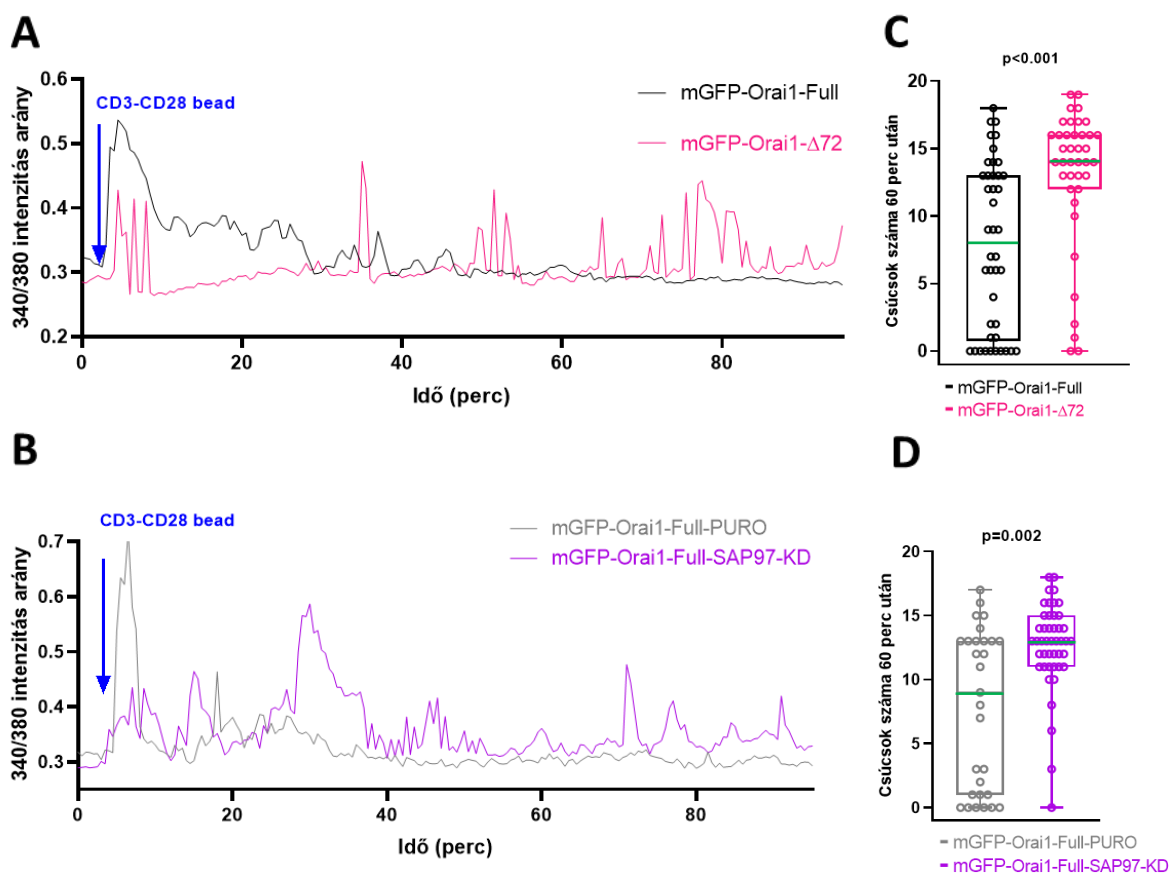
Az Orai1 alegység hosszantartó IS-beli tartózkodásának funkcionális következményei kiderítéséhez meghatároztuk a CD3-CD28 antitesttel bevont gyönggyökkel IS-ben lévő Jurkat sejtek intracelluláris Ca^{2+} -szint változásait. Eredményeink azt mutatták, hogy az mGFP-Orai1- Δ 72 (összehasonlítva a kontroll 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 kalciumtűskék száma a CD3-CD28 gyönggyel történő interakció kialakulását követő 60 perces időtartam alatt (**58. ábra**). 60 perc elteltével az N-terminálisán trunkált Orai1, és az Orai1-Full csatornát expresszáló SAP97 csendesített T-sejtekben a kalcium tűskék továbbra is jelen voltak, ellentétben a kontroll sejtekkel. Analízisünk azt 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 (**58. ábra** C és D panel).

Ezen kívül a Ca^{2+} válaszok időbeli megoszlása is különbözött a kontroll és IS-rezidens Orai1- Δ 72-et expresszáló sejtek esetében: a **58. ábra** A és B panelei 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.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy 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-ban leírja): ekkor a sejtek közti összekapcsolódás időtartama alatt különféle citokinek és egyéb faktorok szekréciója megy

végbe, amelyet szintén a citoszólikus Ca^{2+} koncentráció szabályoz [117]. Az Orai1 IS-ben való benmaradása 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 [268]. Ez a feltételezés összhangban van a Jurkat



58. ábra. Az Orai1 hosszantartó IS-beli tartózkodása Ca^{2+} koncentráció oszcillációt eredményez.

Reprezentatív ábrák Jurkat sejtekben, a FURA-2 segítségével végzett citoszólikus Ca^{2+} mérések eredményeit mutatják, melyek stabilan kifejezik **A)** a vadttípusú Orai1 csatornát (mGFP-Orai1-Full), az Orai1-N-terminálisán trunkált csatornát (mGFP-Orai1- Δ 72) valamint **B)** a vadttípusú 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 sejtípusokban 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- Δ 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.

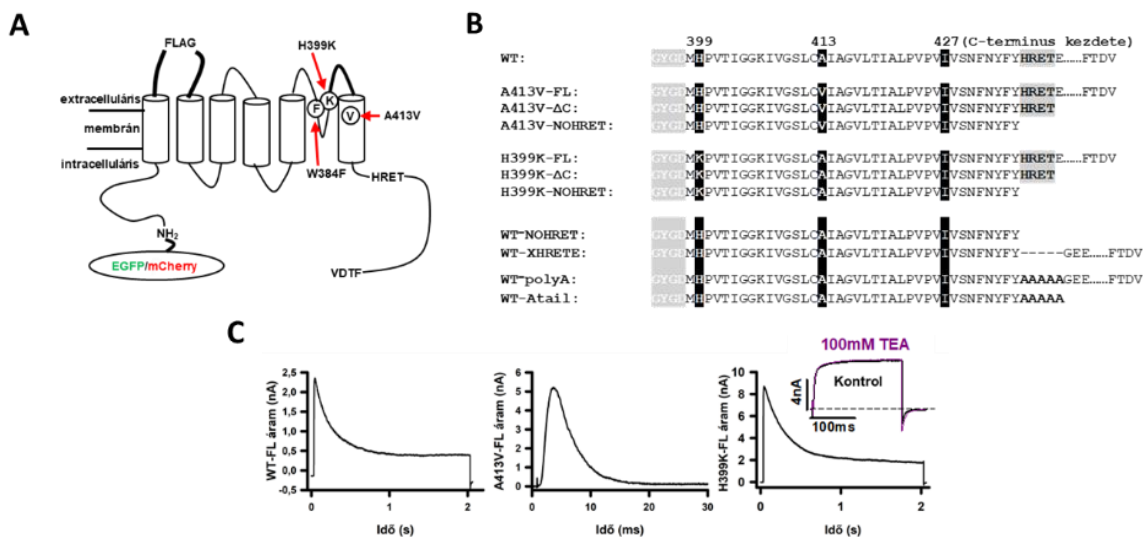
hajdu.peter.4_343_25

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 hozzáadásakor létrejött immunológiai szinapszisban.

4.2.5 A C terminális HRET(E) szekvencia szerepe a Kv1.3 csatorna működésében

4.2.5.1 Stratégiai szempontok a Kv1.3 konstruktok megtervezésekor

Három stratégiát dolgoztunk ki a CHO sejtekbe transzfektált Kv1.3 alegységek egyedi azonosítására. Először az S6-ban, a 413. pozícióban lévő alanint elmutáltuk valinra (A413V),



59. 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-terminálshoz fuzionált 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, AC: 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 tartópotenciálról, 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 nélkül.

amelyről ismert, hogy drámai módon felgyorsítja az A413V homomerek inaktivációs kinetikáját a vad típusú csatornához képest ($\tau_{\text{inakt,A413V}}=4\text{ms}$, $\tau_{\text{inakt,WT}}=200\text{ms}$, **59. ábra**) [269, 270]. Az A413V és a WT alegységekből álló heterotetramerek köztes inaktivációs kinetikát mutatnak a tetramer csatornában lévő mutáns alegységek számától függően [270]. Következésképpen, a heteromer csatornák jelenléte könnyen nyomon követhető a membránban a K⁺ áram inaktivációs kinetikájának illesztésével [269].

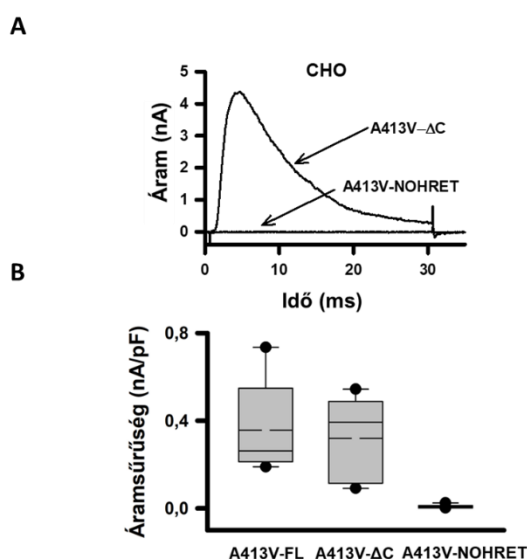
Másodsorban, a 399-es pozícióban a hisztidint (H) helyettesítettük lizinnel (K), amely TEA (tetraetil-ammónium) - rezisztens fenotípust eredményezett (**59. ábra C panel**) [99-101]. A TEA-szenzitív ($K_d = 11.4\text{mM}$) és az inszenzitív ($K_d \approx 2000\text{mM}$) Kv1.3 alegységek

összeszerelődése módosítja a heterotetramerek TEA iránti affinitását, ezért a heteromultimer képződés könnyen azonosítható 100mM TEA alkalmazásával.

Harmadszor, az immuncitokémiai kísérletekhez olyan konstruktokat használtunk, amelyeknél az S1 és S2 szegmens között lévő extracelluláris hurokba a FLAG (KYKDDDDK szekvencia) 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, deléció) kombináltuk. Minden konstrukt esetében a csatornafehérjéket az N-terminálison EGFP-vel fúzionáltuk. A C-terminálison lévő deléciókat egy a „HRET” szekvencia után (ΔC -vel jelölt konstrukt) vagy a „HRET” szekvencia előtt (NOHRET végződéssel jelölt) bevezetett stop kodon segítségével hoztuk létre (59. ábra A és B panel).

4.2.5.2 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 [271]. Ennek tesztelésére Kv1.3 A413V- ΔC és A413V-NOHRET konstruktokat CHO sejtvonalakban expresszáltuk. Munkánk során a ΔC kifejezés olyan konstruktra utal, amelyet közvetlenül a HRET-motívum ($\Delta 439$ -523 aminosav) után trunkáltunk, míg a NOHRET azt jelzi, hogy a konstruktból hiányzik a teljes C-terminális, beleértve a HRET motívumot is ($\Delta 435$ -523).



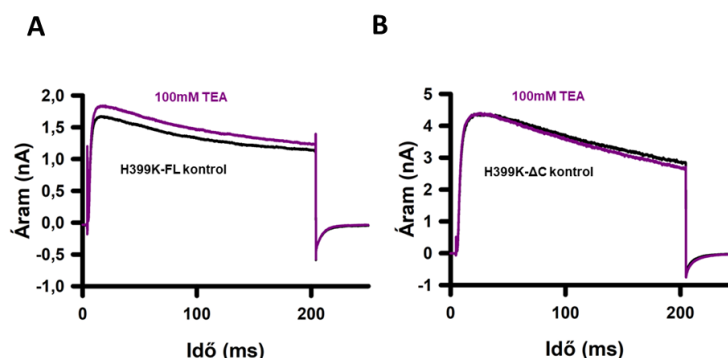
60. ábra Tipikus áramgörbék az A413V mutánsokon CHO sejtekben. **(A)** Reprezentatív áramgörbék az EGFP-vel fúzionált A413V- ΔC és A413V-NOHRET konstruktokkal transzfektált CHO sejtekben, 30 ms hosszú, -120mV holding potenciálról +50mV-ra történő depolarizáció során. **(B)** Boxplot diagram CHO-ban mért áramsűrűségről a teljes hosszúságú (A413V-FL), a C-terminálisán deletált (A413V- ΔC) és az A413V-NOHRET esetében. Az átlagot (szaggatott vonal), mediánt (folytonos vonal), alsó és felső kvartilist, a minimum és maximum értéket tüntettük fel.

Az **60. 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 (**59. ábra** C panel). Az A413V-NOHRET konstrukttal, azonos körülmények között transzfektált CHO sejteken nem detektáltunk feszültség- és időfüggő áramot. Az áramsűrűségeket (CD, csúcsáram +50mV-nál normálva 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) (**60. ábra** B panel).

4.2.5.3 *A farmakológiai bizonyíték: a homomer H399K- Δ C csatornák a membránban*

A K^+ áram expressziójára kifejtett mutáció-specifikus hatások (A413V) kizárására alternatív, farmakológiai megközelítést alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy a C-terminálisán csonkolt csatornák képesek-e kijutni a plazma membránba. A TEA a különböző K^+ csatornák általános inhibitora, gyors, nyitott-csatorna blokkoló, melynek affinitása a pórusrégió extracelluláris szájában lévő aromás aminosav oldallánctól függ [272, 273]. 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-rezisztens” csatornához vezetett [274]. 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) (**61. ábra** A panel). Amikor a CHO sejteket FLAG-H399K- Δ C plazmival transzfektáltuk, a teljes hosszúságú H399K konstrukthoz hasonló áramgörbét rögzítettünk és TEA rezisztens áramot kaptunk ($RF = 0,98 \pm 0,01$, n = 5) (**61. ábra** B panel). A C-terminális HRET-szekvenciát is magába foglaló delécija (FLAG-H399K-NOHRET) olyan fenotípust eredményezett, amely nem expresszál

kifelé irányuló K^+ áramot, ahogyan azt az A413V mutáns esetében már korábban leírtuk (itt nem került bemutatásra).



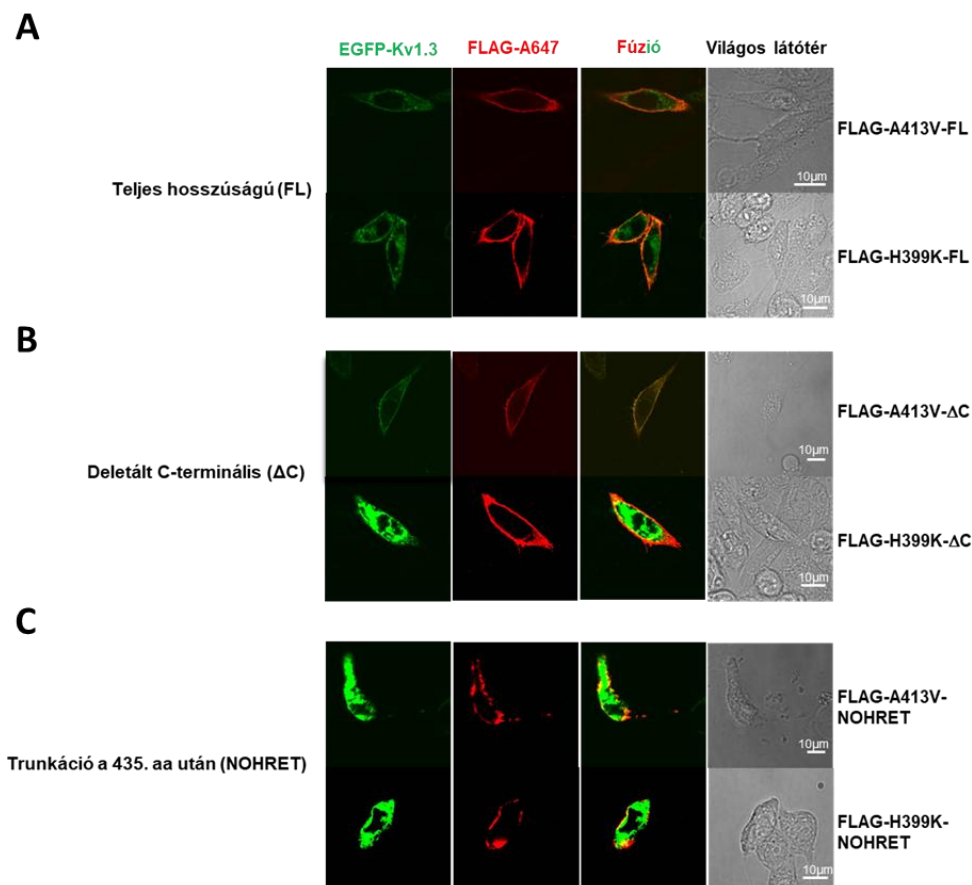
61. ábra A H399K-ΔC áram TEA inszenzitív. (A) H399K-FL (EGFP-vel és FLAG-el jelölt) csatornák teljes-sejt áramgörbéi CHO sejtekben: 0 mV-os (nem +50mV, hogy csökkentsük a teljes-sejt áramot), 200ms hosszú impulzusokkal depolarizáltuk a sejteket, a tartópotenciál -120 mV volt. Kontrol extracelluláris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

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy mind a kinetikailag (A413V) mind a farmakológiailag (H399K) jelölt, C-terminális deletált Kv1.3 csatorna alegységek (A413V-ΔC és H399K-ΔC) 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.

4.2.5.4 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-ΔC, FLAG-H399K-NOHRET és FLAG-A413V-FL, FLAG-A413V-ΔC, 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

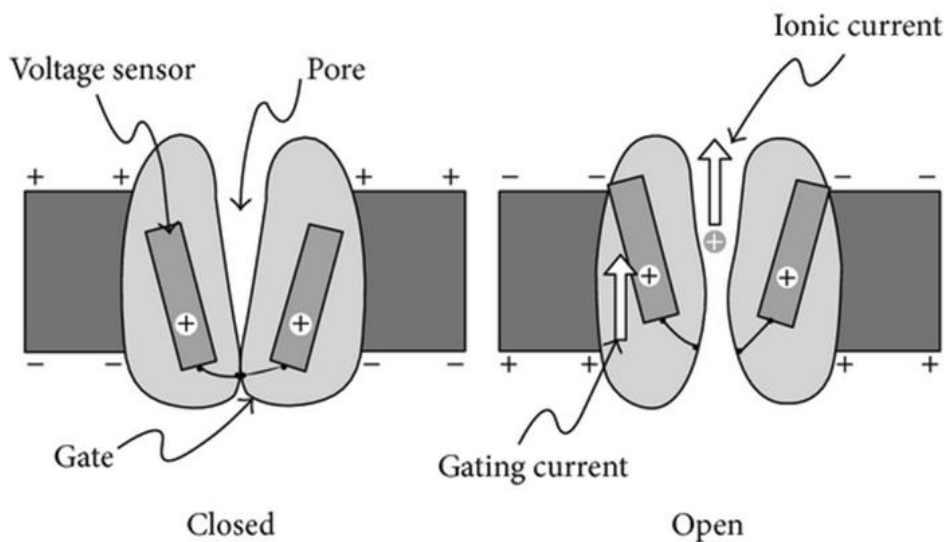
(62. ábra A panel). Ugyanezt figyelhattuk meg mindkét Kv1.3 pont mutánsnál (A413V, H399K), a ΔC illetve a NOHRET deléciós mutáns esetében is (62. ábra B és C panel). Habár a C-terminális deletált csatornák intracelluláris retenciója megnövekedett a teljes hosszúságú csatornákhöz képest, a ΔC és NOHRET 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.



62. ábra. Reprezentatív mikroszkópos képek az EGFP- és FLAG-get tartalmazó jelölt 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 (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.

