

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai kar, Biokémiai és Molekuláris
Biológiai Tanszék

Általános Orvostudományi Kar, I.sz. Belgyógyászati Klinika



37. OTDK

Biológia Szekció

2025 tavasz

Az E-syt1 funkciójának tanulmányozása az intracelluláris cAMP és Ca^{2+} jelátvitel összefüggéseiben

Barnai Szintia

biológus BSc III. évfolyam

Témavezetők: Dr. Kúthy-Sutus Enikő - tudományos munkatárs
Dr. Maléth József - tudományos főmunkatárs

Belső konzulens: Dr. Huliák Ildikó - adjunktus, oktatási felelős

Szeged, 2025

Tartalmi összefoglaló

A kalciumion (Ca^{2+}) létfontosságú szerepet tölt be a sejtek normál működésének és szabályozásának fenntartásában (Li és mtsai., 2014). Ez az ion egy kulcsfontosságú hírvivő molekula, amely a sejtek belső és külső környezetének állapotáról ad információt, koncentrációjában bekövetkező változása révén. Ezeket változásokat speciális Ca^{2+} -kötő fehérjék érzékelik, így fenntartva az egyensúlyt a kalcium (Ca^{2+}) homeosztázisában (M. Hofer, 2012). Homeosztázisának és a vele szoros kölcsönhatásban lévő intracelluláris cAMP egyensúlyának felborulása, súlyos patofiziológiai következményekkel járhat, mint például a hasnyálmirigy gyulladás. Bár napjaink egyik leggyakrabban előforduló súlyos betegsége, pontos patomechanizmusa még nem teljesen tisztázott (Li és mtsai., 2014).

Az intracelluláris Ca^{2+} -emelkedés, amelyet például a hasnyálmirigyben lévő toxinok (pl. epesavak) vagy megnövekedett nyomás okozhat, az ORAI1-csatornákon keresztüli Ca^{2+} -beáramlását eredményezi. Ezt a mechanizmust raktárfüggő Ca^{2+} beáramlás (Store -Operated Calcium Entry, rövidítve SOCE) néven ismerjük (Pallagi és mtsai., 2020). Emellett a Ca^{2+} részt vesz ellentétes sejtfunciók szabályozásában, amit úgy ér el, hogy az iniciátorokat és modulátorokat specifikus membránterületekhez, például lipid raftokhoz, az endoplazmatikus retikulumhoz (ER) és más organelumok szoros érintkezési helyeihez (Membrane Contact Sites, rövidítve MCS) kötik. Ezért MCS-ek kulcsszerepet játszanak a sejten belüli jelátvitel és a sejtfunciók szabályozásában (Crul & Maléth, 2021). Az ER–PM membrán érintkezési helyek (MCS) kulcsfontosságúak a raktárfüggő Ca^{2+} beáramlásban (SOCE) szempontjából is, amely az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásaira reagál (Herdman & Moss, 2016).

Ezen ER-PM érintkezési helyek kialakításában vesznek részt, bizonyos Extended szinaptotagmin fehérjék. Az Extended-synaptotagminok (E-syts) olyan fehérjék, amelyek az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában helyezkednek el, és szerepet játszanak a sejtek Ca^{2+} homeosztázisában, valamint az endoplazmatikus retikulum (ER) és a plazmamembrán (PM) közötti kapcsolatok kialakításában. A Ca^{2+} ionok a C2 doméneken keresztül kapcsolódnak az E-syt-hez, ami megváltoztatja a fehérje konformációját, ezzel befolyásolva a Ca^{2+} raktárfüggő Ca^{2+} beáramlást (SOCE). A SOCE több szinten is interakcióban áll a cAMP jelátvitellel, azonban az E-syt szerepe ebben az esetben még nem teljesen tisztázott. Kutatásunk célja annak feltárása volt, hogy az E-syt részt vesznek-e a cAMP szabályozásában, és ha igen, milyen mechanizmusok révén.