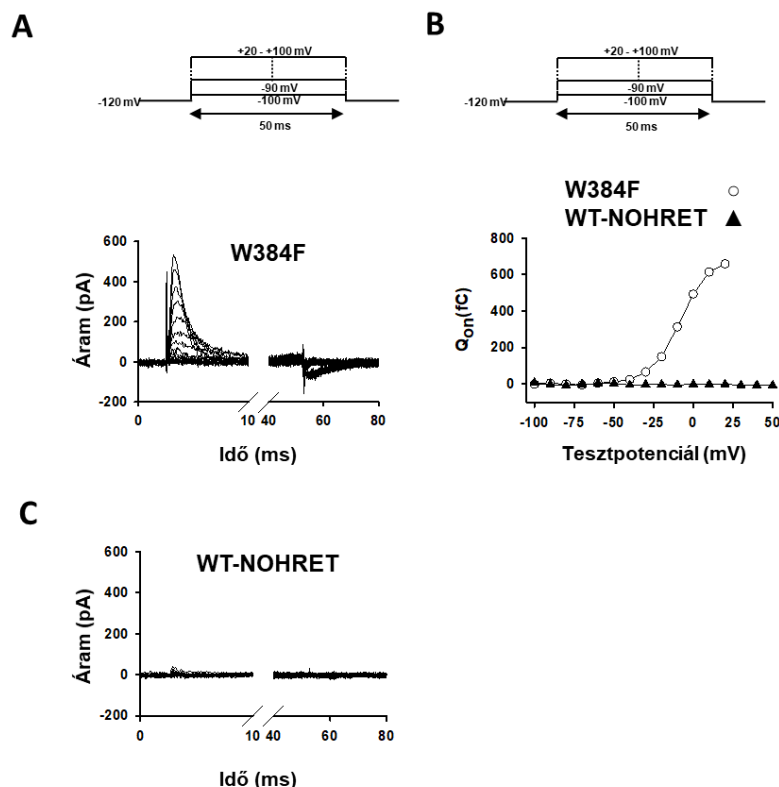
4.2.5.5 A NOHRET csatorna: kapuzási áram vagy „gating-current” nem mutatható ki

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 (**63. ábra**) [275].



63. ábra. A kapuzási áram szemléltetése/magyarázata. 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) [276-281]. A kísérletek során a Kv1.3-W384F-et stabilan expresszáló CHO-sejteket használtuk, amelyeknél rögzítettük a kapuzási áramokat (**64. ábra** A panel). A reprezentatív Q_{on} -V görbe a **64. ábra** B panele 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 csatornákat expresszáló CHO sejtekben nem tudtunk kapuzási áramot ($n = 9$) mérni, vagy csak minimális kapuzási áramot tudtunk detektálni egy magasabb feszültségre depolarizálva (+50 mV vagy magasabb tesztpotenciálon) (**64. ábra** B panel). 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.



64. 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) paneleken 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.

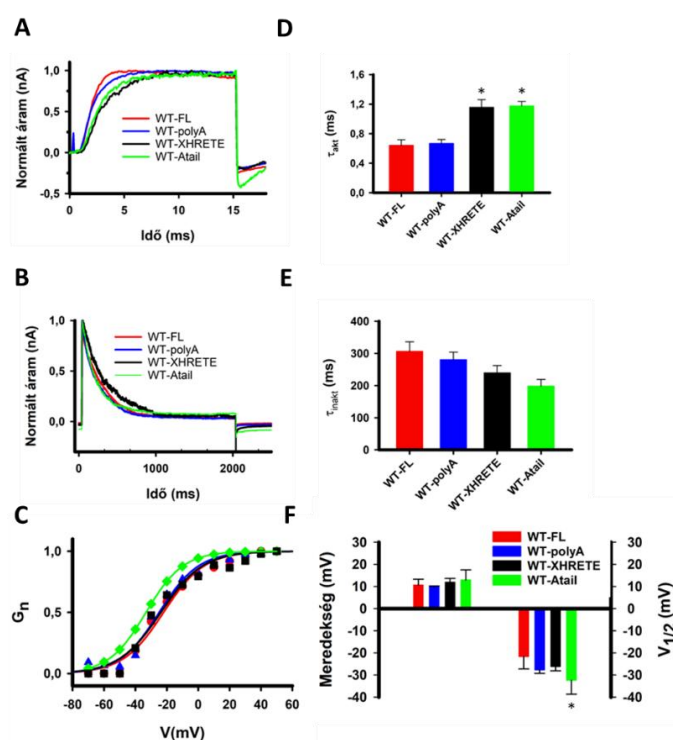
4.2.5.6 A HRET(E) szekvencia eltávolítása vagy alanin-mutációja nem befolyásolja a Kv1.3 működését

Ezen eredményektől inspirálva - elsősorban a NOHRET konstrukt kapuzási tulajdonságai miatt - a következő mutációkat hajtottuk végre az EGFP-vel jelölt vad típusú Kv1.3-ban (59. 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.

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 konstrukcióknál, összehasonlítva a WT-FL-el ($p < 0,001$ mindkettőnél) (65. ábra A és D panel), de az inaktivációs kinetika nem változott ($p = 0,13$) (65. ábra B és E panel). Az egyensúlyi aktiváció félaptesítés feszültsége ($V_{1/2}$) csak a WT-Atail csatornáknál volt különböző ($p = 0,005$, balra tolódott) (65. ábra C és F panel), de a meredekségi tényező(k) minden HRETE-mutánsnál azonosak voltak (WT-polyA, WT, WT-XHRETE, $p = 0,284$) (65. ábra F panel).



65. ábra. ábra A HRETE motívum hiánya vagy módosítása nem befolyásolja a Kv1.3 működését. (A) Az áramgörbék 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, outside-out konfigurációban. Az áramgörbék csúcértékére normáltuk. (B) A WT-FL, WT-polyA, WT-XHRETE és WT-Atailcsatornák inaktivációs kinetikája: a sejteket 2 mp-ig +40mV-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 WT-FL (piros kör, 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, $n \geq 6$). (F) Az egyensúlyi aktiváció paraméterei (meredekség (k), bal és félaptesítés feszültség ($V_{1/2}$), jobb) a négy konstrukciónál (átlag \pm SEM, $n \geq 6$). *: $p < 0,05$.

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

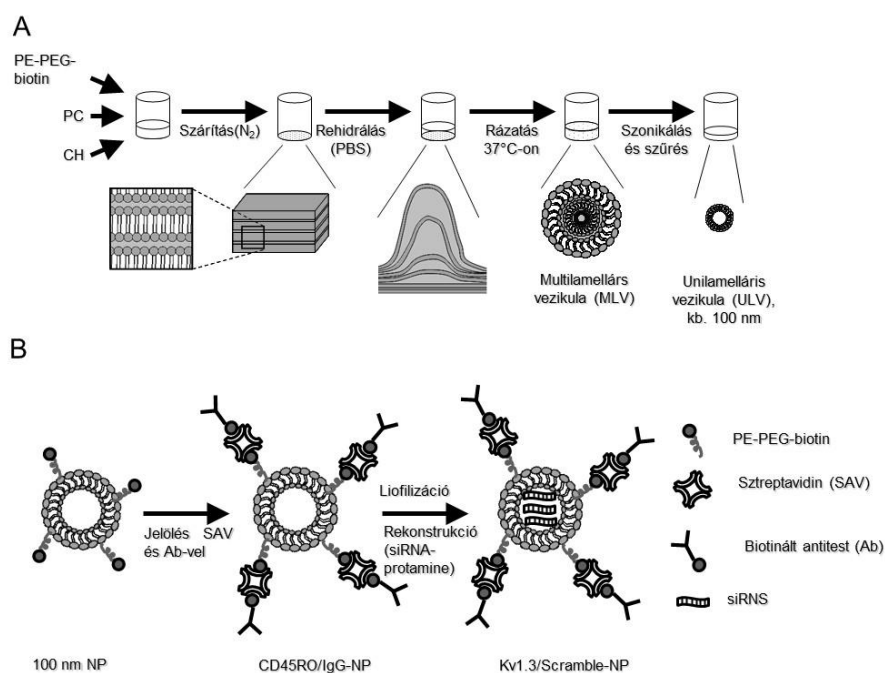
mozgásának csatolását az aktivációs kapuhoz, vagy akár mindkettőt is, miközben a feszültség-szenzor mozgása nem módosul. Ennek a feltételezésnek a teszteléséhez meghatároztuk a WT-NOHRET csatorna kapuzási áramát. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy ezen csatornát expresszázó sejtek többsége nem mutatott olyan kapuzási áramokat, amelyek hasonlítanának 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 karboxilvég többi részét épen hagytuk, vagy a HRETE-t öt alaninra cseréltük a WT-Atail konstruktban (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 helyettesítheti a HRETE szekvenciát, legalábbis a Kv1.3-ban.

4.3 Kv1.3 csatorna, mint terápiás célpont: egy autoimmun betegség (SLE) sejt szintű lehetséges gyógy módja

4.3.1 Kv1.3 siRNS-sel töltött funkcionális liposzómák: T_M specifikus Kv1.3 expresszió leszabályozás

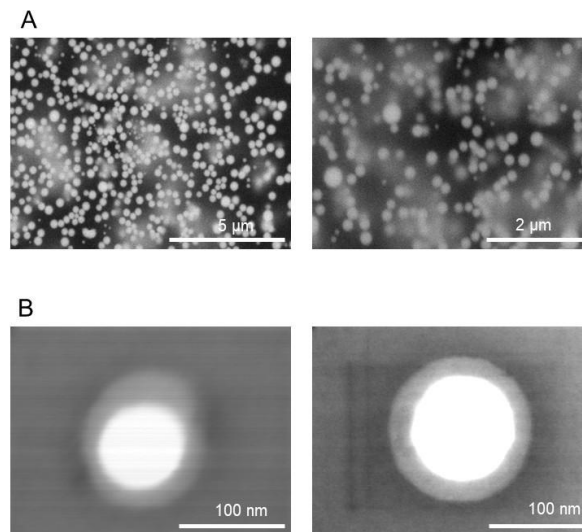
4.3.1.1 100 nm méretű lipid nanorészecskék szintézise, funkcionálálása és siRNS-sel töltése

Az unilamelláris lipid NP-k előállításához először PC, PE-PEG-biotin és CH keverékét ráztattuk PBS-ben, hogy MLV-ket képezzünk (lásd 3.6.1). Ezután szonikálással a nagyméretű vezikulákat kisebb méretű vezikulákra bontottuk. Végül extrudálást alkalmaztunk a kívánt 100 nm átmérőjű liposzómák eléréséhez (**66. ábra** A panel). Mivel az NP-k felületén a PE-PEG-hez kötött biotin található, a sztreptavidin és a biotin közötti legerősebb nem kovalens kölcsönhatást használtuk ki az antitestek NP-khez való rögzítéséhez (**66. ábra** B panel) [282]. Az **66. ábra** B panelje szemlélteti, hogy a fluorofórral (Alexa647 vagy Alexa488) konjugált



66. ábra Unilamelláris lipidrészecskék szintézise és antitest-jelölése. (A) Az ULV-szintézis sematikus folyamata. A lipideket egy kerek aljú üvegedényben vegyítettük, és N₂-vel megszárítottuk, hogy lipidfilmet képezzenek. A lipidek PBS-ben (pH 7,4) történő rehidratálását kétórás ráztatás követt 37 °C-on, majd szonikálással és extrudálással (100 nm-es szűrőkorongok) 100 nm-es ULV-ket (unilamelláris vezikulát) nyertünk. **(B)** Az ULV-k funkcionálálása az ULV-k felületéhez PE-PEG-en keresztül kötött biotinnal történt. A liofilizált, antitesttel bevont NP-ket ezután siRNS-oldatban rekonstruáltuk siRNS-sel töltés céljából.

sztreptavidinnel (SAV) jelölt ULV-k bioaktív felszín biztosítanak, amely alkalmas bármilyen biotinnal jelölt antitest megkötésére, valamint az ULV-k vizualizációjára. Mivel a T_{EM} és T_{CM} sejtek is expresszálják a CD45RO-t, szemben a naiv T-sejtekkel, a sztreptavidin-NP-ket biotinilált egér anti-humán CD45RO antitesttel (CD45RO-NP-k) vagy IgG-vel, mint izotípus-kontrollal (IgG-NP-k) jelöltük (**66. ábra**). Az NP-k megfelelő méretének ellenőrzésére SEM és



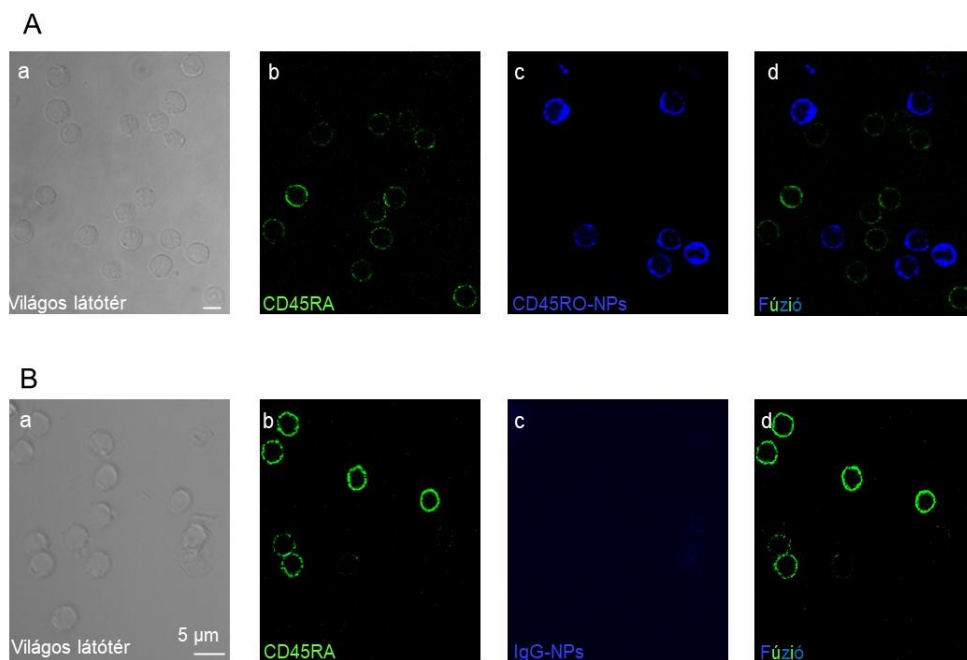
67. ábra. Lipidrészecskék elektronmikroszkópos képei. (A) WETSEM-felvételek 500 nm-es és 200 nm-es lipidrészecskék keverékéről. A lipidrészecskéket 15 μl ionmentes vízben vizualizáltuk, vákuumtartó QX-kapszulában mértük. (B) A leírt szintetizálási folyamat eredményeként elkészült ULV-ék TEM-felvétele 100 nm-es méretet mutattak.

TEM felvételeket készítettünk (**67. ábra**). (Az NP-k méretét rutinszerűen dinamikus fényszórás módszerrel határoztuk meg.) Amint a **67. ábra** B panelén látható, a 100 nm-es ULV-k gömb alakúak és nincs bennük pórus, valamint sima felületi tulajdonságot és réteges szerkezetet mutattak. Az siRNS-ek funkcionizált liposzómákba történő beépítéséhez a CD45RO-NP-ket liofilizáltuk, majd RNázmentes, protamin-komplexált siRNS-eket tartalmazó vízben rekonstruáltuk őket (**66. ábra**).

4.3.1.2 A CD45RO-NP-k specifikusan kötődnek a T_M -sejtekhez és internalizálódnak

A sejt szintű terápiában kritikus fontosságú olyan NP-ket tervezni, amelyek a „rakományukkal” együtt csak a kiválasztott sejtekhez/szövetekhez tudnak kapcsolódni. Ezért először azt vizsgáltuk, hogy a CD45RO-NP-k képesek-e szelektíven kötődni a T_M sejtekhez. Primer humán T-sejteket inkubáltunk fluoreszcens, liofilizált, majd rekonstruált CD45RO-NP-kkel vagy IgG-NP-kkel. A sejteket 24 órás inkubáció után (37 °C-on, 10% humán szérum jelenlétében) fixáltuk, és a naiv T-sejteket Alexa488 konjugált CD45RA antitesttel jelöltük (**68. ábra**). A **68.**

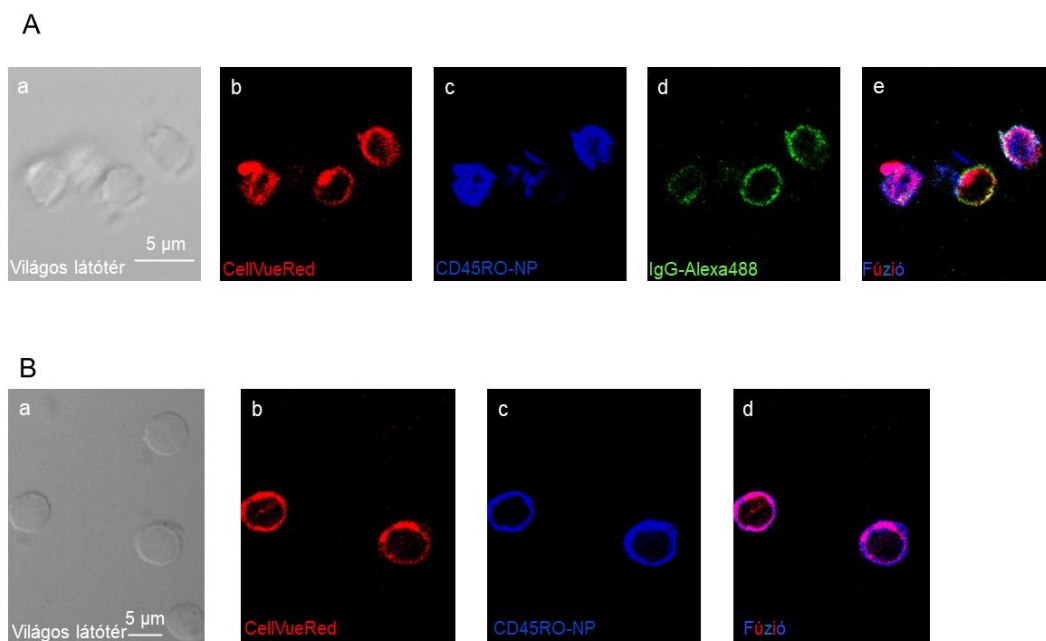
ábra A sorában a konfokális mikroszkópos felvételeken látható, hogy a CD45RO-NP-k csak a T_M -hez kötődtek, a naiv T-sejtekhez nem. A **68. ábra** A sorában a fúziós kép (d panel) egyértelműen mutatja, hogy a CD45RO-NP-kkel „díszített” sejtek nem expresszálják a CD45RA-t. A CD45RO-NP-k specifikus kötődésének kimutatására T-sejteket IgG-NP-kkel inkubáltunk. A **68. ábra** B sorában (c és d panel) a felvételek azt mutatják, hogy az IgG-NP-k nem kötődnek a T-sejtek membránjához.



68. ábra A CD45RO-NP-k specifikusan kötődnek a CD45RO⁺ T_M sejtekhez. A liofilizált CD45RO-NP-kkel (A) vagy IgG-NP-kkel (B) inkubált (kék), majd CD45RA-Alexa488 antitesttel (zöld) jelölt CD3⁺ T-sejtekről 1 μm vastagságú konfokális felvételeket készítettünk. A panelek a következőket mutatják: a: világos látóterű (brightfield) képe, b: CD45RA⁺, naiv T-sejtek (zöld), c: T_M sejtek CD45RO-NP-kkel (kék), d: a kék és zöld csatornák fúziója. Megjegyzendő, hogy a kék és a zöld csatorna nem mutat „kolokalizációt”.

További kísérletek azt igazolták, hogy a sejtekhez kötődött CD45RO-NP-eket a T_M sejtek internalizálják (**69. ábra**). CellVueRed lipidfestéssel (piros, **69. ábra** A sora, b panel) és SAV-Alexa647 (**69. ábra**, A sora, kék, c panel) festéssel jelölt CD45RO-NP-eket használtunk: miután a T-sejteket 24 órán át inkubáltuk ezekkel az NP-kkel, a sejtekhez már kötődött NP-ken lévő CD45RO antitesteket Alexa488 másodlagos antitesttel jelöltük (**69. ábra**, A sora, zöld, IgG-Alexa488, d panel). Mivel ez utóbbi lépés nem permeabilizált sejteken történt, ez a módszer lehetővé teszi a sejtmembránhoz kötött CD45RO-NP-k kizárólagos jelölését. Ezért a fúziós képen (**69. ábra**, A sora, e panel) látható az NP-k internalizációja (lila fluoreszcencia), valamint a plazmamembránhoz való fúziójuk (fehér és sárga fluoreszcencia). Hasonló eloszlást

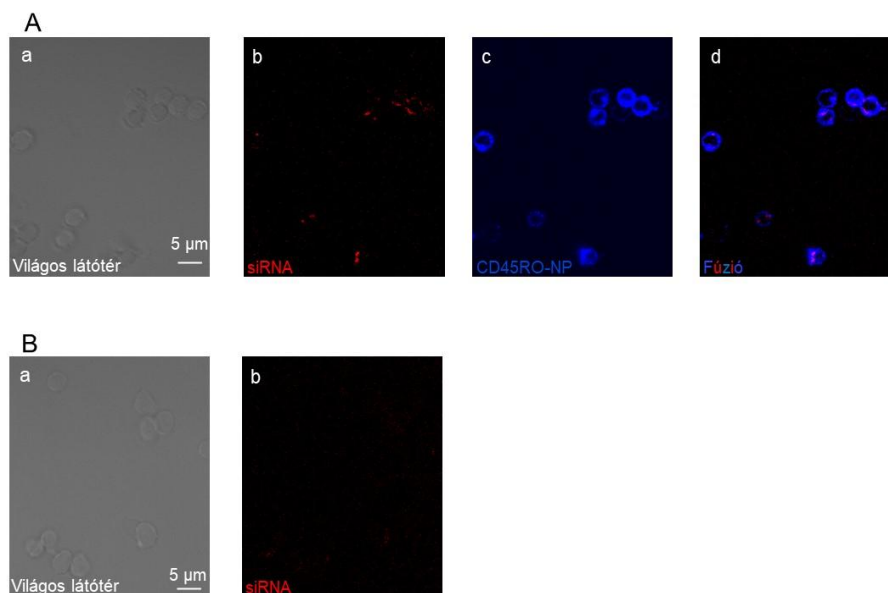
figyeltünk meg a liofilizáláson átesett CD45RO-NP-k esetében is, ami azt jelzi, hogy ez az eljárás nem vezetett az antitestek leválásához, azaz az antitestek az NP-k felszínéhez kötődve maradtak (**69. ábra**, B sor). Ahogyan az előzőekben látható volt, a SAV-Alexa647 (**69. ábra**, B sor, kék, c panel) és a CellVueRed (**69. ábra**, B sor, piros, b panel) NP-k (ugyanazok az NP-k, mint amelyeket a **69. ábra** látható kísérlethez használtunk) fluoreszcencia jelei csak a T_M-sejtek egy részhalmazához kötődött. Összességében, ezek a kísérleti eredmények megerősítik, hogy a liofilizált CD45RO-NP-k képesek szelektíven kötődni a T_M-sejtekhez és bejutni/felhalmozódni azokban. Ezért a CD45RO-NP-k megfelelő hordozóként szolgálhatnak siRNS bejuttatására és géncsendesítésre a T_M-sejtekben.



69. ábra. A T_M sejtek a CD45RO-NP-eket endocitálják. (A) CellVueRed-tartalmazó CD45RO-NP-kkel inkubált T-sejtek konfokális képei, az NP-ken lévő CD45RO antitestet Alexa488 szekunder egér antitesttel jelöltük (Alexa488-IgG, zöld). Mikroszkópos felvételek rendre *a*: *a* sejtek világos látótérű képe, *b*: az NP-k CellVueRed jele; *c*: SAV Alexa647 fluoreszcens jel (a T_M sejtekhez kapcsolódó ULV-k), *d*: a másodlagos antitest (Alexa-488) fluoreszcencia jel, *e*: a vörös, kék és zöld csatornák egyesítése. **(B)** A konfokális képeken liofilizált (24 órás inkubálás), CellVueRed-jelölt CD45RO-NP-kkel kezelt T-sejtek láthatóak. *a*: világos látótér, *b*: az ULV-k CellVueRed jele (piros); *c*: a T_M-sejteken/ben lévő ULV-k Alexa-647 fluoreszcenciája (kék), *d*: a piros és kék csatornák fúziója.

4.3.1.3 Kv1.3 NP-be zárt siRNS bejut T_M sejtekbe

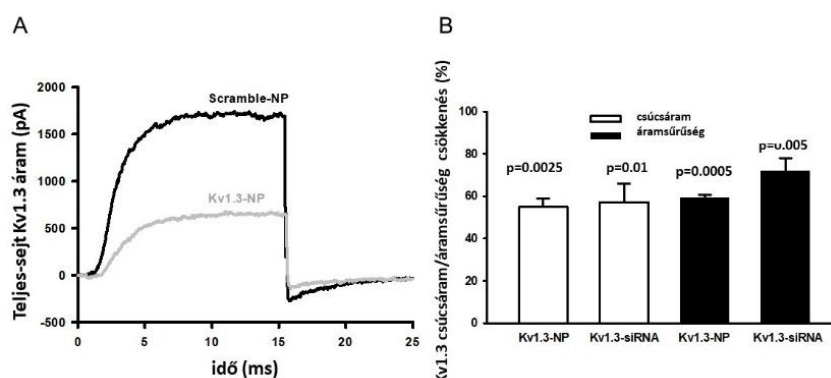
Annak ellenére, hogy a CD45RO-NP-k felismerik a T_M sejteket, kötődnek hozzájuk és bejutnak azokba nem jelenti automatikusan, hogy a vezikulákba bezárt molekulák a citoszólba kerülnek. Következésképpen a következő lépésben Cy3-jelölt scramble/kontroll siRNS-szel töltött CD45RO-NP-eket használtunk annak vizsgálatára, hogy ezek az NP-k képesek-e siRNS-t juttatni a T_M -sejtekbe. A fentiekben részletezett és az **66. ábra** látható módon a fagyasztva szárított CD45RO-NP-eket protamin-komplexált kontroll Cy3-siRNS-t tartalmazó vízben rehidratáltuk, és 24 órán keresztül primer T-sejtekkel együtt inkubáltuk. A **70. ábra** A sorának ábrái alapján elmondható, hogy a Cy3-siRNS-sel (piros, b panel) töltött CD45RO-NP-k (SAV-Alexa647, kék, c panel) képesek voltak szelektíven a T_M -sejtekhez kötődni, valamint az siRNS-ek intracellulárisan detektálhatók a CD45RO-NP-eket felvett CD45RO⁺ sejtekben (egyesített kép, d panel). A specifikus NP-alapú siRNS-célbajuttatás további megerősítését szolgálják a 24 órán keresztül Cy3-siRNS/protamin oldattal kezelt T-sejtekről készült konfokális felvételek (**70. ábra** B sor): a Cy3-siRNS intracelluláris vörös fluoreszcenciája nem volt kimutatható. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CD45RO-NP-k képesek az siRNS-et bejuttatni a T_M -ekbe.



70. ábra A T_M sejtek felveszik Cy3-siRNS-t. Reprezentatív, konfokális képek Cy3-siRNS-t tartalmazó CD45RO-NP-kkel kezelt T-sejtekről (**A**). Képek balról jobbra, *a*: *a* sejtek világos látóterű képe, *b*: Cy3-siRNS jel, *c*: Alexa-647 (CD45RO-NP-k), *d*: kék (Alexa-647, CD45RO-NP-pozitív sejtek) és piros (sejtek Cy3-siRNS-szel a citoszolban) csatornák fúziója. (**B**) Protamin-komplexált Cy3-siRNS-ekkel kezelt sejtek képei.

4.3.1.4 A Kv1.3-NP-k csökkentik a Kv1.3 csatornák expresszióját

A Kv1.3 csatornák Kv1.3-NP-k általi leszabályozás hatékonyságának mérésére a patch-clamp technikát alkalmaztuk, és összehasonlítottuk a Kv1.3 csatornák teljes-sejt áramát Kv1.3-NP-kkel (Kv1.3 siRNS-sel töltött CD45RO-NP-k) és a Scramble-NP-kkel (kontroll siRNS-t tartalmazó CD45RO-NP-k) kezelt sejtekben. Kísérleteinkben az NP-k funkcionálisához Alexa488 fluorofórral konjugált SAV-ot használtunk, hogy a mikroszkóppal az NP-kezt megkött/endocitált sejtek azonosítsuk. Csak a zöld fluoreszcenciát mutató sejteket választottuk ki az elektrofiziológiai mérésekhez. A Kv1.3-NP-k „knock-down” hatékonyságát összehasonlítottuk a T-sejtebbe transzfektált Kv1.3 siRNS-ek hatékonyságával [283]. Az aktivált T-sejteket Kv1.3 vagy scramble siRNS-ekkel és GFP-t kódoló plazmiddal együtt transzfektáltuk (az siRNS moláris koncentrációja sokkal magasabb volt, mint a pMaxGFP plazmidé). A GFP-t expresszáló sejteket választottuk ki a patch-clamp mérésekre, mivel ezek nagy valószínűséggel siRNS-t is felvették [284]. A Scramble-NP-kkel és Kv1.3-NP-kkel kezelt T-



71. ábra Kv1.3-NP-k leszabályozzák a Kv1.3 expresszióját a T_M sejtekben. (A) A Kv1.3 csatornák teljes-sejt áramgörbéi olyan aktivált T-sejteket lettek rögzítve, amelyet scramble-NP-kkel vagy Kv1.3-NP-kkel kezeltük. A sejteket -120 mV-on tartottuk, majd 15 ms-ig +50 mV-ra depolarizáltuk; P/5 online leak-korrektiót alkalmaztunk. **(B)** A Kv1.3 expresszió százalékos csökkenése látható a Kv1.3-NP-kkel kezelt T-sejteket, kontroll: scramble-NP-kkel inkubált sejtek (3 donor, n=18). A csökkenést minden egyes donor esetében meghatároztuk, és a három donorra vonatkozó átlagos százalékos csökkenést tüntettük fel (átlag ± SEM). A Kv1.3 áram százalékos csökkenése is látható, amikor a T-sejteket specifikus Kv1.3 (Kv1.3-siRNA oszlopok) és kontroll siRNS-ekkel transzfektáltuk (3 donor, n=15).

sejtek teljes-sejt Kv1.3 áramgörbéit a **71. ábra** szemlélteti: a Kv1.3-NP-kkel kezelt sejtekben a Kv1.3 áram szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Scramble-NP-kkel kezelt sejtekben. Továbbá a Kv1.3 csúcsáram és áramsűrűség csökkenésének mértéke kb. 60 % volt (3 donor minden kísérletben, n ≥ 15 sejt) a Kv1.3-NP-vel kezelt sejtekben és a Kv1.3-siRNS transzfektált

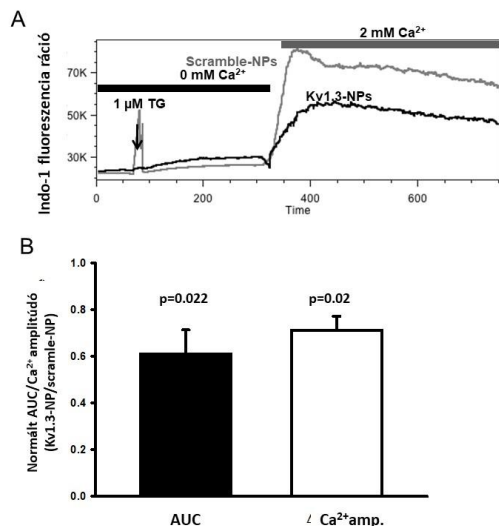
sejtekben. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a CD45RO-NP-k által bejuttatott Kv1.3 siRNS-ek hatékonyan képesek a Kv1.3 csatornák expresszióját leszáboályozni a T_M sejtekben.

4.3.1.5 *A memória T-sejtek Ca²⁺-válasza csökken a Kv1.3-NP kezelés hatására*

A Kv1.3 csatornák fontos szerepet játszanak a Ca²⁺-függő jelátvitel szabályozásában a T_M sejtekben, és e csatornák gátlása csökkenti a Ca²⁺ beáramlását a CRAC csatornákon keresztül. Ezért megvizsgáltuk az siRNS-sel töltött CD45RO-NP-kkel kezelt T-sejtek Ca²⁺-válaszát. Ebben a kísérletsorozatban nem aktivált T-sejteket inkubáltunk Kv1.3-NP-kkel vagy Scramble-NP-kkel. Az üres CD45RO-NP-kkel inkubált vagy nem kezelt sejtek további kontrollként szolgáltak (**72. ábra**, **73. ábra**). Huszonnégy órával a kezelés után Ca²⁺ méréseket végeztünk. Ezeket áramlási citometriával végeztük, amely lehetővé teszi, hogy a T_M-sejtekre kapuzzunk. A Ca²⁺-kísérletek tipikus időbeli lefutását a **72. ábra** A panele mutatja. Az Indo1-gyel töltött T-sejteket Ca²⁺-mentes extracelluláris oldatban tartottuk, majd thapsigargin hozzáadása (TG, 1 μM) a [Ca²⁺]_i kis mértékű növekedését idézte elő (az Indo-1 fluoreszcenciaarányának növekedése jelzi), ami megfelel az intracelluláris Ca²⁺ raktár (ER, endoplazmatikus retikulum) kiürülésének. Ez a CRAC-csatornák mesterséges megnyitására szolgál, mivel aktiválja az ER-ben lévő Ca²⁺-szenzort, amely a közelébe mozog, és megnyitja a CRAC-csatorna pórusképző alegységét a plazmamembránban [285]. Mégsem figyelhető meg további [Ca²⁺]_i növekedés, mivel az extracelluláris oldat nem tartalmaz Ca²⁺-t. Ekkor a külső oldatot 2 mM Ca²⁺-tartalmúra változtattuk. Az extracelluláris Ca²⁺ megnövekedése hatására azonnal kimutatható a CRAC-csatornákon keresztül történő Ca²⁺-beáramlás. Ezt a [Ca²⁺]_i robusztus növekedése mutatja, amelyet az Indo-1 fluoreszcenciaarányának 400 és 475 nm-en történő növekedése révén követhetünk nyomon. Az áramlási-citometriás Ca²⁺ -mérések validálása és a Kv1.3 Ca²⁺-válasz kialakításában betöltött szerepének megerősítése végett 10 nM ShK-t, egy Kv1.3 antagonistát alkalmaztunk (**73. ábra**). A Kv1.3 gén Kv1.3-NP-kkel történő csendesítése a Ca²⁺-beáramlás jelentős csökkenését eredményezte a scramble-NP-kkel kezelt sejtekhez képest (**72. ábra** A panel). A Kv1.3-NP-k hatását a CRAC csatornákon keresztül történő Ca²⁺ -felvételre a Kv1.3-csendesített és a kontroll sejtek esetében az area under curve (AUC, görbe alatti terület) és a Ca²⁺ csúcsamplitúdók arányának kiszámításával jellemeztük. A **72. ábra** B panele egyértelműen jelzi, hogy a Ca²⁺ jelátvitel mindkét paramétere jelentősen csökkent a T_M-ekben (3 donor) a Kv1.3-NP kezelését hatására. A kezeletlen sejtek, valamint az üres CD45RO-NP-kkel és Scramble-NP-kkel kezelt sejtek azonos Ca²⁺-válaszai az jelzik, hogy a CD45RO-

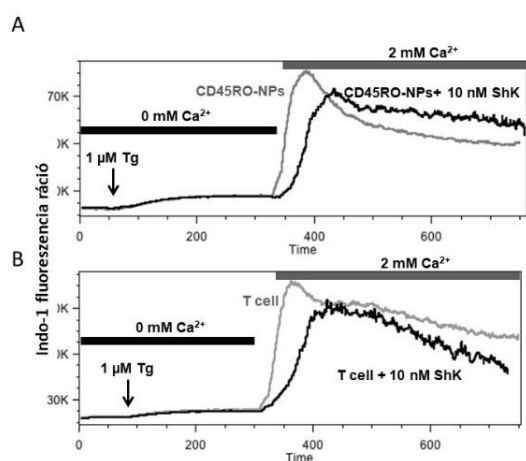
antitestnek nincs hatása a Ca^{2+} -áramlásra (72. ábra, 73. ábra). Ezek az adatok azt jelzik, hogy a Kv1.3-NP-k alkalmazása hatékony alternatívája lehet a Kv1.3 farmakológiai blokkolóknak.

Összefoglalva elmondható, hogy a memória T-sejteket szelektíven sikerült „targetálnunk”



72. ábra. A Kv1.3 NP-kkel történő csendesítése csökkenti a Ca^{2+} választ a T_M sejtekben. (A) A TG által indukált Ca^{2+} beáramlás időbeli lefolyása a CRAC csatornákon keresztül nem aktivált T sejtekben, amelyeket előinkubáltunk (24 óra) Kv1.3-NP-kkel (fekete vonal) vagy Scramble-NP-kkel (szürke vonal). Az Indo-1 töltött sejtek fluoreszcencia-intenzitását csak az Alexa-488 gátolt alpopulációban detektáltuk áramlási citométerrel (az NP-eket SAV-Alexa488-cal funkcionálisztuk). **(B)** Az AUC (area under the curve) és a Ca^{2+} amplitúdók aránya Kv1.3-NP-vel és Scramble-NP-vel kezelt sejtek esetében (n=3 donor).

unilamelláris, CD45RO antitest funkcionáliszt, 100 nm-es liposzómákkal. Ezek a módosított NP-k internalizálódnak a sejtekbe, és siRNS rakományuk bejut a citoszolba. Ennek eredményeként csökken a Kv1.3 csatorna expressziója, ami viszont csökkent Ca^{2+} beáramláshoz vezet. Ez a megközelítés új modalitást nyújthat a T-sejtek hiperaktivitásával összefüggő autoimmun betegségek kezelésében.

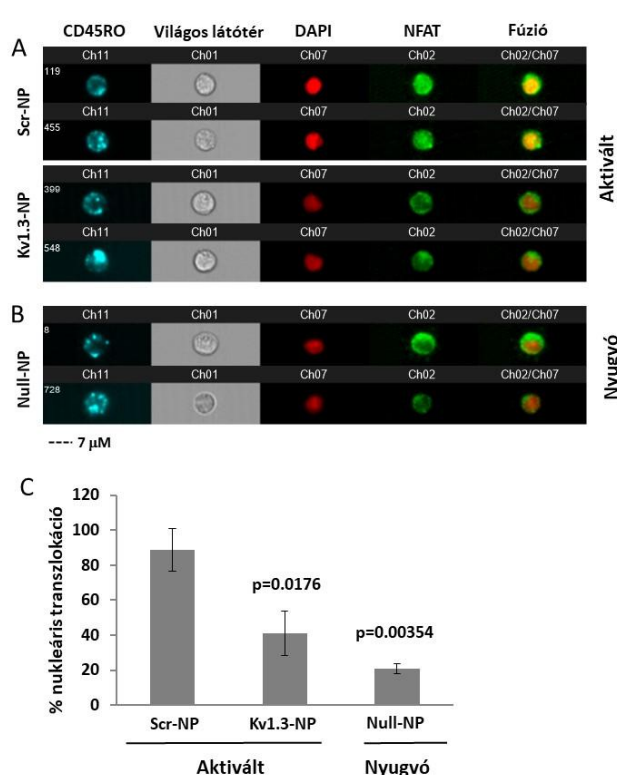


73. ábra. Ca^{2+} -válasz T_M/T sejtekben CD45RO-NP-kkel és anélkül. A thapsigargin által indukált Ca^{2+} beáramlás időbeli lefolyása a CRAC csatornákon keresztül nem aktivált T-sejtekben, amelyeket előinkubáltunk (24 óra) CD45RO-NP-kkel (A) vagy CD45RO-NP-k nélkül (B). Az (A) ábrán látható Indo-1 fluoreszcenciát csak az Alexa488 kapuzott alpopulációban detektáltuk áramlási citométerrel (az NP-eket SAV-Alexa488-jal jelöltük). A Ca^{2+} -választ 10 nM ShK nélkül (szürke vonal) vagy jelenlétében (fekete vonal) követtük nyomon.