Kísérleteinket epitél eredetű E-syt1-3 tripla knock out (TKO) HeLa sejtvonalakon végeztük, amelyek nem expresszálnak egyetlen E-syt izoformát sem. A sejteket vad típusú, valamint az E-syt1 Ca^{2+} -kötő (C2A, C2C) és fehérjetranszport (SMP) doménekben mutáns plazmidokkal transzfektáltuk. Az intracelluláris cAMP szintet Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) technikával mértük.

A FRET kísérletek során 10 μM ciklopiazon sav (CPA) indukálta Ca^{2+} kiáramlást követően magasabb intracelluláris cAMP szintet figyeltünk meg az E-syt1-C2A/C2C vagy E-syt1-SMP mutánsok esetében. Az E-syt1 az ER-PM kapcsolódási pontok gyűrűs szerkezetbe való átalakításával növeli stabilitásukat, és elősegíti az ER Ca^{2+} raktár gyors feltöltését, majd az ER-PM kapcsolatok megszűnését. Immunfluoreszcens festések alapján, indukció nélkül és 10 μM CPA indukcióját követően, E-syt hiányában, valamint a C2A/C2C/SMP domének mutációja esetén a STIM1/ORAI1 fehérjék spontán aktiválódnak és ER-PM fókuszokat hoznak létre.

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az E-syt1 a Ca^{2+} -kötő és fehérjetranszport doménjein keresztül Ca^{2+} -függő módon hozzájárul az intracelluláris cAMP szint szabályozásához, valószínűleg a STIM1/ORAI1 fehérjék aktiválásán és az ER-PM kapcsolatok stabilizálásán keresztül.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	4
Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Bevezető.....	7
2.1 A hasnyálmirigy felépítése és funkciói	7
2.2 A hasnyálmirigy betegségei.....	7
2.2.1 Akut hasnyálmirigy gyulladás	8
2.2.2 Krónikus hasnyálmirigy gyulladás	9
2.2.3 Hasnyálmirigy tumoros megbetegedései	9
2.3 Az ER stressz, cAMP jelátvitel és a Ca^{2+} homeosztázis szerepe a hasnyálmirigy sejtekben	10
2.4 ORAI1 és STIM1 fehérjék szerepe a Ca^{2+} homeosztázisban	12
2.5 A kiterjesztett szinaptotagmin fehérjék (E-syt – Extended Synaptotagmin) és szerepük a sejtek homeosztázisában.....	12
2. Célkitűzések	14
3. Anyagok és módszerek	15
4.1 Sejtek fenntartása és szaporítása.....	15
4.2 Sejtek olvasztása és fagyasztása	15
4.3 TKO HeLa sejtek transzfekciója	16
4.4 CPA(Ciklopiazonsav) kezelés	18
4.5 Immunfestés.....	18
4.6 FRET (Förster Resonance Energy Transfer) mérés	19
4.7 Kiértékelés, statisztika	19
4. Eredmények és értékelésük:.....	20
5.1 E-syt TKO HeLa sejt vonal validálása	20
5.2 E-syt1 transzfekciós plazmidok tesztelése	21
5.3 Az E-syt1 Ca^{2+} kötő és SMP domének mutációjának hatása a sejtmembrán közelében kialakuló cAMP szintre	22
5.4 Az E-syt1 Ca^{2+} kötő és SMP domének mutációjának hatása a citoplazmatikus cAMP szintre.....	24
5.5 A STIM1 és Orail fehérjék kifejeződésének vizsgálata TKO Hela sejtekben.....	26

6.Összefoglalás.....	27
7.Köszönetnyilvánítás	28
8.Függelék	29
9.Irodalomjegyzék.....	31