4.3.2 Nanovezikula-asszisztált Kv1.3 géncsendesítés hatása a Ca^{2+} -függő jelátvitelre

4.3.2.1 A Kv1.3-NP-k gátolják az NFAT nukleáris transzlokációt a memória T-sejtekben

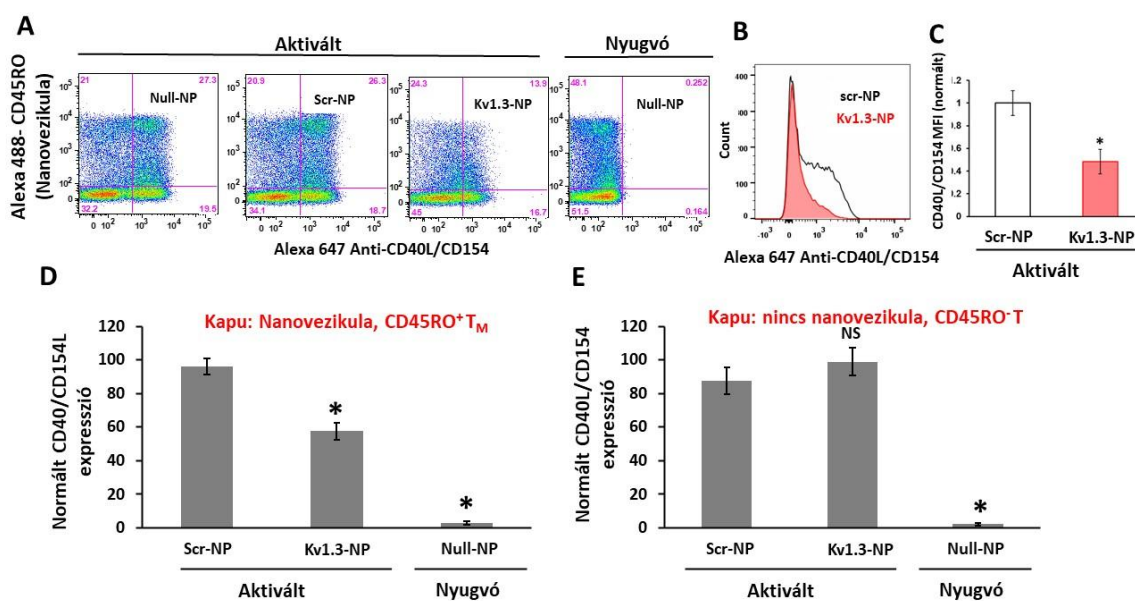
A T-sejtek aktiválódását a $[Ca^{2+}]_i$ növekedése kíséri, amely aktiválja az NFAT-t, mely ennek eredményeképp a sejtmagba transzlokálódik, ahol a CD40L (CD154) és egyéb pro-inflammatorikus citokinek transzkripcióját indítja be [286-288]. Először kísérleteket végeztünk annak meghatározására, hogy a Kv1.3-NP-k által okozott Kv1.3 expresszió és $[Ca^{2+}]_i$ csökkenés hatékonyan gátolja-e az NFAT aktivációt és a nukleáris transzlokációt a memória T-sejtekben. A nyugvó T-limfocitákat egy éjszakán keresztül inkubáltuk fluoreszcens Kv1.3-NP-ekkel, Scramble-NP-ekkel (Scr-NP rövidítettük itt), valamint olyan CD45RO-NP-ekkel, melyek nem tartalmaztak siRNS-t (null-NP). A sejteket ezután thapsigarginnal (TG) aktiváltuk (1 μ M, 1 óra időtartam) a CRAC-csatornákon keresztül, a TCR aktiválása nélkül. A CD45RO⁺, nanorészecskéket kötött T-sejtekben az NFAT nukleáris transzlokációját ImageStream X imaging áramlási citométer segítségével meghatároztuk. Az Scr-NP-ekkel előkezelt, aktivált CD45RO⁺ T-sejtek (74. ábra A és C panele) jelentős NFAT nukleáris transzlokációt mutattak (89



74. ábra. A Kv1.3-NP-k csökkentik az NFAT nukleáris transzlokációját a CD45RO⁺ T_M-sejtekben. (A-B) Reprezentatív CD3⁺ sejtek imaging flow citométerrel rögzített képei. A képeken TG-aktivált sejtek, amelyek Scr-NP-vel (felső sor) vagy Kv1.3-NP-vel (alsó sor) kezeltünk (A), és nyugvó T-sejtek, amelyeket Null-NP-ekkel inkubáltunk (B) láthatók. Az NP-k fluoreszcens jele kék (Ch11, Alexa 647 fluorofórral konjugált SAV-t használtunk), a DAPI piros fluoreszcenciaként (sejtmag, Ch07), az NFAT zöld jele a Ch02-ben (Alexa 488 anti-NFAT antitest) látható. Az NFAT nukleáris transzlokációját az aktivált CD45RO⁺ T-sejtekben a vörös és a piros szín kolokalizációja jelzi (fúzió: Ch02/Ch07 oszlop, sárgás szín). (C) Az NFAT magtranszlokációjának százalékos aránya Scr-NP- vagy Kv1.3-NP-ekkel kezelt aktivált T-sejtekben, valamint Null-NP-ekkel kezelt nyugvó T-sejtekben. Az adatokat az aktivált Null-NP-vel kezelt sejtekre normáltuk (100%-os transzlokációnak tekintve). Átlag ± SEM-et tüntettük fel 3 donorra, 2300-3500 sejt per donor.

± 12%-a sejteknek, n = 3 donor), míg a Kv1.3-NP-ekkel történő kezelés szignifikánsan csökkentette az NFAT-transzlokációt (a sejtek 41 ± 12%-a, n = 3 donor, p < 0,001) (74. ábra, A és C panel). A nyugvó CD45RO⁺ T-sejteket null-NP-ekkel inkubálva sejtek csak alapszintű NFAT

nukleáris lokalizációt mutattak (sejtek $21 \pm 3\%$ -a, **74. ábra**, B és C panel), ami nem volt szignifikánsan különböző a Kv1.3-NP-kkel kezelt sejtektől ($p = 0,2$). Összességében az adatok azt mutatják, hogy a Kv1.3-NP-k hatékonyan csökkentik az NFAT nukleáris felhalmozódását a CD45RO⁺ T_M-sejtekben. Mivel a T-sejtek NFAT-aktivációja szabályozza a CD40L expresszióját, ezért megvizsgáltuk a Kv1.3-NP-k hatását a CD40L expressziójára.



75. ábra. Kv1.3-NP-k csökkentik a CD40L expresszióját a CD45RO⁺ T-sejtekben. (A) A CD40L/CD154 vs CD45RO fluoreszcencia intenzitás dotplot aktivált T sejtekben (1 μ M TG-vel, 3 óráig) illetve nyugvó CD3⁺ sejteken. A sejteket egy éjszakán át inkubáltuk null-NP-kkel, scr-NP-kkel vagy Kv1.3-NP-kkel (a funkcionálizáláshoz Alexa488 SAV-t használtunk). Az Alexa647 (CD40L/CD154) és az Alexa488 (NP kötött T-sejtek) fluoreszcencia-intenzitását detektáltuk minden egyes sejtben. A kvadránsok kapuit az NP-k nélküli sejtek és izotípusos kontroll antitesttel festett sejtek alapján állítottuk be, a kvadránsokban lévő számok a sejtek százalékos arányának felelnek meg. (B) Az aktivált CD40L/CD154 expresszió histogramja aktivált CD45RO⁺ CD3⁺ sejtekben, amelyeket scr-NP-kkel (fekete) vagy Kv1.3-NP-kkel (piros) voltak inkubálva. (C) A CD40L/CD154 expresszió átlagos fluoreszcencia-intenzitása (MFI) aktivált, scr-NP-kkel vagy Kv1.3-NP-kkel kezelt CD3⁺ sejtekben ($n = 3$ donor). Az adatok a scr-NP-k MFI-jére normáltuk. (D és E) Átlagos CD40L/CD154-expresszió NP⁺ (CD45RO⁺ T-sejtek, D) vagy NP⁻ (CD45RO⁻ T-sejtek, E) sejtek esetében. A sejtek scr-NP-vel, Kv1.3-NP-vel vagy null-NP-vel voltak kezelve. Az értékeket aktivált null-NP mintára normáltuk. Az adatok 3 donorra vonatkozó átlag \pm SEM értéket mutatnak. Sejtszám: 20 000-50 000 minden egyes mintában. *: $p < 0.05$.

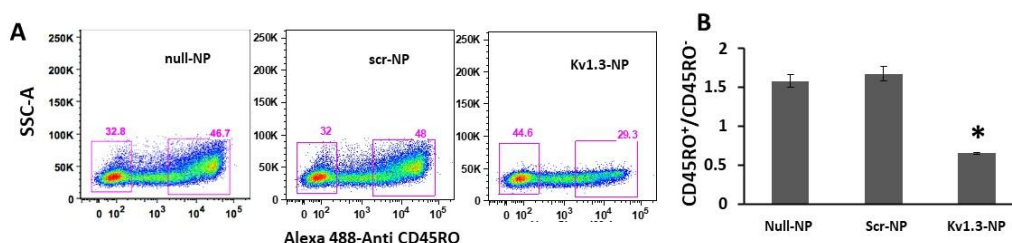
4.3.2.2 *A Kv1.3-NP-k csökkentik a CD40L expresszióját a memória T-sejtekben*

A CD40L/CD154 (később itt csak a CD40L-et használom) transzkripcióját a T-sejtekben TG-vel történő aktiválás indukálja, hasonlóan a PMA-hoz és ionomicinhez, amelyek a különböző TCR-stimuláció biokémiai útvonalai [288-290]. Ezért annak megállapítására, hogy a Kv1.3-NP-k csökkentik-e a TG által indukált CD40L-expressziót a CD45RO⁺ T-sejtpopulációban, a CD3⁺ sejteket egy éjszakán át inkubáltuk Kv1.3-NP-, Scr-NP- és Null-NP-kkel. A sejteket ezután 3 órán keresztül TG-vel aktiváltuk, majd a CD40L expresszióját áramlási citométerrel meghatároztuk NP-ket felvevő (CD45RO⁺ T-sejtek (T_M)) illetve NP-ket nem kötött/endocitált (CD45RO⁻ T-sejtek, naiv) sejtekben. Negatív kontrollként nyugvó CD3⁺ sejteket null-NP-kkel inkubáltunk. Amint azt a **75. ábra** A panelén bemutatott reprezentatív kísérletek mutatják, a CD40L⁺ sejtek százalékos aránya 47%-kal csökkent az Kv1.3-NP-kkel kezelt, majd aktivált CD45RO⁺ T-sejtekben a Scr-NP és null-NP-kezelésű sejtekhez képest (**75. ábra**, A és C panel). A CD40L expresszió átlagos fluoreszcencia-intenzitása (MFI) az aktivált CD45RO⁺ T-sejtekben, amelyeket Kv1.3-NP-kkel inkubáltunk, 52%-kal csökkent az Scr-NP-vel kezelt kontrollhoz képest ($p = 0,03$, 3 donor, **75. ábra** C panel). A Kv1.3-NP kezelt, CD40L⁺CD45RO⁺ sejtek százalékos aránya, amelyet a CD40L⁺CD45RO⁺ null-NP-vel kezelt T-sejt szubpopulációhoz viszonyítottunk $58 \pm 5\%$ -ra csökkent, míg az Scr-NP-vel kezelt sejtek esetében $96 \pm 5\%$ volt (3 donor, $p < 0,001$, **75. ábra** D panel). A null-NP-t felvett nyugvó T-sejtekben nem volt CD40L-expresszió emelkedés detektálható ($3 \pm 1\%$ CD40L⁺ CD45RO⁺ sejtek aránya, **75. ábra** A és D panel). A CD45RO⁺ T-sejtekkel ellentétben a CD40L-expresszió az aktivált CD45RO⁻ T-sejtekben (naiv T-sejtek) nem változott a Kv1.3-NP-vel történő kezelés hatására. A **75. ábra** E panelje mutatja, a CD40L⁺ CD45RO⁻ sejtek százalékos aránya az Scr-NP-vel kezelt ($87 \pm 8\%$) és a Kv1.3-NP-vel kezelt sejtekben ($99 \pm 8\%$, 3 donor, $p = 0,3$) nem volt szignifikánsan különböző. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a Kv1.3-NP-k hatékonyan és specifikusan képesek gátolni a CD40L expressziót T_M sejtekben. Érdekes megfigyelés volt, hogy a Kv1.3-NP-k alkalmazása csökkenti a CD45RO⁺ T-sejtek frakcióját a teljes T-sejt populációban (**75. ábra** A. része, Scr-NP és Kv1.3-NP dotplotok).

4.3.2.3 *Kv1.3-NP-ék T-sejt fenotípus-váltást eredményeznek*

Eredményeink azt mutatták, hogy a T-sejtek Kv1.3-NP-kkel való „kezelése” csökkentette a CD45RO⁺ sejtek arányát, és a CD45RO⁻ populáció növekedését okozta (**76. ábra**). A CD3⁺ kevert sejtpopuláció túlnyomórészt CD45RO⁺ T-sejtekből áll, amit a CD45RO⁺/CD45RO⁻ arány is jelez: $1,4 \pm 0,2$ a Null-NP-vel és $1,5 \pm 0,1$ az Scr-NP-vel inkubált sejtekben. (3 donor, $p = 0,5$ a Null-

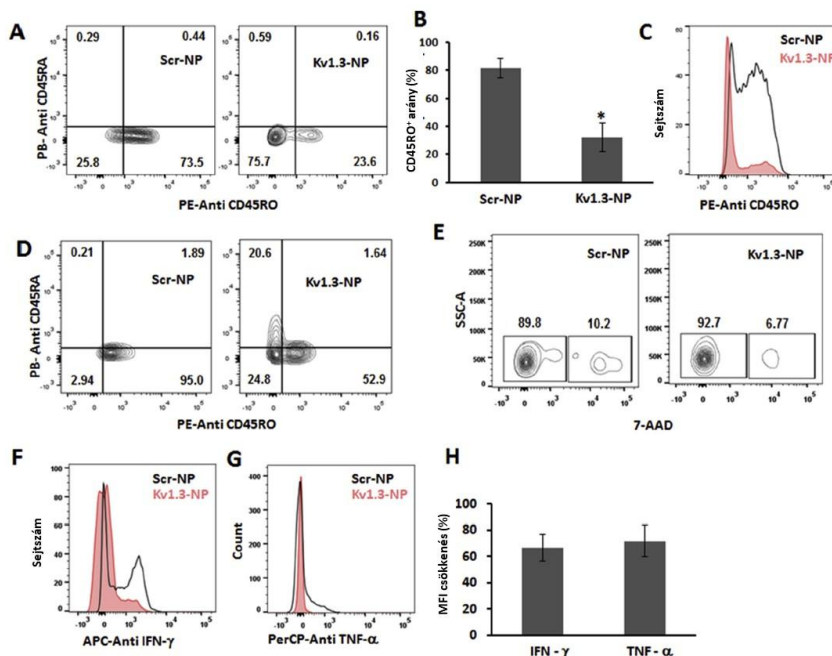
NP-hez képest, **76. ábra**, A és B panele). Ez az arány 45%-kal, $0,8 \pm 0,03$ -ra csökkent a Kv1.3-NP-vel kezelt sejtekben (3 donor, $p < 0,001$ a Null- és Scr-NP-hez képest, **76. ábra**). Mindez arra utal, hogy a Kv1.3-NP-k változást idéznek elő: a túlnyomórészt CD45RO⁺-ból álló T-sejt populáció „transzformálódik” CD45RO⁻-ba.



76. ábra. A Kv1.3-NP kezelés a CD45RO expresszió csökkenését eredményezi. (A) Reprezentatív áramlási citometriás dotplotok a CD45RO expresszióját mutatják Null-, Scr- vagy Kv1.3-NP-vel inkubált, majd TG-vel 3 órán át aktivált CD3⁺ sejteken. CD45RO⁺ memória T és CD45RO⁻ naiv T sejt populációkat téglalap alakú kapuk rajzolásával jelöltük ki. A kapuk melletti számok a CD45RO⁺ és CD45RO⁻ sejtek százalékos arányát jelzik (teljes sejtszámhoz viszonyítva). **(B)** A CD45RO⁺ és CD45RO⁻ aránya aktivált CD3⁺ sejteken, melyek Null-, Scr- vagy Kv1.3-NP-vel kezeltünk. Átlag \pm SEM (3 donor) van feltüntetve, minden kísérletben összesen 20 000 sejtet rögzítettek. *: statisztikailag szignifikáns különbség.

Ennek hátterében álló okok az alábbiak lehetnek: 1) a CD45RO⁺ sejtek elpusztulnak a Kv1.3-NP kezelés hatására; 2) a memória tényleges elvesztése következik be, amelyet a CD45RO expresszió eltűnése fémjelez. Annak vizsgálatára, hogy a CD45RO csökkenés a memória sejtek naiv sejtekké való differenciációjának eredménye-e, egészséges donorokból izoláltunk CD4⁺ memória T-sejteket és megvizsgáltuk a Kv1.3-NP-k hatását a CD45RO expresszióra, a sejtek életképességre és a citokin termelésükre. A memória CD4⁺ T-sejteket a Kv1.3- vagy Scr-NP-vel kezeltük, majd anti-CD45RO és anti-CD45RA antitesttel jelöltük, és analizáltuk a memória és a naiv T-sejt populációk arányát. Megfigyeltük, hogy a Kv1.3-NP-vel történő inkubációt követően, a memória CD4⁺ T-sejtek fenotípusa megváltozott. CD45RO⁺CD45RA⁻ról NP-vel kezelt memória CD4⁺ T-sejtekben. (3 donor, $p = 0,02$, **77. ábra** B panel). A CD45RO MFI jelentősen alacsonyabb értéke a CD45RO expresszió csökkenését mutatta a Kv1.3-NP-vel kezelt memória CD4⁺ T-sejtek esetében (**77. ábra** C része). Egy donor esetében megfigyeltük, hogy a CD45RO⁺ sejtek számának csökkenését a CD45RA⁺ sejtek növekedése kísérte. (**77. ábra** D panel). A CD45RO⁺ fenotípusú sejtek „eltűnése” viszont nem ezen sejtek elpusztulása miatt következett be: Kv1.3-NP-k hozzáadása ugyanis nem indukált sejthalált, amit a 7-AAD⁺ sejtek

számának változatlanlansága mutat (**77. ábra**, E panel). túlnyomórészt CD45RO⁻CD45RA⁺ra változtak át. (**77. ábra** A panel). A CD45RO⁺ sejtek százalékos aránya aránya 81 ± 7%-ról (Scr-rel kezelt memória CD4⁺ T-sejtek) 32 ± 11%-ra a esett Kv1.3. Továbbá megvizsgáltuk a



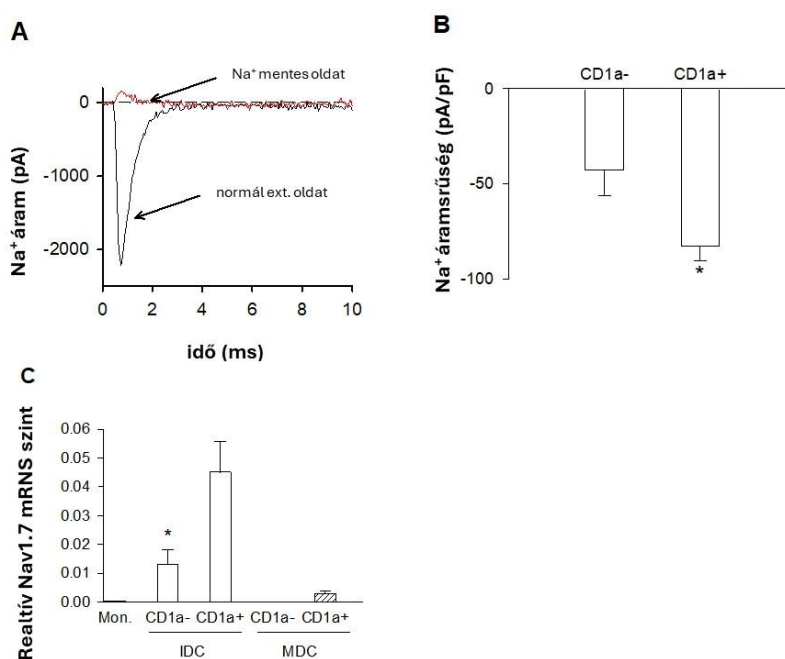
77. ábra. A Kv1.3-NP-k csökkentik a CD45RO expressziót és citokintermelést a memória CD4⁺ T-sejtekben. (A) A CD45RO és CD45RA expresszió reprezentatív áramlási citometriás kontúrdiagramjai memória CD4⁺ T-sejtekben, melyeket Scr-NP vagy Kv1.3-NP kezelésnek vetettünk alá, majd 3 órán keresztül PMA/ionomicinnel aktiváltunk. A számok az egyes kvadránsban lévő sejtek százalékat jelentik. **(B)** A CD45RO expresszióját a CD45RO⁺ sejtek százalékos arányaként mértük scr-NP-vel vagy Kv1.3-NP-vel kezelt sejtek teljes sejtszámára vonatkoztatva. (3 donor). Átlag ± SEM tüntettük fel, minden mintában 20 000 sejtet rögzítettek. *: statisztikailag szignifikáns különbség. **(C)** A CD45RO expresszió reprezentatív hisztogramjai Scr-NP-vel (fekete vonal) vagy Kv1.3-NP-vel (piros vonal) kezelt aktivált memória CD4⁺ T-sejtekben. **(D)** CD45RO és CD45RA expresszió kontúrdiagramjai egy speciális donorból izolált, Scr-NP vagy Kv1.3-NP-kkel inkubált, majd PMA/ionomicinnel 3 órán keresztül aktivált CD4⁺ T_M-ekben. A CD45RA⁻ sejtek száma megemelkedett a Kv1.3-NP kezelés hatására (jobb oldali panel) **(E)** Az (A) panelen bemutatott memória CD4⁺ T-sejtek életképességének vizsgálata 7-AAD nukleáris festékekkel egy reprezentatív donor esetében. A 7-AAD fluoreszcenciát az oldalszórás (SSC-A) függvényében ábrázoltuk. Téglalap alakú kapukat rajzoltunk a 7-AAD⁺ (nem életképes/elpusztult) és 7-AAD⁻ (élő) sejt populációk jelölésére, a kapuk feletti számok pedig a 7-AAD⁺ és 7-AAD⁻ sejt populációk százalékos arányát jelzik. **(F)** Reprezentatív IFN-γ expresszió hisztogramja Scr-NP-vel vagy Kv1.3-NP-vel kezelt, egy donorból származó aktivált memória CD4⁺ T-sejtekben. **(G)** A TNF-α expressziójának tipikus hisztogramja Scr-NP-vel vagy Kv1.3-NP-kkel előinkubált aktivált memória CD4⁺ T-sejtekben. **(H)** Az IFN-γ és TNF-α expresszió csökkenése a Kv1.3-NP-kkel előkezelt memória CD4⁺ T-sejtekben, az MFI-értékeket az scr-NP-vel kezelt kontrollra normáltuk. 3 donor átlagát ± SEM-et adtuk meg, minden egyes mintában 20 000 sejtet rögzítve.

citokintermelést, amely magasabb a T_{EM}-ekben (effektor memória T-sejtek) a T_{CM}-ek (központi memória T-sejtek; a T_{CM} sejtek a memória T-sejtpopulációból) és a T_{naiv}-ok hoz képest [291]. Megfigyeltük, hogy a memória CD4⁺ T-sejtekben, amelyeket Kv1.3-NP-kkel kezeltünk, szignifikánsan csökkent az IFN- γ (**77. ábra** F, H panel) és a TNF- α (**77. ábra** G és H része) szintje. Az IFN- γ és a TNF- α expressziója 66%-kal és 71%-kal csökkent, ami azt jelzi, hogy a CD45RO memóriamarker elvesztése csökkenő effektor funkciókkal is együtt jár. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Kv1.3-NP-k hatékonyan elnyomják a CD45RO⁺ T-sejtek memória- és effektor funkcióját.

4.4 Az Nav1.7 csatorna altípus specifikus expressziója és szerepe az éretlen dendritikus sejtekben

4.4.1 A Nav1.7 elsősorban a CD1a⁺ monocitákból származó éretlen dendritikus sejtek (IDC) alpopulációjában fejeződik ki

Munkacsoportunk korábban igazolta, hogy a Nav1.7 csatornát a monocitákból származó IDC-k expresszálják, és az érett DC-kké történő differenciálódás során teljesen eltűnik [104]. A CD1a⁻ és CD1a⁺ IDC alcsoportok eltérő funkcionális aktivitását írták le, ezért összehasonlítottuk ezen éretlen DC-alcsoportok Nav1.7-expresszióját. A CD1a⁺ IDC-kben markáns, befelé irányuló, gyorsan aktiválódó és inaktiválódó Na⁺ áramot detektáltunk (**78. ábra A panel**). A Na⁺ áram detektálás gyakorisága a CD1a⁻ IDC-ben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a CD1a⁺ sejtekben (khi-négyzet teszt Yates korrekcióval: CD1a⁺ (n=25) és CD1a⁻ (n=19), p=0,021). A CD1a⁻ és CD1a⁺ IDC-k Na⁺ áramsűrűségében (CD) is jelentős különbséget találtunk (CD, 0 mV-on mért csúcstartomány osztva a sejt kapacitásával): a CD1a⁺ alcsoportban szignifikánsan magasabb volt (CD_{CD1a⁺} = -83 ± 7,6 pA/pF, CD_{CD1a⁻} = -43 ± 13,4 pA/pF (n=9, p=0,015) (**78. ábra B panel**). A két DC-altípus sejtmembrán-kapacitása között viszont nem volt különbség (11,9 ± 1,5 pF és

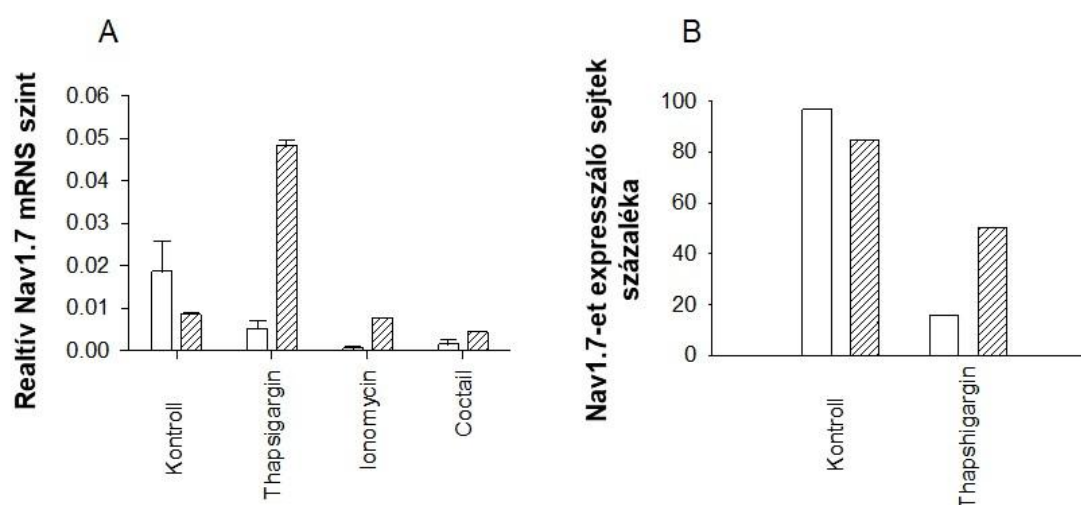


78. ábra. A Nav1.7 expressziós szintje CD1a⁻ és CD1a⁺ IDC-kben. (A) Teljes-sejt Na⁺ áram CD1a⁺ IDC-ben, amelyet -120 mV-os tartópotenciálról történő 15 ms hosszú, 0 mV-ra depolarizáció alatt rögzítettünk, normál és Na⁺-mentes extracelluláris oldatokkal történő perfúzió során. **(B)** Nav1.7 csatornák áramsűrűsége az IDC-ben. A Na⁺-áramok csúcstartományát 0 mV-on határoztuk meg, és elosztottuk a sejt kapacitásával. n = 9 CD1a⁺ és CD1a⁻ sejt. **(C)** Humán monocita, IDC és MDC sejtek relatív Nav1.7 RNS expressziós szintje (3 donor). Átlagot és SEM-et tüntettük fel, *: p < 0,05.

13,5 ± 1,5 pF a CD1a⁺ és CD1a⁻ sejtek esetében, p=0,457). Emellett a Q-PCR mérések szerint a Nav1.7 mRNA relatív expressziója szintén magasabb volt az éretlen CD1a⁺, mint a CD1a⁻ sejtekben, mely expressziós szint drámaian lecsökkent a érett DC-vé (MDC) alakulás során (**78. ábra**, C panel). Ezek az eredmények azt jelezték, hogy az Nav1.7 csatornák szerepe szorosan kapcsolódik a DC éretlen állapotához, és elsősorban a CD1a⁺ alcsoporthoz.

4.4.2 Az intracelluláris Ca²⁺ szint emelkedése leszabályozza a Nav1.7 expresszióját

Számos tanulmány alátámasztja a Ca²⁺ jelátvitel szerepét a DC aktiválásában [292]. Ezért a következőkben azt vizsgáltuk, hogy a tartósan emelkedett Ca²⁺ koncentráció önmagában csökkenti-e a Nav1.7 csatorna expresszióját. A Q-PCR mérések kimutatták, hogy az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedése, amelyet vagy a Ca²⁺ ionofór ionomycin, vagy a szarko(endo)plazmatikus retikulum Ca²⁺-ATPáz antagonistá thapsigargin indukált, hatékony gátlója volt a Nav1.7 gén expressziójának, és a gyulladáscsökkentő citokinekkel hasonló hatással rendelkezett (**79. ábra**, A panel). Az 5 mM extracelluláris EGTA alkalmazása nem volt hatással a Nav1.7 mRNA expressziójának a citokinkeverék által kiváltott csökkenésére, azonban

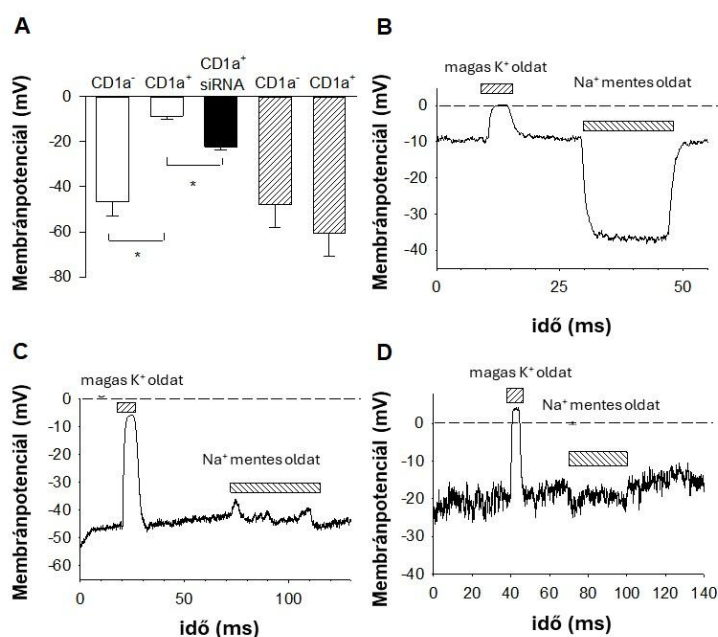


79. ábra. A megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ koncentráció hatása a Nav1.7 gén expressziójára IDC-kben. (A) A Nav1.7 génexpressziót kontroll IDC-ben és 250 nM thapsigarginnal, 180ng/ml ionomycinnel vagy gyulladáscsökkentő keverékkel (koktél) 24 órán keresztül 5 mM EGTA és 10 mM MgCl₂ nélkül (fehér oszlopok) vagy jelenlétében (sraffozott oszlopok) kezelt IDC-kben, Q-PCR-rel határoztuk meg. Pozitív kontrollként az MDC-ben mért expressziós szint szolgált (gyulladáscsökkentő koktéllal kezelt IDC-minták). **(B)** A Nav1.7-et expresszáló CD1a⁺ IDC-k százalékos aránya a kontroll és thapsigarginnal kezelt sejtekben, EGTA nélkül (fehér oszlop) vagy jelenlétében (sraffozott oszlopok). A sejteket akkor tekintettük Nav1.7-et expresszálónak, ha 0 mV tesztfeszültségen jellegzetes befelé irányuló áramot regisztráltunk, és a csúcáram meghaladta a 100 pA-t, n > 13 mindegyik csoport esetén.

részben vagy teljesen meggátolta az ionomicin és a thapsigargin által kiváltott Nav1.7 mRNS szint leszabályozását (**79. ábra**, A panel). Annak további ellenőrzésére, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -emelkedés képes-e a Nav1.7 expresszióját leszabályozni, 24 órás thapsigargin-kezelést követően elektrofiziológiai módszerrel vizsgáltuk a CD1a⁺ IDC-k Nav1.7 csatorna expresszióját (**79. ábra** B része). Várakozásainknak megfelelően a Nav1.7-et expresszáló sejtek aránya jelentősen csökkent a nem kezelt sejtekhez képest, és ezt a csökkenést EGTA részben visszafordította. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése kiválthatja a Nav1.7 csatorna expressziójának csökkenését.

4.4.3 Az Nav1.7 csatorna szabályozza a CD1a⁺ IDC-k membránpotenciálját

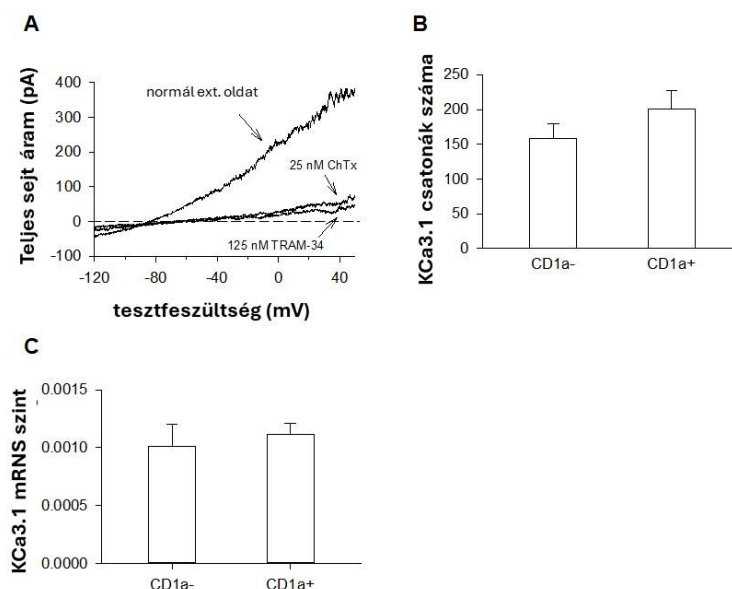
Az Nav1.7 pontos szerepe az immunsejtekben nem ismert, így feltételeztük, hogy hozzájárulhatnak a nyugalmi membránpotenciál kialakításához. Ezért CD1a⁺ és CD1a⁻ IDC-k és MDC-k membránpotenciálját meghatároztuk. A perforált-patch, teljes-sejt current-clamp



80. ábra. A CD1a⁺ és CD1a⁻ DC-k membránpotenciálja. A sejtek membránpotenciálját current-clamp konfigurációban, perforált patch módszerrel rögzítettük. A tartási áram 0 pA volt. A CD1a⁺ sejteket anti-CD1a FITC fluoreszcens jelölés alapján azonosítottuk. **(A)** CD1a⁻ és CD1a⁺ IDC (fehér oszlopok), a megfelelő MDC (sraffozott oszlopok) és Nav1.7 siRNS transzfektált CD1a⁺ IDC (fekete oszlop) normál extracelluláris oldatban mért membránpotenciálja. A hibák a SEM-et jelzik az egyes csoportokban, $n > 7$, *: $p < 0.05$. CD1a⁺ **(B)**, CD1a⁻ IDC **(C)** és Nav1.7 siRNS transzfektált CD1a⁺ IDC **(D)** membránpotenciálja. A sejteket normál extracelluláris oldattal perfundáltuk, amennyiben másként nem tüntettük fel. A magas K^+ tartalmú (jobbra sraffozott téglalap) vagy Na^+ -mentes külső oldatra (balra sraffozott téglalap) történő váltást a vízszintes sávok jelzik. A szaggatott vonalak a nulla potenciál értéket jelzik.

(áram-zár) mérések azt mutatták, hogy a CD1a⁺ IDC nyugalmi membránpotenciálja jelentősen magasabb ($-8,7 \pm 1,5$ mV, $n=14$) a CD1a⁻ IDC-hez vagy MDC-hez képest (-40 és -60 mV között, átlagosan $-47 \pm 6,2$ mV, $n=7$, **80. ábra** A panel). Feltételeztük, hogy a különböző sejttípusok membránpotenciáljában mért különbségek a CD1a⁺ IDC-kben kifejeződő funkcionális Na⁺ csatornák jelenlétének tulajdonítható. Ennek a hipotézisnek a tesztelése érdekében meghatároztuk a membránpotenciál extracelluláris Na⁺ érzékenységét: a Na⁺-mentes extracelluláris oldattal történő perfúzió során a CD1a⁺ IDC-k membránpotenciálját a CD1a⁻ IDC-k, CD1a⁻ és CD1a⁺ MDC-ken regisztrált értékekhez közeli értékekre mozdította el (**80. ábra** B panel). Na⁺-mentes extracelluláris oldattal történő perfúzió azonban nem volt hatással a CD1a⁻ IDC-k membránpotenciáljára (**80. ábra** C panel).

A membránpotenciál Nav1.7 függőségének további vizsgálatához specifikus siRNS segítségével géncsendesítést végeztünk: az Nav1.7-specifikus siRNS transzfekciója az IDC-kben ~60%-kal csökkentette a Nav1.7 mRNS expresszióját, valamint az Nav1.7 pozitív CD1a⁺ IDC-k számát 13%-ra csökkent, míg a negatív kontroll siRNS-sel transzfektált CD1a⁺ sejtek 96%-a maradt Na⁺ csatorna pozitív ($n = 20$ a kontroll és Nav1.7 csendesített sejtek esetében). Továbbá az Nav1.7-specifikus siRNS-szel transzfektált CD1a⁺ IDC-k membránpotenciálja szignifikánsan negatívabb volt ($-22,3$ mV \pm 1,5 mV ($n=8$)), mint a nem transzfektált CD1a⁺ IDC-



81. ábra. Az KCa3.1 csatorna expressziója az IDC-kben. (A) A CD1a⁻ IDC-ben normál extracelluláris oldatban, ChTx vagy TRAM-34 perfúziója során, feszültség-rámpa protokollal rögzített teljes-sejt áramgörbe. A szaggatott vonal a nulla áramsztent jelöli. **(B)** A KCa3.1 csatornák számát a CD1a⁺ és CD1a⁻ IDC-kben, $n > 5$. **(C)** KCa3.1 csatorna mRNS szintje IDC-kben, 3 donor. Átlag \pm SEM-et tüntettük fel.

ké ($p < 0,001$, **80. ábra** A panel). Ezen túlmenően az Nav1.7 siRNS-transzfektált sejtek membránpotenciáljában nem volt változás, amikor Na^+ -mentes oldatnak tettük ki őket (**80. ábra** D panel), hasonlóan a Nav1.7 csatornákat nem kifejező CD1a^- IDC viselkedéséhez (**80. ábra** C panel).

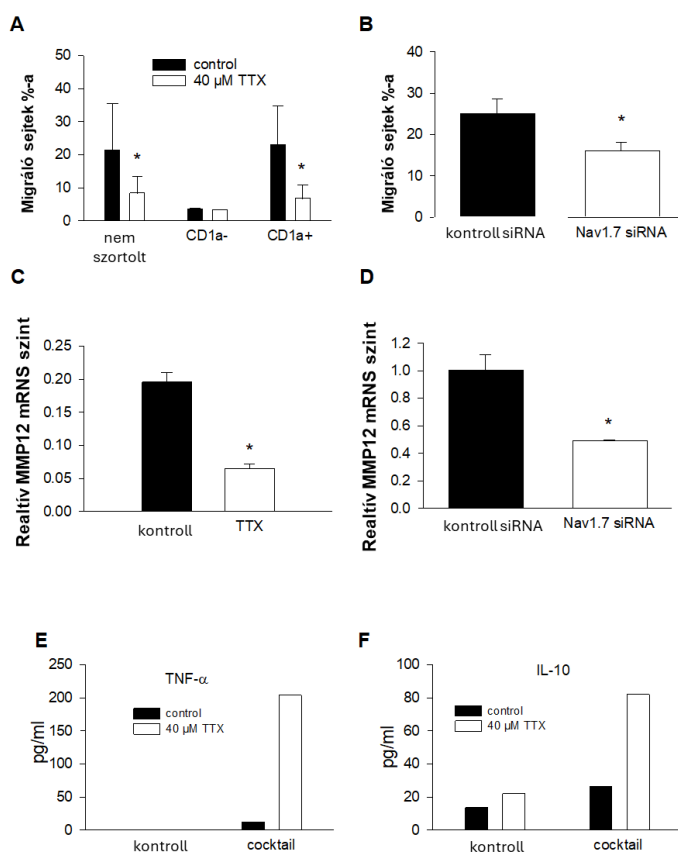
A current-clamp mérések során extracellulárisan magas K^+ tartalmú oldatot is alkalmaztunk (150 mM K^+ koncentráció), hogy megvizsgáljuk, van-e hatása a különböző dendritikus sejt altípusok membránpotenciáljára (**80. ábra** B-D panelek). Az IDC-k magas K^+ oldattal történő perfúziója kb. 0 mV-ra depolarizálta a membránpotenciált. Ez, valamint a CD1a^- IDC-k meglehetősen negatív membránpotenciálja (**80. ábra** A és C panel) K^+ csatornák jelenlétére utalt a membránban. Mivel munkacsoportunk egy korábbi tanulmánya kimutatta, hogy az IDC-kből hiányoznak a feszültségkapuzott K^+ csatornák [104], feltételeztük egy nem feszültségkapuzott K^+ csatorna jelenlétét az IDC-k membránjában. A **81. ábra** A panele CD1a^- IDC-kben feszültség-rámpa protokoll során rögzített áramgörbét mutat, melyet 1 μM szabad Ca^{2+} -t tartalmazó pipettaoldat alkalmazása során rögzítettünk. Az áram biofizikai és farmakológiai tulajdonságai a KCa3.1 kifejeződésére utaltak: az áramnak -80 mV körül van a megfordítási potenciálja, és 25 nM ChTx-szel (KCa3.1 -re a K_d értéke ~ 5 nM) vagy 125 nM TRAM-34-gyel, a KCa3.1 csatornák szelektív antagonistájával ($K_d \sim 20\text{-}30$ nM) gátolható volt az áram. Az KCa3.1 -csatornák sejtenkénti száma a CD1a^- és a CD1a^+ IDC esetében azonos volt ($p = 0,269$), csak úgy, mint a mRNS szintjük (**81. ábra** B és C panel). Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy az KCa3.1 csatornák hiánya nem felelős a CD1a^+ IDC-k depolarizált nyugalmi membránpotenciáljáért.