Rövidítések jegyzéke

AC: Adenilát-cikláz	Syt: Synaptotagmin
ADM: Acinoduktális metapláziának	TM: Transzmembrán
AP: Akut pankreatitisz	TNF-α: Tumor nekrosis faktor α
ATP: Adenozin-trifoszfát	T1D: 1-es típusú cukorbetegség
Ca²⁺: Kalcium ion	T2D: 2-es típusú cukorbetegség
cAMP: Ciklikus adenin-monofoszfát	TP53: Tumor protein 53
CDKN2A/p16: Ciklin-függő kináz inhibitor 2A	Tbc: Trikarbinok
CO₂: Szén-dioxid	TKO HeLa: Tripla knock-out HeLa sejt vonal
CPA: Ciklopiázonsav	
CP: Krónikus pankreatitisz	
CFTR: Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor	
DAG: Diacilglicerol	
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenil-indol	
DPBS: Dulbecco's foszfáttal bufferolt sóoldat	
ER: Endoplazmatikus retikulum	
E-syt: Extended szinaptotagmin	
FRET: Förster Resonance Energy Transfer	
GFP: Zöld fluoreszcens fehérje	
GLUT4: Glükóztanszporter 4	
IL: Interleukin	
IPMN: Intraduktális papilláris mucinózus neopláziák	
KRAS: Kristen patkány szarkóma vírusa	
MCS: membrán érintkezési helyek	
ORAI1: Kalcium felszabadulás-aktivált kalcium csatorna fehérje 1	
PDAC: Duktális adenokarcinóma	
PaIN: Hasnyálmirigy intraepiteliális neopláziák	
PM: Plazmamembrán	
PI (4,5) P2: Foszfátidilinozitol-4,5-biszfoszfát	
PI4P: Foszfátidilinozitol-4-foszfát	
PBS: Foszfáttal bufferolt sóoldat	
PFA: Paraformaldehid	
UPR: Unfolded fehérje válasz	
RT: Szobahőmérséklet	
SCID: Örökletes súlyos kombinált immunhiányos szindróma	
SIRS: Szisztémás gyulladásos válasz szindróma	
SERCA: Szarkoplazmatikus retikulum Ca ²⁺ -ATPáz	
SOCE: Raktár függő Ca ²⁺ beáramlás	
STIM1: Stromális interakciós molekula 1	
SMAD4: SMAD család protein 4	
STIM1: Strómális interakciós molekula 1	

1. Bevezető

A hasnyálmirigy egy létfontosságú, összetett szerv, mely az emésztőrendszer, valamint a hormontermelés egyik kulcsszereplője. Élettani szerepe a vele kapcsolatos betegségekkel mai napig nem teljesen ismert, emiatt érdekes kutatási terület az orvoslás tudományban.

2.1 A hasnyálmirigy felépítése és funkciói

A hasnyálmirigy a hasüreg hátsó falán helyezkedik el a gerinc előtt. Négy fő részre tagolható: fejre, nyakra, testre és farokra. A fejrésze a vena cava inferior és a vesevénák szomszédságában található, és a duodenum C alakú kanyarulata öleli körül. A farok rész egészen a lépig nyúlik el (Talathi és mtsai., 2024). Kétféle funkcióját különböztetjük meg: 1. az exokrin funkciója emésztőenzimeket termel, amelyek a tápanyagok lebontásában játszanak szerepet (pl. szénhidrátok, fehérjék és zsírok, 2. az endokrin funkcióját a Langerhansz-szigetek által termelt hormonokon (inzulin, glukagon) keresztül fejti ki a vércukorszint szabályozására (El Sayed & Mukherjee, 2024a).

Az inzulín a legfontosabb vércukorszint-csökkentő hormon, amit a béta sejtek termelnek. Elősegíti a glükóz felvételét, glikogénné alakulását és raktározását, a zsírsavak szintézisét, valamint gátolja a glükoneogenezist és a zsírsavbontást (Karpińska & Czauderna, 2022).

A glukagon az inzulinnal ellentétes hatású hormon, ami növeli a vércukorszintet. Az alfa sejtek termelik, és elsősorban a májra hatva fokozza a glikogenolízist és a glükoneogenezist (Karpińska & Czauderna, 2022).

Az inzulín szekréciós szabályozását elsősorban a vércukorszint emelkedése stabilizálja. A megemelkedett vércukorszint a béta sejtekben fokozza az ATP termelést, ami a Ca^{2+} csatornák nyílásához és az inzulín kiválasztásához vezet (El Sayed & Mukherjee, 2024b; Karpińska & Czauderna, 2022).