4.4.4 A Nav1.7 befolyásolja a CD1a^+ IDC-k migrációját és citokin szekrécióját

Irodalmi adatok alapján, amely szerint a monocitákból származó MDC-k gyulladási folyamatokért felelős csoportja a CD1a^+ alpopuláció, valamint, hogy a Nav1.7 csatornák elsősorban az IDC ezen alpopulációjában expresszálódnak, feltételeztük, hogy a Nav1.7 funkcionális szerepe a dendritikus sejtekben a sejtek éretlen állapotának fenntartásához, migrációs képesség megváltozásához kapcsolódhat. A CD1a^+ IDC-k (a Nav1.7 csatornáknak köszönhető) megemelkedett nyugalmi potenciálja miatt az aktiváláshoz nagyobb ingerre van szükségük, mint a CD1a^- IDC-knek. 10-40 μM TTX-et használtunk a Nav1.7 csatorna működésének gátlására és a CD1a^+ IDC aktiváció finomhangolásában játszott lehetséges szerepének tisztázására. A TTX-szel történő gátlás csökkentette az IDC-k MIP-1 α által indukált

in situ migrációs képességét (**82. ábra** A panel). A TTX ezen hatása a Nav1.7-et expresszáló CD1a⁺ alpopulációban volt szembetűnő (**82. ábra** A része). A Nav1.7 gén csendesítése a differenciálódó IDC-kben szintén csökkentette a MIP-1 α indukált migrációs képességet a kontroll siRNS-sel transzfektált sejtekhez képest (**82. ábra** B panel). Ezen az eredményekkel összhangban a mind a TTX-kezelés, mind az Nav1.7 expresszió leszabályozása a mátrix metalloproteináz 12 (MMP12) génexpressziós szintjét is csökkentette, amelyet túlnyomórészt a CD1a⁺ sejtek termelnek, és mely részt vesz a szöveti DC-k felszabadulásában (**82. ábra** C és D panel).

A TTX-kezelés szenzibilizáló hatása a IDC-kre akkor is kimutatható volt, amikor a különböző DC-eredetű citokinek termelését vizsgáltuk a citokinkoktéllal történő aktiválást követően. Ezekben a kísérletekben az IDC-eket 40 μ M TTX-szel kezeltük a 2. napon és a citokinkoktéllal kombinálva az 5. napon. A 6 órás aktiválást követően a hozzáadott citokinek feleslegét a sejtek mosásával eltávolítottuk, majd az aktivált DC-eket további 16 órán át friss tápfolyadékban tenyésztettük, és a felülúszókat citokinméréseknek vetettük alá. Bár a citokinek abszolút mennyisége a donorok eltérő CD1a⁺ arányai miatt eltérő volt, a TNF- α (5 donor; p=0,015; **82.**



82. ábra. A TTX gátlás és siRNS Nav1.7 géncsendesítés hatása a IDC funkcióra és aktivációra. TTX-szel kezelt (**A**) és a Nav1.7 siRNS-transzfektált (**B**) IDC-k MIP-1 α (200 ng/ml) indukálta migrációja Boyden-kamrával meghatározva. Egy tipikus kísérletet mutatunk a 3-ból. MMP-12 génexpresszió kontroll és TTX-kezelt (**C**), valamint kontroll siRNS- és Nav1.7 siRNS-transzfektált (**D**) IDC-kben. A három kísérletből egy tipikus látható. Az átlagot és az SD-t tüntettük fel. Az IDC aktivációs státuszt a TNF- α (**E**) és az IL-10 (**F**) citokinek koncentrációjának ELISA-val történő meghatározásával követtük nyomon. A négy kiválasztott donor egyikére kapott eredményeket mutatjuk (88% CD1a⁺ sejtek). Az átlagot és az SD-t tüntettük fel. * : p < 0.05

ábra E panel) és IL-10 (5 donor; $p=0,036$; **82. ábra** F panel) szekréciónövekedése 3-4, illetve 6-7-szer magasabb volt a TTX-kezelt mintákban a kezeletlen kontrollokhoz képest. Továbbá sem a TTX hozzáadása, sem az siRNS transzfekciója nem változtatta meg az IDC-k életképességét vagy internalizáló képességét, nem indukálta a CD83 expresszióját (MDC marker), és nem befolyásolta a monocitákból IDC-vé és az IDC-ből MDC-vé történő differenciálódási útvonalat sem.

Összefoglalva elmondható, hogy az Nav1.7 csatornák szerepet játszanak a CD1a⁺ IDC nyugalmi membránpotenciál fenntartásában, a migráció szabályozásában, valamint az aktiváció küszöbértékének és finomhangolásának beállításában. Úgy véljük, hogy a depolarizált membránpotenciál (~-10 mV) gátolja a gyulladáshoz vezető felelős CD1a⁺ IDC-k aktivációját az inger-küszöbérték alatt, így megvédi a sejteket a felesleges aktivációtól. Mivel a csatorna aktivitásának TTX-szel történő blokkolása vagy a Nav1.7 géncsendesítése gátolta az IDC migrációját, azt is feltételezzük, hogy ezek a nátriumcsatornák elősegítik az IDC kemotaxisát, ezáltal ezeket a sejteket a szövetekben tartva, ahol „őrszem” funkciójukat töltik be. Amikor erős veszélyjeleket érzékelnek az IDC-k, Nav1.7 csatorna expressziója lecsökken, mely lehetővé teszi egyrészt az IDC-k MDC-vé történő differenciációját, majd a nyirokcsomókba történő migrációjukat

mértékben/doménekbe veszik fel a CHOL-t vagy a 7DHC-t, másrésztől 7DHC magasabb affinitását a specifikus kötőhelyek iránt.

A T-sejt ioncsatornák plazmamembránbeli lokalizációjának molekuláris háttere és funkcionális következményeit tanulmányozva az alábbi megállapításokat tettük:

- A Kv1.3 csatorna IS-be történő berendeződése egér T-sejtekben a csatorna működését megváltoztatta: a lassúbb aktivációs kinetika és az egyensúlyi aktiváció depolarizáló feszültségek felé való eltolódása a Kv1.3 csatorna mikrokörnyezetében bekövetkező változásokkal magyarázható (magasabb viszkozitású régióba történő berendeződés); míg a gyorsabb inaktivációs kinetikát és kisebb áramsűrűséget a csatorna defoszforilációja magyarázza; utóbbit a különféle protein-kináz antagonistákkal végzett kísérleteink támasztották alá.
- A Kv1.3 csatorna C-terminálisához két horgonyzó/adapter fehérje is képes kötődni (SAP97 és PSD95), melyekről ismert, hogy az IS-ben felhalmozódnak. A csatorna C-terminálisának deléciójával, valamint e két adapter fehérje expressziójának leszabályozásával kimutattuk, hogy a Kv1.3 csatorna IS-be történő berendeződését a PSD-95 fehérjével történő kölcsönhatás irányítja.
- Kv1.3 csatorna C terminális SH3-kötő doménjéhez kapcsolódó cortactin a csatornát kihorgonyozza az aktin filament rendszerhez az F-aktin polimerizáció során. T-sejtekben a cortactin ortológ HS1 az IS-ben felhalmozódó csatornák karboxil végéhez kötődve immobilizálja a Kv1.3-at.
- A CRAC csatorna Orai1 alegysége IS-ben történő felhalmozódása az IS kialakulását követő 15 percnél éri el maximumát, majd azután csökken (az Orai1 elhagyja az immunszinapszist). Az Orai1 N-terminálisának deléciója, valamint SAP97 illetve a STIM1 - mindkettő az Orai1 N-terminálisához kötődik - expressziójának csökkentése meggátolta az Orai1 IS-ből történő „kivándorlását”. Ez azt igazolta, hogy az Orai1 a STIM1 és a SAP97 kölcsönható partnerek segítségével hagyja el a szinapszis kontaktzónáját. Az Orai1 elnyújtott IS-beli tartózkodása a IS-ben lévő T-sejtek Ca^{2+} -válaszát módosította: tartós Ca^{2+} jel oszcillációt idézett elő.

- A Kv1.3 C-terminálisán, az aktivációs kapu közelében elhelyezkedő HRETE szekvenciáról kimutattuk, hogy nem játszik jelentős szerepet a csatorna sejtmembránba történő kijutásában. Valószínűleg „fordított-csatolásban”, azaz aktivációs kapu régió és feszültség-szenzor között kialakult kölcsönhatást képes módosítani, feltételezhetően az S4-S5 linkerhez történő kapcsolódása révén.

Kv1.3 csatorna géncsendesítésére kifejlesztett lipid nanovezikulákkal kapcsolatos eredményeinket az alábbiak szerint összegezhetjük:

- Kidolgoztunk egy olyan eljárást, mely során a memória T-sejteket szelektíven sikerült CD45RO-antitesttel funkcionálizált, 100 nm-es liposzómákkal targetálni, majd a Kv1.3 siRNS-t tartalmazó, internalizálódott NP-ekkel (Kv1.3-NP) a csatorna expresszióját és CRAC-on keresztüli Ca^{2+} beáramlást csökkenteni.
- Továbbá a Kv1.3-NP alkalmazása gátolta az memória T-sejtek Ca^{2+} -függő aktivációját (NFAT transzlokáció, CD40L (CD154) expresszió), effektoros funkcióit és memória-fenotípus elvesztést is eredményezett.

A CD1a⁺ éretlen dendritikus sejtekben (IDC) kifejeződő Nav1.7 csatorna funkciójának vizsgálatakor az alábbi megállapításokat tettük:

- Az Nav1.7 csatorna a CD1a⁺ IDC-ék membránpotenciálját egy magasabb értéken tartja. A csatorna gátlása, illetve géncsendesítése egyrészt gátolta a MIP-1 α indukálta migrációt, leszabályozta az MMP12 expressziót, továbbá számos citokin termelését serkentette.

6. Jelentőség

Kutatásaim középpontjában az immunsejtek ioncsatornáit álltak és manapság is állnak. Az ioncsatornák az akciós potenciál kialakításában játszott szerepük miatt tradicionálisan az ingerelhető sejtekhez köthetők, azonban az utóbbi három-négy évtized során kiderült, hogy a nem ingerelhető sejtek esetében is számos fiziológiai folyamatot szabályoznak. Számos betegség (autoimmun, tumoros) esetén kimutatták, hogy az ioncsatornák abnormális működése, expressziójának megemelkedése, vagy éppen csökkenése tehető felelőssé a patofiziológias folyamatokért ezen sejttípusban is. Mindezek miatt nélkülözhetetlen az ioncsatornák kanonikus és nem klasszikus funkcióinak megismerése az immunsejtekben, illetve azon háttérben meghúzódó molekuláris folyamatok feltérképezése, melyek az ioncsatornák funkcióját módosíthatják. Továbbá az in vitro körülmények között tapasztalt változások, jelenségek, sokszor nem egyértelműen manifesztálódnak az in vivo klinikai körülmények, ezért nélkülözhetetlen patofiziológias „rendszerből” származó sejtek élettanának alapos megismerése.

Az ioncsatornák plazmamembránbeli elhelyezkedése lehetővé teszi, hogy farmakológiai ágensek segítségével könnyen módosíthatók. Azonban ugyanazon csatornatípus számos szövetben expresszálódhat, emiatt a szisztémás kezelés lehetősége nem minden esetben kivitelezhető. Az orvostudomány a célzott, sejtszinten történő beavatkozást biztosító terápiák irányába fejlődik, melyek előnye, hogy a szisztémás terápia nemkívánatos mellékhatásai nagy eséllyel kivédhetők. Az általunk kifejlesztett, nanovezikulákkal történő, memória T-sejteket megcélzó, siRNS-en alapuló géncsendesítés terápia ígéretes megközelítésnek bizonyult: in vivo humanizált egérrel végzett kísérletek eredményei igazolták, hogy lupuszos egerek paraméterei jelentősen javultak nanovezikula-kezelés hatására.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetem szeretném kifejezni néhai Dr. Gáspár Rezső professzor úrnak, aki az egyetemi tanulmányaim befejezte után befogadott és PhD hallgatónak invitált a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet berkeiben működő munkacsoportjába. Hála illeti meg néhai Dr. Damjanovich Sándor és Dr. Szöllősi Sándor akadémikusokat, hogy intézetvezetői tevékenységük lehetővé tette, hogy zavartalan és sikeres kutatómunkát végezhsek az intézetben, kutatói karrieremet kiteljesíthessem.

Külön köszönet illeti Dr. Panyi György professzor urat, aki a PhD hallgatói éveim során rengeteg tanáccsal, segítséggel látott el, gyakorlatilag a témavezetői szerepet ő töltötte be. Hálával tartozom neki, hiszen állandó noszogatásával inspirált arra, hogy az ioncsatornák biofizikai módszerekkel történő megismerésétől eltávolodva, az immunsejtek világát megismerve az ioncsatornák szerepét kiderítsem-e nem az ioncsatornák által dominált világban. Posztdoktori éveim során biztosította az önálló kutatási projektjeim megvalósításához szükséges anyagi háttérrel, ötleteivel újabb és újabb megválaszolható kérdéseket vetett fel, melyek különféle pályázatok és publikációk alaphipotézisét is szolgáltatták.

Külön hálával tartozom *végzett* és jelenlegi PhD hallgatóimnak, *Dr. Szilágyi Orsolyának, Dr. Balajthy Andrásnak, Dr. Vörös Orsolyának, Ghofrane Medyouninak és Jusztus Viviennek*, akik nélkül biztosan nem juthattam volna el az MTA doktori értekezés megírásához, és akik hozzáállásukkal és belém vetett bizalmukkal megtiszteltek. Sokat tapasztaltam és tanultam a velük folytatott eszmecsere során mind szakmai és emberi oldalról, felismertem, hogy csapatmunka során miképp kell menedzselni a „játékosokat”.

Köszönettel tartozom kooperációs partnereimnek, akikkel számos sikeres projektben dolgoztunk: Prof. Jan Tytgat (Catholic University of Leuven), Prof. Yoshitaka Oka (The University of Tokyo), Prof. Laura Conforti (University of Cincinnati), Prof. Antonio Felipe (University of Barcelona), Dr. Ameet Chimote (University of Cincinnati), Dr. Somodi Sándor (DE KK Sürgősségi Klinika), Dr. Krasznai Zoárd (DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika).

hajdu.peter.4_343_25

Végezetül, de nem utolsósorban köszönöm családom - feleségem és három gyermekem - szeretetteli hozzáállását, biztatását és megértését, mely nagymértékben támogatott az értekezés megírásában, valamint az azt megelőző tudományos karrier nyugodt felépítésében.

8. Közlemények

8.1 A PhD fokozat megszerzése előtti közlemények

Első és utolsó szerzős:

1. Hajdu, P., Varga, Z., Pieri, C., Panyi, G., Gáspár, R.: Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes.

Pflügers Arch. 445 (6), 674-682, 2003.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-002-0974-y>

IF: 2,063

2. Hajdu, P., Ulens, C., Panyi, G., Tytgat, J.: Drug- and mutagenesis-induced changes in the selectivity filter of a cardiac two-pore background K⁺ channel.

Cardiovasc. Res. 58 (1), 46-54, 2003.

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00831-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00831-3)

IF: 5,164

Társszerzős:

3. Batista, C. V. F., Gómez-Lagunas, F., Rodriguez de, I. V. R. C., Hajdu, P., Panyi, G., Gáspár, R., Possani, L. D.: Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁽⁺⁾-channels with distinctly different affinities.

Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom. 1601 (2), 123-131, 2002.

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00458-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00458-2)

4. Péter, M., Varga, Z., Hajdu, P., Gáspár, R., Damjanovich, S., Horjales, E., Possani, L. D., Panyi, G.: Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24.

J. Membr. Biol. 179 (1), 13-25, 2001.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002320010033>

IF: 2,787

5. Péter, M., Hajdu, P., Varga, Z., Damjanovich, S., Possani, L. D., Panyi, G., Gáspár, R.: Blockage of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 278 (1), 34-37, 2000.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3756>

IF: 3,055

6. Gesztelyi, R., Zsuga, J., Hajdu, P., Szabó, J. Z., Cseppentő, Á., Szentmiklósi, J. A.: Positive inotropic effect of the inhibition of cyclic GMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE2) on guinea pig left atria in eu- and hyperthyroidism.

Gen. Physiol. Biophys. 22 (4), 501-513, 2003.

IF: 0,794

A PhD értekezés előtti közlemények összesített impakt faktora: 13,863

8.2 Az értekezés alapját képező közlemények

Első és utolsó szerzős:

1. Hajdu, P., Martin, G. V., Chimote, A. A., Szilágyi, O., Takimoto, K., Conforti, L.: The C-terminus SH3-binding domain of Kv1.3 is required for the actin-mediated immobilization of the channel via cortactin.

Mol. Biol. Cell. 26 (9), 1640-1651, 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1195>

IF: 4,037

2. Hajdu, P., Chimote, A. A., Thompson, T. H., Koo, Y., Yun, Y., Conforti, L.:
Functionalized liposomes loaded with siRNAs targeting ion channels in effector memory T
cells as a potential therapy for autoimmunity.

Biomaterials. 34 (38), 10249-10257, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.019>

IF: 8,312

3. Kis-Tóth, K., Hajdu, P., Bacskai, I., Szilágyi, O., Papp, F., Szántó, A., Feketéné Posta, E.,
Gogolák, P., Panyi, G., Rajnavölgyi, É.: Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Maintains the
Membrane Potential and Regulates the Activation and Chemokine-Induced Migration of a
Monocyte-Derived Dendritic Cell Subset.

J. Immunol. 187 (3), 1273-1280, 2011.

DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003345>

IF: 5,788

4. 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: 6,208

5. 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

6. Balajthy, A., Somodi, S., Pethő, Z., Péter, M., Varga, Z., P. Szabó, G., Paragh, G., Vígh, L., Panyi, G., Hajdu, P.: 7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell function in Smith-Lemli-Opitz syndrome.

Pflügers Arch. 468 (8), 1403-1418, 2016.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-016-1851-4>

IF: 3,156

7. Somodi, S., Balajthy, A., Szilágyi, O., Pethő, Z., Harangi, M., Paragh, G., Panyi, G., Hajdu, P.: Analysis of the K⁺ current in human CD4⁺ T lymphocytes in hypercholesterolemic state.

Cell. Immunol. 281 (1), 20-26, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.004>

IF: 1,874

8. Szilágyi, O., Boratkó, A., Panyi, G., Hajdu, P.: The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse.

Pflugers Arch. 465 (9), 1341-1353, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1256-6>

IF: 3,073

9. Hajdu, P., Szilágyi, O., Tóth, Á., Krasznai, Z., Pocsai, K., Panyi, G.: Answer to the "comment on functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the

immunological synapse" by Stefan Bittner et al. [Immunol. Lett. 125 (Aug 15 (2)) (2009) 156-157].

Immunol. Lett. 129 (1), 47-49, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.12.026>

IF: -

10. Tóth, Á., Szilágyi, O., Krasznai, Z., Panyi, G., Hajdu, P.: Functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse.