2.2 A hasnyálmirigy betegségei

A hasnyálmirigy nem megfelelő működése különböző súlyos egészségügyi problémák kialakulásához vezet. A leggyakoribb betegségek közé tartozik a cukorbetegség, az akut és krónikus hasnyálmirigy-gyulladás (pankreatitisz) és a hasnyálmirigy daganatos megbetegedései.

2.2.1 Akut hasnyálmirigy gyulladás

Az akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP-akut pankreatitisz) a hasnyálmirigyet érintő leggyakoribb megbetegedés, amely az exokrin mirigyet érinti (Szentesi és mtsai., 2016). A gyulladást a hasnyálmirigy vezetékek elzáródása okozza, általában epekövesség következtében, ami megakadályozza az emésztőenzimek megfelelő ürülését. Az emésztőenzimek a hasnyálmirigyben aktiválódnak ezáltal a szerv saját magát kezdi emésztetni, ami akut gyulladást idéz elő (Johnstone, 2018). Fő kiváltó okai közé tartoznak az alkoholfogyasztás, genetikai tényezők és az epekövesség (Párniczky és mtsai., 2016). A betegség súlyossága széles skálán mozoghat, az enyhe, néhány nap alatt elmúló formától a súlyos, életveszélyes állapotig. Az elhúzódó gyulladás súlyos, akár visszafordíthatatlan sérülést okozhat, ezért a korai diagnózis és kezelés kulcsfontosságú (Krenzer, 2016; Lankisch és mtsai., 2015a).

A gyulladásos válasz a szöveti sérülésekre vezethető vissza, ahol a tripszin aktiválódása a fő tényező. Az epeúti elzáródás következtében a Ca^{2+} a sejtekbe áramlik. Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése kulcsfontosságú szerepet játszik a betegség kialakulásában, mivel a Ca^{2+} aktiválja a hasnyálmirigy enzimeket, amelyek a szövetet kezdi emésztetni (Lankisch és mtsai., 2015b). A gyulladásos mediátorok, például a citokinek (TNF- α - tumor nekrosis faktor-alfa) és az interleukinok (IL-1, IL-6, IL-18), fokozzák a szövetkárosodást és a szisztémás gyulladásos választ. Az akut hasnyálmirigy-gyulladás nemcsak a hasnyálmirigyet, hanem az egész szervezetet is érinti (Hegyi & Rakonczay, 2015).

A súlyos akut pankreatitisz mortalitása elérheti a 30-50%-ot, leggyakrabban a többszervi elégtelenség következtében. Jelenleg a betegség pontos patomechanizmusa nem ismert, így specifikus kezelés nem létezik. A terápia jellemzően támogató jellegű, beleértve a fájdalomcsillapítást, folyadékpótlást és parenterális táplálást (Hegyi és mtsai., 2011; Laukkanen és mtsai., 2007; Pallagi és mtsai., 2014).

2.2.2 Krónikus hasnyálmirigy gyulladás

A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás (CP- krónikus pankreatitisz) egy komplex, multifaktoriális fibroinflammatorikus betegség, amely az ismétlődő gyulladások következtében kialakuló visszafordíthatatlan szöveti károsodásokat eredményez. Jellemzői közé tartozik a parenchimális sejtek elvesztése, a krónikus gyulladás és a fibrózis (Kleeff és mtsai., 2017). A betegség kialakulásában környezeti és genetikai tényezők egyaránt szerepet játszanak, például tartós alkoholfogyasztás, dohányzás, különböző genetikai mutációk, valamint idiopátiás esetek is előfordulhatnak (Kleeff és mtsai., 2017; Singh és mtsai., 2019).

A hasnyálmirigyben található sztellát sejtek fontos szerepet játszanak a betegség kialakulásában, mivel a gyulladásos mediátorok képesek ezen sejtek aktiválására. Az aktivált sztellát sejtek fibrotikus szövet kialakításával helyettesítik a károsodott szöveti területeket, amelyek képtelenek a hasnyálmirigy exokrin funkciójának ellátására (Brock, 2013).