Immunol. Lett. 125 (1), 15-21, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.05.004>

IF: 2,906

Társszerzős:

11. Balajthy, A., Hajdu, P., Panyi, G., Varga, Z.: Sterol Regulation of Voltage-Gated K⁺ Channels.

Current Topics In Membranes. 80, 255-292, 2017.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctm.2017.05.006>

IF: 3,514

12. Chimote, A. A., Hajdu, P., Kottyan, L. C., Harley, J. B., Yun, Y., Conforti, L.: Nanovesicle-targeted Kv1.3 knockdown in memory T cells suppresses CD40L expression and memory phenotype.

J. Autoimmun. 69, 86-93, 2016.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.03.004>

IF: 7,641

13. Giridharan, V., Yun, Y., Hajdu, P., Conforti, L., Collins, B., Jang, Y., Sankar, J.:
Microfluidic Platforms for Evaluation of Nanobiomaterials: a Review.

J. Nanom. 2012, 1-14, 2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/789841>

IF: 1,547

14. Varga, Z., Hajdu, P., Panyi, G.: Ion channels in T lymphocytes: an update on facts,
mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases.

Immunol. Lett. 130 (1-2), 19-25, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.12.015>

IF: 2,511

15. Zsíros, E., Kis-Tóth, K., Hajdu, P., Gáspár, R., Bielansk, J., Felipe, A., Rajnavölgyi, É.,
Panyi, G.: Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells.

J. Immunol. 183 (7), 4483-4492, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803003>

IF: 5,646

16. Varga, Z., Hajdu, P., Panyi, G., Gáspár, R., Krasznai, Z.: Involvement of membrane
channels in autoimmune disorders.

Curr. Pharm. Des. 13 (24), 2456-2468, 2007.

IF: 4,868

Az értekezéshez felhasznált közlemények összesített impakt faktora: 65,092

8.3 A PhD disszertációt követő egyéb közlemények

1. Jusstus V., Szöőr Á., Hajdu, P.: Role of CAR-T cell K⁺ channels in tumor infiltration and elimination.

The Journal of Immunology: Paper: vkaf084 , 10 p. (2025)

IF: 3.6

2. Medyouni G, Vörös O, Jusstus V, Panyi G, Vereb G, Szöőr Á, Hajdu P.: Inhibition of K⁺ Channels Affects the Target Cell Killing Potential of CAR T Cells.

Cancers (Basel). Nov 6;16(22):3750.

doi: 10.3390/cancers16223750.

IF: 4,5

3. Vishwakarma, G., Andrási, M., Szabó, R., Hajdu, P., Petrilla, V., Petrillová, M., Legath, J., Gáspár, A.: Analysis of intact venom proteins with capillary zone electrophoresis - mass spectrometry.

Microchem J. 200 1-8, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110290>

IF: 4,9

4. Jusstus, V.; Medyouni, G.; Bagosi, A.; Lampé, R.; Panyi, G.; Matolay, O.; Maka, E.; Krasznai, Z.T.; Vörös, O.; Hajdu, P. Activity of Potassium Channels in CD8⁺ T Lymphocytes: Diagnostic and Prognostic Biomarker in Ovarian Cancer?

Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 1949.

<https://doi.org/10.3390/ijms25041949>

IF: 4,9

5. Wai, D. C. C., Naseem, M. U., Mocsár, G., Babu Reddiar, S., Pan, Y., Csóti, Á., Hajdu, P., Nowell, C., Nicolazzo, J. A., Panyi, G., Norton, R. S.: A Fluorescent Peptide Toxin for Selective Visualization of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3.

Bioconjugate Chem. 33 (11), 2197-2212, 2022.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00436>

IF: 4,7

6. Borbásné Sebestyén, V., Nagy, É., Mocsár, G., Volkó, J., Szilágyi, O., Kenesei, Á., Panyi, G., Tóth, K. Á., Hajdu, P., Vámosi, G.: Role of C-Terminal Domain and Membrane Potential in the Mobility of Kv1.3 Channels in Immune Synapse Forming T Cells.

Int. J. Mol. Sci. 23 (6), 1-16, 2022.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23063313>

IF: 5,6

7. Tajti, G., Szántó, G. T., Csóti, Á., Rác, G., Evaristo, C., Hajdu, P., Panyi, G.: Immunomagnetic separation is a suitable method for electrophysiology and ion channel pharmacology studies on T cells.

Channels. 15 (1), 53-66, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2020.1859753>

IF: 3,493

8. Vallejo-Gracia, A., Sastre, D., Colomer-Molera, M., Solé, L., Navarro-Pérez, M., Capera, J., Roig, S. R., Pedrós-Gámez, O., Estadella, I., Szilágyi, O., Panyi, G., Hajdu, P., Felipe, A.: KCNE4-dependent functional consequences of Kv1.3-related leukocyte physiology.

Sci. Rep. 11 (1), 14632, 2021.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-94015-9>

IF: 4,996

9. Nemes, D., Kovács, R. L., Nagy, F., Tóth, Z., Herczegh, P., Borbás, A., Kelemen, V., Pfliegler, V. P., Rebenku, I., Hajdu, P., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Comparative biocompatibility and antimicrobial studies of sorbic acid derivatives.

Eur. J. Pharm. Sci. 143, 1-9, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105162>

IF: 4,384

10. Papp, F., Hajdu, P., Tajti, G., Tóth, Á., Nagy, É., Fazekas, Z., Kovács, S., Vámosi, G., Varga, Z., Panyi, G.: Periodic Membrane Potential and Ca²⁺ Oscillations in T Cells Forming an Immune Synapse.

Int. J. Mol. Sci. 21 (5), 1-19, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21051568>

IF: 5,924

11. Chimote, A. A., Balajthy, A., Arnold, M. J., Newton, H. S., Hajdu, P., Qualtieri, J., Wise-Draper, T., Conforti, L.: A defect in KCa3.1 channel activity limits the ability of CD8⁺ T cells from cancer patients to infiltrate an adenosine-rich microenvironment.

Sci. Signal. 11 (527), 1-12, 2018.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.aaq1616>

IF: 6,481

12. Chimote, A. A., Hajdu, P., Sfyris, A. M., Gleich, B. N., Wise-Draper, T., Casper, K. A., Conforti, L.: Kv1.3 Channels Mark Functionally Competent CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Cancer.

Cancer Res. 77 (1), 53-61, 2017.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2372>

IF: 9,13

13. Bartók, Á., Tóth, Á., Somodi, S., Szántó, G. T., Hajdu, P., Panyi, G., Varga, Z.: Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels.

Toxicon. 87, 6-16, 2014.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.002>

IF: 2,492

14. Izsépi, E., Himer, L., Szilágyi, O., Hajdu, P., Panyi, G., László, G., Matkó, J.: Membrane microdomain organization, calcium signal, and NFAT activation as an important axis in polarized Th cell function.

Cytometry A. 83 (2), 185-196, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22234>

IF: 3,066

15. Chimote, A. A., Hajdu, P., Kucher, V., Boiko, N., Kuras, Z., Szilágyi, O., Yun, Y., Conforti, L.: Selective Inhibition of KCa3.1 Channels Mediates Adenosine Regulation of the Motility of Human T Cells.

J. Immunol. 191 (12), 6273-6280, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1300702>

IF: 5,362

16. Somodi, S., Hajdu, P., Gáspár, R., Panyi, G., Varga, Z.: Effects of changes in extracellular pH and potassium concentration on Kv1.3 inactivation.

Eur. Biophys. J. 37 (7), 1145-1156, 2008.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-008-0267-2>

IF: 2,409

17. Hajdu, P., Ikemoto, T., Akazome, Y., Park, M. K., Oka, Y.: Terminal nerve gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones express multiple GnRH receptors in a teleost, the dwarf gourami (*Colisa lalia*).

J. Neuroendocrinol. 19 (6), 475-479, 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01553.x>

IF: 2,588

18. Rubovszky, B., Hajdu, P., Krasznai, Z., Gáspár, R., Waldmann, T. A., Damjanovich, S., Bene, L.: Detection of channel proximity by nanoparticle-assisted delaying of toxin binding: a combined patch-clamp and flow cytometric energy transfer study.

Eur. Biophys. J. 34 (2), 127-143, 2005.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-004-0436-x>

IF: 1,811

19. Hajas, G., Zsíros, E., László, T., Hajdu, P., Somodi, S., Réthi, B., Gogolák, P., Ludányi, K., Panyi, G., Rajnavölgyi, É.: New phenotypic, functional and electrophysiological characteristics of KG-1 cells.

Immunol. Lett. 92 (1-2), 97-106, 2004.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2003.11.021>

IF: 2,136

20. Somodi, S., Varga, Z., Hajdu, P., Starkus, J. G., Levy, D. I., Gáspár, R., Panyi, G.: pH-dependent modulation of Kv1.3 inactivation: role of His399.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 287 (4), C1067-C1076, 2004.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00438.2003>

IF: 3,939

Összesített impakt faktor: 86,412

8.4 Könyvfejezetek

1. Panyi Gy., Somodi S., Varga Z., Hajdú P., Pieri C., Pandi-Perumal S.R., Damjanovich S., Gáspár R. Pharmacological effects of melatonin on ion channels. In: Treatise on Pineal Gland and Melatonin, Ed.: Chandana Haldar et al., Oxford & IBH Publishing Co. (2002) pp. 489-506

8.5 Szerkesztői összefoglaló

1. Hajdu, P., Wulff, H., Niemeyer, B. A., Szabó, I.: Editorial: Ion Channels and Transporters in Ca²⁺-Dependent Functions of Lymphocytes.

Front. Physiol. 13, 1-3, 2022.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.962110>

8.6 Tudománymetriai adatok összefoglalása

Az összes közlemény impakt faktora: 165,367 Független hivatkozás: 706

9. Irodalomjegyzék

1. Catterall, W.A., *Sodium Channel Mutations and Epilepsy*, in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, J.L. Noebels, et al., Editors. 2012: Bethesda (MD).
2. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy, *The functional network of ion channels in T lymphocytes*. Immunological Reviews, 2009. **231**: p. 59-87.
3. Panyi, G., et al., *Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling*. Trends Immunol, 2004. **25**(11): p. 565-9.
4. DeCoursey, T.E., et al., *Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?* Nature, 1984. **307**(5950): p. 465-468.
5. Chandy, K.G., et al., *Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation*. J Exp Med, 1984. **160**(2): p. 369-85.
6. Matteson, D.R. and C. Deutsch, *K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion*. Nature, 1984. **307**(5950): p. 468-471.
7. Decoursey, T.E., et al., *Two types of potassium channels in murine T lymphocytes*. J Gen Physiol, 1987. **89**(3): p. 379-404.
8. Decoursey, T.E., et al., *Mitogen induction of ion channels in murine T lymphocytes*. J Gen Physiol, 1987. **89**(3): p. 405-20.
9. DeCoursey, T.E., et al., *Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages*. J Membr Biol, 1996. **152**(2): p. 141-57.
10. Kim, S.Y., M.R. Silver, and T.E. DeCoursey, *Ion channels in human THP-1 monocytes*. J Membr Biol, 1996. **152**(2): p. 117-30.
11. Feske, S., H. Wulff, and E.Y. Skolnik, *Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity*, in *Annual Review of Immunology Vol 33*, D.R. Littman and W.M. Yokoyama, Editors. 2015. p. 291-353.
12. Beeton, C., et al., *Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 936-44.
13. Wulff, H., et al., *The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS*. J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1703-13.
14. Wulff, H., C. Beeton, and K.G. Chandy, *Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003. **6**(5): p. 640-7.
15. Beeton, C. and K.G. Chandy, *Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis*. Neuroscientist, 2005. **11**(6): p. 550-62.
16. Hille, B., *Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches*. Biophys J, 1978. **22**(2): p. 283-94.
17. Deutsch, C., *The birth of a channel*. Neuron, 2003. **40**(2): p. 265-76.
18. Deutsch, C., *Potassium channel ontogeny*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 19-46.
19. 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.
20. Liman, E.R., et al., *Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel*. Nature, 1991. **353**(6346): p. 752-6.
21. 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.
22. 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.
23. 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.

24. 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.
25. 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.
26. Gong, J., et al., *Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2*. *Science*, 1999. **285**(5433): p. 1565-9.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Prakriya, M., et al., *Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel*. *Nature*, 2006. **443**(7108): p. 230-3.
31. 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.
32. 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).
33. Cai, X., et al., *The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(50): p. 25764-25775.
34. 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.
35. Hou, X., et al., *Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai*. *Science*, 2012. **338**(6112): p. 1308-13.
36. Yeung, P.S., M. Yamashita, and M. Prakriya, *Pore opening mechanism of CRAC channels*. *Cell Calcium*, 2017. **63**: p. 14-19.
37. 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.
38. Zhou, Y., et al., *The STIM-Orai coupling interface and gating of the Orai1 channel*. *Cell Calcium*, 2017. **63**: p. 8-13.
39. Feske, S., et al., *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 179-85.
40. Shuttleworth, T.J., *Orai3--the 'exceptional' Orai?* *J Physiol*, 2012. **590**(2): p. 241-57.
41. 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.
42. Trebak, M., *STIM/Orai signalling complexes in vascular smooth muscle*. *J Physiol*, 2012. **590**(17): p. 4201-8.
43. Motiani, R.K., et al., *Emerging roles of Orai3 in pathophysiology*. *Channels (Austin)*, 2013. **7**(5): p. 392-401.
44. Vaeth, M., et al., *Orai2 modulates store-operated calcium entry and T cell-mediated immunity*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 14714.
45. 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.
46. Moccia, F., et al., *Stim and Orai proteins in neuronal Ca(2+) signaling and excitability*. *Front Cell Neurosci*, 2015. **9**: p. 153.
47. 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.

48. 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.
49. Bird, G.S., et al., *STIM1 is a calcium sensor specialized for digital signaling*. Curr Biol, 2009. **19**(20): p. 1724-9.
50. Soboloff, J., et al., *STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry*. Curr Biol, 2006. **16**(14): p. 1465-70.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Soboloff, J., et al., *Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 20661-20665.
55. Picard, C., et al., *STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity*. N Engl J Med, 2009. **360**(19): p. 1971-80.
56. 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.
57. Feske, S., C. Picard, and A. Fischer, *Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1*. Clin Immunol, 2010. **135**(2): p. 169-82.
58. Lacruz, R.S. and S. Feske, *Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1356**: p. 45-79.
59. Lesage, F. and M. Lazdunski, *Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(5): p. F793-801.
60. Millar, J.A., et al., *A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3614-8.
61. Rajan, S., et al., *TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16650-7.
62. Morton, M.J., et al., *Determinants of pH sensing in the two-pore domain K(+) channels TASK-1 and -2*. Pflugers Arch, 2003. **445**(5): p. 577-83.
63. Duprat, F., et al., *TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH*. Embo J, 1997. **16**(17): p. 5464-71.
64. Kim, Y., H. Bang, and D. Kim, *TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9340-7.
65. Maingret, F., et al., *The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1*. Embo J, 2001. **20**(1-2): p. 47-54.
66. Fearon, I.M., et al., *GABA mediates autoreceptor feedback inhibition in the rat carotid body via presynaptic GABAB receptors and TASK-1*. J Physiol, 2003. **553**(Pt 1): p. 83-94.
67. Gurney, A.M., et al., *Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells*. Circ Res, 2003. **93**(10): p. 957-64.
68. Putzke, C., et al., *Differential effects of volatile and intravenous anesthetics on the activity of human TASK-1*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(4): p. C1319-26.
69. Aller, M.I., et al., *Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons*. J Neurosci, 2005. **25**(49): p. 11455-67.
70. Berg, A.P., et al., *Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits*. J Neurosci, 2004. **24**(30): p. 6693-702.
71. Veale, E.L., et al., *Identification of a region in the TASK3 two pore domain potassium channel that is critical for its blockade by methanandamide*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(5): p. 778-86.
72. Czirjak, G. and P. Enyedi, *Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5426-32.

73. Czirjak, G. and P. Enyedi, *Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(3): p. 646-52.
74. Kang, D., et al., *Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells*. J Physiol, 2004. **554**(Pt 1): p. 64-77.
75. Kim, D., et al., *Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 12): p. 2963-75.
76. Kim, H.I., et al., *Anandamide suppression of Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons*. Brain Res, 2005. **1062**(1-2): p. 39-47.
77. Zygmunt, P.M., et al., *Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide*. Nature, 1999. **400**(6743): p. 452-7.
78. Chemin, J., et al., *Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide*. Embo J, 2001. **20**(24): p. 7033-40.
79. Poling, J.S., et al., *Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K⁺ channels*. Neuropharmacology, 1996. **35**(7): p. 983-91.
80. Enyedi, P. and G. Czirjak, *Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels*. Physiol Rev, 2010. **90**(2): p. 559-605.
81. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., és Shlomchik, M.J., *Immunobiology, 5 edn*. 2001 New York: Garland Publishing.
82. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 17-58.
83. Caux, C., et al., *In vitro regulation of development and function of dendritic cells*. Hematol Cell Ther, 1996. **38**(5): p. 463.
84. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
85. Brigl, M. and M.B. Brenner, *CD1: antigen presentation and T cell function*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 817-90.
86. Manolova, V., et al., *Functional CD1a is stabilized by exogenous lipids*. Eur J Immunol, 2006. **36**(5): p. 1083-92.
87. Moody, D.B. and S.A. Porcelli, *Intracellular pathways of CD1 antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 11-22.
88. Caux, C., et al., *CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha*. Adv Exp Med Biol, 1997. **417**: p. 21-5.
89. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo*. Immunity, 1999. **11**(6): p. 753-61.
90. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
91. Gogolak, P., et al., *Differentiation of CD1a⁻ and CD1a⁺ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma*. Blood, 2007. **109**(2): p. 643-52.
92. Dubsky, P., et al., *Human dendritic cell subsets for vaccination*. J Clin Immunol, 2005. **25**(6): p. 551-72.
93. Poggi, A., A. Rubartelli, and M.R. Zocchi, *Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7205-9.
94. Liu, Q.H., et al., *Expression and a role of functionally coupled P2Y receptors in human dendritic cells*. FEBS Lett, 1999. **445**(2-3): p. 402-8.
95. Hsu, S., et al., *Fundamental Ca²⁺ signaling mechanisms in mouse dendritic cells: CRAC is the major Ca²⁺ entry pathway*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6126-33.
96. O'Connell, P.J., V.A. Klyachko, and G.P. Ahern, *Identification of functional type 1 ryanodine receptors in mouse dendritic cells*. FEBS Lett, 2002. **512**(1-3): p. 67-70.

97. Matzner, N., et al., *Ion channels modulating mouse dendritic cell functions*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6803-9.
98. Black, J.A., S. Liu, and S.G. Waxman, *Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia*. Glia, 2009. **57**(10): p. 1072-81.
99. Craner, M.J., et al., *Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS*. Glia, 2005. **49**(2): p. 220-9.
100. Catterall, W.A., et al., *Structure and biosynthesis of neuronal sodium channels*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **479**: p. 186-203.
101. Isom, L.L., et al., *Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel*. Science, 1992. **256**(5058): p. 839-42.
102. Goldin, A.L., et al., *Nomenclature of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 365-8.
103. Catterall, W.A., *Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 11): p. 2577-89.
104. Zsiros, E., et al., *Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4483-92.
105. Sangameswaran, L., et al., *A novel tetrodotoxin-sensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14805-9.
106. Rush, A.M., et al., *Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia*. J Physiol, 1998. **511** (Pt 3): p. 771-89.
107. Klugbauer, N., et al., *Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells*. Embo J, 1995. **14**(6): p. 1084-90.
108. Cummins, T.R., J.R. Howe, and S.G. Waxman, *Slow closed-state inactivation: a novel mechanism underlying ramp currents in cells expressing the hNE/PN1 sodium channel*. J Neurosci, 1998. **18**(23): p. 9607-19.
109. Waxman, S.G., *Neurobiology: a channel sets the gain on pain*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 831-2.
110. Drenth, J.P. and S.G. Waxman, *Mutations in sodium-channel gene SCN9A cause a spectrum of human genetic pain disorders*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3603-9.
111. Nassar, M.A., et al., *Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12706-11.
112. Laniado, M.E., et al., *Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro*. Am J Pathol, 1997. **150**(4): p. 1213-21.
113. Dustin, M.L., *The immunological synapse*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S119-25.
114. Cemerski, S. and A. Shaw, *Immune synapses in T-cell activation*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 298-304.
115. 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.
116. Huang, Y. and J.K. Burkhardt, *T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 5): p. 723-30.
117. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 973-83.
118. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
119. 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.
120. Brossard, C., et al., *Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1741-53.