Nem elhanyagolható tényező a genetikai hajlam sem, mivel számos gén mutációja összefüggésbe hozható a krónikus hasnyálmirigy-gyulladással (PRSS1, SPINK1, CFTR), növelve a betegség kialakulásának kockázatát. Az idiopátiás és örökletes hasnyálmirigy-gyulladás növeli a hasnyálmirigy rák kialakulásának kockázatát (Beer és mtsai., 2013; Kleeff és mtsai., 2017; Masson és mtsai., 2008; Németh & Sahin-Tóth, 2014; Rosendahl és mtsai., 2008; Whitcomb, 2013; Whitcomb és mtsai., 1996). A betegség kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok részletes megismerése elősegítheti a kezelési módszerek fejlesztését.

2.2.3 Hasnyálmirigy tumoros megbetegedései

A hasnyálmirigyet érintő daganatos megbetegedések közül a leggyakoribb a ductális adenokarcinóma (PDAC). Ez a daganattípus az egyik legmagasabb halálozási arányt mutató rákos megbetegedés, ugyanis az 5 éve túlélési ráta mindössze 9%. Az exokrin hasnyálmirigy csatornáit bélelő ductális epitel sejtekben alakul ki. Kialakulásában meghatározó szerepet játszik az életkor, fizikai aktivitás hiánya, elhízás, dohányzás, alkohol fogyasztás, 2-es típusú cukorbetegség és a krónikus pankreatitisz (Bettaieb és mtsai., 2021; Fesinmeyer és mtsai., 2005; Kleeff és mtsai., 2016).

Kialakulása egy több lépcsős folyamat eredménye, melyet különböző elváltozások előznek meg. Ilyenek például a hasnyálmirigy intraepiteliális neopláziák (PanIN) és az intraduktális papilláris mucinózus neopláziák (IPMN), amelyek prekarcinogén elváltozások. A PanIN-ek a hasnyálmirigy csatornáiban kialakuló kis méretű daganatok, míg az intraduktális papilláris mucinózus neopláziák a hasnyálmirigy szövetében kialakuló folyadékkal telt ciszták. Az acinoduktális metapláziának (ADM) nevezett folyamatot tekintik a PDAC kialakulásának kezdeti lépésének. Az acináris sejtek plaszticitása lehetővé teszi számukra, hogy különböző környezeti ingerek hatására duktális sejt jellemzőket vegyenek fel, fokozva a pro-onkogén mutációkra való érzékenységet (Bijlsma és mtsai., 2017; Buscail és mtsai., 2020; Delpu és mtsai., 2011; Di Magliano & Logsdon, 2013; Kanda és mtsai., 2012).

A PDAC korai stádiumában gyakran tünetmentes, ami késlekedett diagnózishoz vezet. Kezelése is nehézkes, mivel gyakran rezisztens a standard terápiákra, így a prognózis rossz. A betegség általánosan jellemző aktiváló mutációi, például a KRAS onkogénben, elősegítik a daganatfolyamatok kezdetét és fenntartását. Tumorsuppresszor gének, mint a CDKN2A/p16, TP53 és SMAD4 inaktivációja szintén hozzájárul az agresszív növekedéshez (Aguirre és mtsai., 2003; Bardeesy és mtsai., 2006; Guerra és mtsai., 2007; Hingorani és mtsai., 2003, 2005; Hruban és mtsai., 2006).

2.3 Az ER stressz, cAMP jelátvitel és a Ca^{2+} homeosztázis szerepe a hasnyálmirigy sejtekben

Az endoplazmatikus retikulum (ER) kulcsfontosságú sejtservecske, amely számos alapvető biológiai folyamatban vesz részt. Az ER-hoz köthető folyamatok zavara számos betegség kialakulásához vezethet. Ezen folyamatok károsodása ER-stresszhez vezet, amelyre a sejtek egy védekező mechanizmussal, az unfolded fehérje válasz (UPR) aktiválásával reagálnak. Krónikus stressz esetén az UPR nem képes ellátni feladatát, és a sejt elpusztul. Az ER-stressz és az UPR aktiváció fontos szerepet játszik mind az 1-es típusú (T1D) és a 2-es típusú (T2D) cukorbetegség pathogenezisében (Zhang és mtsai., 2020).