121. Espagnol, 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.
122. Fooksman, D.R., et al., *Functional anatomy of T cell activation and synapse formation*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 79-105.
123. Panyi, G., et al., *Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2592-7.
124. 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.
125. Beeton, C., et al., *Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(46): p. 17414-9.
126. 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.
127. Rus, H., et al., *The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(31): p. 11094-9.
128. 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.
129. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy, *The functional network of ion channels in T lymphocytes*. *Immunol Rev*, 2009. **231**(1): p. 59-87.
130. de Mendoza, A., H. Suga, and I. Ruiz-Trillo, *Evolution of the MAGUK protein gene family in premetazoan lineages*. *BMC Evol Biol*, 2010. **10**: p. 93.
131. Oliva, C., et al., *Role of the MAGUK protein family in synapse formation and function*. *Dev Neurobiol*, 2012. **72**(1): p. 57-72.
132. Deng, F., et al., *Stargazin and other transmembrane AMPA receptor regulating proteins interact with synaptic scaffolding protein MAGI-2 in brain*. *J Neurosci*, 2006. **26**(30): p. 7875-84.
133. Gosens, I., et al., *MPP1 links the Usher protein network and the Crumbs protein complex in the retina*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(16): p. 1993-2003.
134. Jing-Ping, Z., et al., *p55 protein is a member of PSD scaffold proteins in the rat brain and interacts with various PSD proteins*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005. **135**(1-2): p. 204-16.
135. Laura, R.P., et al., *MAGI-1: a widely expressed, alternatively spliced tight junction protein*. *Exp Cell Res*, 2002. **275**(2): p. 155-70.
136. Wolburg, H. and A. Lippoldt, *Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation*. *Vascul Pharmacol*, 2002. **38**(6): p. 323-37.
137. McAllister-Lucas, L.M., et al., *The CARMA3-Bcl10-MALT1 signalosome promotes angiotensin II-dependent vascular inflammation and atherogenesis*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(34): p. 25880-4.
138. Muller, B.M., et al., *Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein*. *J Neurosci*, 1995. **15**(3 Pt 2): p. 2354-66.
139. 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.
140. 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.
141. Wu, H., et al., *Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP*. 2000. **19**(21): p. 5740-5751.
142. 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.

143. 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.
144. Kim, E., et al., *GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules*. J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 669-78.
145. Xavier, R., et al., *Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation*. J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 173-178.
146. Dustin, M.L., *Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses*. Current Opinion in Cell Biology, 2007. **19**(5): p. 529-533.
147. Dushek, O., et al., *Effects of Intracellular Calcium and Actin Cytoskeleton on TCR Mobility Measured by Fluorescence Recovery*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3913.
148. Babich, A., et al., *F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLCgamma1 signaling during T cell activation*. J Cell Biol, 2012. **197**(6): p. 775-87.
149. Imamura, F., et al., *Ligand Binding of the Second PDZ Domain Regulates Clustering of PSD-95 with the Kv1.4 Potassium Channel*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(5): p. 3640-3646.
150. Marks, D.R. and D.A. Fadool, *Post-synaptic density perturbs insulin-induced Kv1.3 channel modulation via a clustering mechanism involving the SH3 domain*. J Neurochem, 2007. **103**(4): p. 1608-27.
151. Doczi, M.A., D.H. Damon, and A.D. Morielli, *A C-terminal PDZ binding domain modulates the function and localization of Kv1.3 channels*. Experimental Cell Research, 2011. **317**(16): p. 2333-2341.
152. Shin, H., et al., *An Intramolecular Interaction between Src Homology 3 Domain and Guanylate Kinase-Like Domain Required for Channel Clustering by Postsynaptic Density-95/SAP90*. The Journal of Neuroscience, 2000. **20**(10): p. 3580-3587.
153. Daly, R.J., *Cortactin signalling and dynamic actin networks*. Biochem. J., 2004. **382**(1): p. 13-25.
154. Carrizosa, E., et al., *Hematopoietic Lineage Cell-Specific Protein 1 Is Recruited to the Immunological Synapse by IL-2-Inducible T Cell Kinase and Regulates Phospholipase Cy1 Microcluster Dynamics during T Cell Spreading*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(11): p. 7352-7361.
155. Chen, Y.M., et al., *Antibody profile of early HTLV-I infection*. Lancet, 1990. **336**(8725): p. 1214-6.
156. Gomez, T.S., et al., *HS1 functions as an essential actin-regulatory adaptor protein at the immune synapse*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 741-52.
157. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
158. Simons, K. and J.L. Sampaio, *Membrane organization and lipid rafts*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(10): p. a004697.
159. Miceli, M.C., et al., *Co-stimulation and counter-stimulation: lipid raft clustering controls TCR signaling and functional outcomes*. Semin Immunol, 2001. **13**(2): p. 115-28.
160. Suzuki, T., *Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density*. Neurosci Res, 2002. **44**(1): p. 1-9.
161. Allen, J.A., R.A. Halverson-Tamboli, and M.M. Rasenick, *Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(2): p. 128-40.
162. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
163. Kabouridis, P.S., et al., *Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes*. Eur J Immunol, 2000. **30**(3): p. 954-63.
164. Pottosin, II, et al., *Methyl-beta-cyclodextrin reversibly alters the gating of lipid raft-associated Kv1.3 channels in Jurkat T lymphocytes*. Pflugers Arch, 2007. **454**(2): p. 235-44.

165. Bock, J., et al., *Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **305**(4): p. 890-7.
166. Maguy, A., T.E. Hebert, and S. Nattel, *Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(4): p. 798-807.
167. Martens, J.R., K. O'Connell, and M. Tamkun, *Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts*. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. **25**(1): p. 16-21.
168. Levitan, I., D.K. Singh, and A. Rosenhouse-Dantsker, *Cholesterol binding to ion channels*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 65.
169. Levitan, I., et al., *Cholesterol and ion channels*. *Subcell Biochem*, 2010. **51**: p. 509-49.
170. Bolotina, V., et al., *Variations of membrane cholesterol alter the kinetics of Ca²⁺-dependent K⁺ channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells*. *Pflugers Arch*, 1989. **415**(3): p. 262-8.
171. Wu, C.C., et al., *The effect of hypercholesterolemia on the sodium inward currents in cardiac myocyte*. *J Mol Cell Cardiol*, 1995. **27**(6): p. 1263-9.
172. Toselli, M., et al., *Caveolin-1 expression and membrane cholesterol content modulate N-type calcium channel activity in NG108-15 cells*. *Biophys J*, 2005. **89**(4): p. 2443-57.
173. Lockwich, T.P., et al., *Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(16): p. 11934-42.
174. Balijepalli, R.C., et al., *Localization of cardiac L-type Ca²⁺ channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(19): p. 7500-5.
175. Martens, J.R., et al., *Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(11): p. 7443-6.
176. Hajdu, P., et al., *Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes*. *Pflugers Arch*, 2003. **445**(6): p. 674-82.
177. Barrantes, F.J., *Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004. **47**(1-3): p. 71-95.
178. Marsh, D. and F.J. Barrantes, *Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **75**(9): p. 4329-33.
179. Tombola, F., M.M. Pathak, and E.Y. Isacoff, *How does voltage open an ion channel?* *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006. **22**: p. 23-52.
180. Robinson, L.E., et al., *Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(46): p. 31983-94.
181. Singh, A.K., et al., *Multiple cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motifs in cytosolic C tail of Slo1 subunit determine cholesterol sensitivity of Ca²⁺- and voltage-gated K⁺ (BK) channels*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(24): p. 20509-21.
182. Epanand, R.M., *Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains*. *Prog Lipid Res*, 2006. **45**(4): p. 279-94.
183. Fantini, J. and F.J. Barrantes, *How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 31.
184. Li, H. and V. Papadopoulos, *Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern*. *Endocrinology*, 1998. **139**(12): p. 4991-7.
185. Picazo-Juarez, G., et al., *Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(28): p. 24966-76.
186. Andersen, O.S. and R.E. Koeppe, 2nd, *Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2007. **36**: p. 107-30.
187. Lundbaek, J.A., et al., *Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: the importance of hydrophobic coupling. Effects of Micelle-forming amphiphiles and cholesterol*. *J Gen Physiol*, 2004. **123**(5): p. 599-621.

188. Fattal, D.R. and A. Ben-Shaul, *A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch*. *Biophys J*, 1993. **65**(5): p. 1795-809.
189. Lundbaek, J.A., et al., *Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes*. *J R Soc Interface*, 2010. **7**(44): p. 373-95.
190. An, H., et al., *Material properties of lipid microdomains: force-volume imaging study of the effect of cholesterol on lipid microdomain rigidity*. *Biophys J*, 2010. **99**(3): p. 834-44.
191. Nezil, F.A. and M. Bloom, *Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes*. *Biophys J*, 1992. **61**(5): p. 1176-83.
192. Cahalan, M.D., et al., *A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes*. *J Physiol*, 1985. **358**: p. 197-237.
193. Demel, R.A., K.R. Bruckdorfer, and L.L. van Deenen, *Structural requirements of sterols for the interaction with lecithin at the air water interface*. *Biochim Biophys Acta*, 1972. **255**(1): p. 311-20.
194. Xu, X. and E. London, *The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation*. *Biochemistry*, 2000. **39**(5): p. 843-9.
195. Romanenko, V.G., G.H. Rothblat, and I. Levitan, *Modulation of endothelial inward-rectifier K⁺ current by optical isomers of cholesterol*. *Biophys J*, 2002. **83**(6): p. 3211-22.
196. Bukiya, A.N., et al., *Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol-channel protein interactions*. *J Gen Physiol*, 2011. **137**(1): p. 93-110.
197. Romanenko, V.G., G.H. Rothblat, and I. Levitan, *Sensitivity of volume-regulated anion current to cholesterol structural analogues*. *J Gen Physiol*, 2004. **123**(1): p. 77-87.
198. Popot, J.L., et al., *Interaction of the acetylcholine (nicotinic) receptor protein from *Torpedo marmorata* electric organ with monolayers of pure lipids*. *Eur J Biochem*, 1978. **85**(1): p. 27-42.
199. Porter, F.D. and G.E. Herman, *Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis*. *J Lipid Res*, 2011. **52**(1): p. 6-34.
200. Smith, D.W., L. Lemli, and J.M. Opitz, *A Newly Recognized Syndrome of Multiple Congenital Anomalies*. *J Pediatr*, 1964. **64**: p. 210-7.
201. Amberger, J., et al., *McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(Database issue): p. D793-6.
202. Tint, G.S., et al., *Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(2): p. 107-13.
203. Irons, M., et al., *Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. *Lancet*, 1993. **341**(8857): p. 1414.
204. Corso, G., et al., *Sterol profiles in plasma and erythrocyte membranes in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome: a six-year experience*. *Clin Chem Lab Med*, 2011. **49**(12): p. 2039-46.
205. Porter, F.D., *Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management*. *Eur J Hum Genet*, 2008. **16**(5): p. 535-41.
206. Witsch-Baumgartner, M. and B. Lanthaler, *Birthday of a syndrome: 50 years anniversary of Smith-Lemli-Opitz Syndrome*. *Eur J Hum Genet*, 2015. **23**(3): p. 277-8.
207. Elias, E.R., et al., *Clinical effects of cholesterol supplementation in six patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS)*. *Am J Med Genet*, 1997. **68**(3): p. 305-10.
208. Haas, D., et al., *Effects of cholesterol and simvastatin treatment in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS)*. *J Inher Metab Dis*, 2007. **30**(3): p. 375-87.
209. Tierney, E., et al., *Analysis of short-term behavioral effects of dietary cholesterol supplementation in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. *Am J Med Genet A*, 2010. **152A**(1): p. 91-5.
210. Sikora, D.M., et al., *Cholesterol supplementation does not improve developmental progress in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. *J Pediatr*, 2004. **144**(6): p. 783-91.
211. Abbas, A.K., et al., *Robbins basic pathology*. 9th ed. 2013, Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. xii, 910 p.
212. Moreno, P.R., *Pathophysiology of plaque disruption and thrombosis in acute ischemic syndromes*. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2001. **10**(2 Pt 2): p. 2-9.

213. Leys, D., *Atherothrombosis: a major health burden*. Cerebrovasc Dis, 2001. **11 Suppl 2**: p. 1-4.
214. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report*. Circulation, 2002. **106**(25): p. 3143-421.
215. Matsuura, E., et al., *Is atherosclerosis an autoimmune disease?* BMC Med, 2014. **12**: p. 47.
216. Andersson, J., P. Libby, and G.K. Hansson, *Adaptive immunity and atherosclerosis*. Clin Immunol, 2010. **134**(1): p. 33-46.
217. Legein, B., et al., *Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(20): p. 3847-69.
218. Witztum, J.L. and A.H. Lichtman, *The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 73-102.
219. Stemme, S., et al., *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3893-7.
220. Hansson, G.K., J. Holm, and L. Jonasson, *Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque*. Am J Pathol, 1989. **135**(1): p. 169-75.
221. Roselaar, S.E., P.X. Kakkanathu, and A. Daugherty, *Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE -/- and LDL receptor -/- mice. Decreasing density with disease progression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(8): p. 1013-8.
222. Emeson, E.E., et al., *Inhibition of atherosclerosis in CD4 T-cell-ablated and nude (nu/nu) C57BL/6 hyperlipidemic mice*. Am J Pathol, 1996. **149**(2): p. 675-85.
223. Zhou, X., et al., *Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 2919-22.
224. Martens, G.W., et al., *Hypercholesterolemia impairs immunity to tuberculosis*. Infect Immun, 2008. **76**(8): p. 3464-72.
225. Lei, L., et al., *Hyperlipidemia impaired innate immune response to periodontal pathogen porphyromonas gingivalis in apolipoprotein E knockout mice*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71849.
226. Seres, I., et al., *Alteration of lymphocyte membrane phospholipids and intracellular free calcium concentrations in hyperlipidemic subjects*. Atherosclerosis, 1996. **121**(2): p. 175-83.
227. Heaps, C.L., D.L. Tharp, and D.K. Bowles, *Hypercholesterolemia abolishes voltage-dependent K⁺ channel contribution to adenosine-mediated relaxation in porcine coronary arterioles*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(2): p. H568-76.
228. Jiang, J., et al., *Enhanced phenylephrine-induced rhythmic activity in the atherosclerotic mouse aorta via an increase in opening of K_{Ca} channels: relation to K_v channels and nitric oxide*. Br J Pharmacol, 1999. **128**(3): p. 637-46.
229. 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.
230. 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.
231. Nicolaou, S.A., et al., *Differential calcium signaling and Kv1.3 trafficking to the immunological synapse in systemic lupus erythematosus*. Cell Calcium, 2010. **47**(1): p. 19-28.
232. Pennington, M.W., et al., *Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone*. Int J Pept Protein Res, 1995. **46**(5): p. 354-8.
233. Grissmer, S., A.N. Nguyen, and M.D. Cahalan, *Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology*. J Gen Physiol, 1993. **102**(4): p. 601-30.
234. Baba, Y., et al., *Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16704-9.

235. Lyons, A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 147-54.
236. Hajdu, P., et al., *Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes*. Pflugers Arch, 2003. **445**(6): p. 674-682.
237. Feske, S., H. Wulff, and E.Y. Skolnik, *Ion channels in innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 291-353.
238. Rentero, C., et al., *Functional implications of plasma membrane condensation for T cell activation*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2262.
239. Wang, F., et al., *Inhibition of T cell receptor signaling by cholesterol sulfate, a naturally occurring derivative of membrane cholesterol*. Nat Immunol, 2016. **17**(7): p. 844-50.
240. Batta, A.K., et al., *Identification of 8-dehydrocholesterol (cholesta-5,8-dien-3 beta-ol) in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Lipid Res, 1995. **36**(4): p. 705-13.
241. Tulenko, T.N., et al., *A membrane defect in the pathogenesis of the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Lipid Res, 2006. **47**(1): p. 134-43.
242. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
243. Ren, G., et al., *Alterations in membrane caveolae and BKCa channel activity in skin fibroblasts in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Mol Genet Metab, 2011. **104**(3): p. 346-55.
244. Derler, I., et al., *Cholesterol modulates Orai1 channel function*. Sci Signal, 2016. **9**(412): p. ra10.
245. Pacheco, J., et al., *A cholesterol-binding domain in STIM1 modulates STIM1-Orai1 physical and functional interactions*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29634.
246. Fernandez, C., et al., *Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression*. J Lipid Res, 2005. **46**(5): p. 920-9.
247. Moog, C., et al., *Studies on the immunosuppressive properties of 7,25 dihydroxycholesterol--II. Effects on early steps of T-cell activation*. Int J Immunopharmacol, 1989. **11**(5): p. 559-65.
248. Xu, L., et al., *7-Dehydrocholesterol-derived oxysterols and retinal degeneration in a rat model of Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(6): p. 877-83.
249. Babovic-Vuksanovic, D., et al., *Selective antibody immune deficiency in a patient with Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Inherit Metab Dis, 2005. **28**(2): p. 181-6.
250. Beby-Defaux, A., et al., *Fatal adenovirus type 7b infection in a child with Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Med Virol, 2001. **65**(1): p. 66-9.
251. Hattan, D., et al., *Tyrosine phosphorylation of Kv1.2 modulates its interaction with the actin-binding protein cortactin*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38596-606.
252. Tian, L., et al., *A noncanonical SH3 domain binding motif links BK channels to the actin cytoskeleton via the SH3 adapter cortactin*. FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2588-90.
253. 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.
254. Cheng, L., et al., *Cortactin Is Required for N-cadherin Regulation of Kv1.5 Channel Function*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(23): p. 20478-20489.
255. Ilatovskaya, D.V., et al., *Cortical actin binding protein cortactin mediates ENaC activity via Arp2/3 complex*. The FASEB Journal, 2011. **25**(8): p. 2688-2699.
256. 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.
257. 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.
258. Zhu, J., et al., *Heteromeric Kv1 Potassium Channel Expression: AMINO ACID DETERMINANTS INVOLVED IN PROCESSING AND TRAFFICKING TO THE CELL SURFACE*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(28): p. 25558-25567.
259. Soderberg, O., et al., *Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation*. Nat Meth, 2006. **3**(12): p. 995-1000.

260. Bubb, M.R., et al., *Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin*. J Biol Chem, 1994. **269**(21): p. 14869-71.
261. Bubb, M.R., et al., *Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 5163-70.
262. 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.
263. 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.
264. 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.
265. 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.
266. 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.
267. Butorac, C., et al., *A novel STIM1-Orai1 gating interface essential for CRAC channel activation*. Cell Calcium, 2019. **79**: p. 57-67.
268. 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.
269. 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.
270. 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.
271. 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.
272. 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.
273. MacKinnon, R. and G. Yellen, *Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels*. Science, 1990. **250**(4978): p. 276-9.
274. 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.
275. Bezanilla, F., *The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels*. 2000. **80**(2): p. 555-592.
276. 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.
277. 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.
278. 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.
279. 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.
280. 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.
281. Eil, R., et al., *Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function*. Nature, 2016. **537**(7621): p. 539-543.
282. Loughrey, H., M.B. Bally, and P.R. Cullis, *A non-covalent method of attaching antibodies to liposomes*. Biochim Biophys Acta, 1987. **901**(1): p. 157-60.
283. Chimote, A.A., Z. Kuras, and L. Conforti, *Disruption of kv1.3 channel forward vesicular trafficking by hypoxia in human T lymphocytes*. J Biol Chem, 2012. **287**(3): p. 2055-67.

284. Kuras, Z., et al., *Modulation of Kv1.3 channels by protein kinase A I in T lymphocytes is mediated by the disc large 1-tyrosine kinase Lck complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(10): p. C1504-12.
285. Beeton, C., et al., *Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases*. Molecular Pharmacology, 2005. **67**(4): p. 1369-1381.
286. Kyttaris, V.C., et al., *Increased levels of NF-ATc2 differentially regulate CD154 and IL-2 genes in T cells from patients with systemic lupus erythematosus*. Journal of Immunology, 2007. **178**(3): p. 1960-1966.
287. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes & Development, 2003. **17**(18): p. 2205-2232.
288. Gwack, Y., et al., *Signalling to transcription: Store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes*. Cell Calcium, 2007. **42**(2): p. 145-156.
289. Koshy, M., D. Berger, and M.K. Crow, *Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(3): p. 826-837.
290. Treiman, M., C. Caspersen, and S.B. Christensen, *A tool coming of age:: thapsigargin as an inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases*. Trends in Pharmacological Sciences, 1998. **19**(4): p. 131-135.
291. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-712.
292. Connolly, S.F. and D.J. Kusner, *The regulation of dendritic cell function by calcium-signaling and its inhibition by microbial pathogens*. Immunol Res, 2007. **39**(1-3): p. 115-27.