Az ER a sejt kalciumraktáraként is funkcionál, ezáltal nemcsak a fehérjeszintézisben, hanem a sejt kalcium-homeosztázisának fenntartásában is fontos szerepet tölt be. Az intracelluláris Ca^{2+} jelátvitel alapvető szerepet játszik az exokrin hasnyálmirigy működésében. Fő feladata az emésztőenzimek acinus sejtekből történő felszabadulásának szabályozása, valamint a duktális epitél sejtek bikarbonát- és folyadékszekréciójának közvetett befolyásolása. A fiziológiás receptorok stimulálásakor a sejtekben lévő Ca^{2+} felszabadul az ER-ből, amelyet a mitokondriumok pufferelnek a felesleget pedig a membránban található Ca^{2+} pumpák eltávolítják a sejtekből. Ezek a folyamatok ATP-függő módon működnek, és a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) membrán jelenléte is elengedhetetlen.

A tartós agonista stimuláció esetén a sejtek Ca^{2+} raktárai kiürülhetnek, ezért szükséges a külső Ca^{2+} beáramlása, amely a raktár függő Ca^{2+} beáramlás (SOCE) mechanizmusán keresztül történik. A SOCE-t a STIM1 (Stromális Interakciós Molekula 1) és az Orai1 (Kalcium felszabadulás-aktivált kalcium csatorna fehérje 1) fehérjék mediálják (Li és mtsai., 2014; Pallagi és mtsai., 2020).

A SOCE folyamata kulcsfontosságú mechanizmus a nem excitábilis eukarióta sejtek Ca^{2+} szignalizációjában, amely segíti az intracelluláris Ca^{2+} egyensúly fenntartását (Putney, 1986). Az extracelluláris Ca^{2+} beáramlása elengedhetetlen a következő folyamatokhoz: exocitózis, enzimszabályozás, génexpresszió regulációja, sejtek növekedése, migrációja, proliferációja, valamint az apoptózis szabályozása (Parekh & Putney, 2005).

A Ca^{2+} és a cAMP jelátvitel szinergiája fontos szerepet játszik az epitél sejtek szekréciós folyamataiban (Ahuja és mtsai., 2014). E két jelátviteli útvonal egyik kapcsolódási pontja az adenil ciklázok (AC) csoportja, különösen azok a tagok, amelyek a Ca^{2+} és kalmodulin által aktiválódnak. Az adenil ciklázok között megkülönböztetünk Ca^{2+} /kalmodulin aktivált (AC1, AC3, AC8), Ca^{2+} gátolt (AC5, AC6) és Ca^{2+} inszenzitív (AC2, AC4, AC7, AC9) típust (Halls & Cooper, 2011; Willoughby, 2012). A hasnyálmirigy epitél sejtjeiben már megfigyelték az AC fehérjék és a Ca^{2+} szignalizáció közötti kapcsolatot gyulladásos környezetben. Ebben az állapotban a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} szint gátolta a Ca^{2+} által gátolt AC6 működését, ami csökkent folyadékszekrécióhoz vezetett (Bozoky és mtsai., 2017).

A Ca^{2+} szignalizáció szerepe különösen jelentős a tumoros folyamatokban, ahol a tumor mikrokörnyezetének egyensúlyi és kommunikációs szerepe elősegíti a daganatos sejtek túlélését és proliferációját. A Ca^{2+} szignalizáció diszregulációja, például a Ca^{2+} túlterhelés, irreverzibilis sejt halált okozhat, amely összefüggésbe hozható az apoptózissal és nekrotikus folyamatokkal (Zhang és mtsai., 2023).

2.4 ORAI1 és STIM1 fehérjék szerepe a Ca^{2+} homeosztázisban

A SOCE aktiválásában a STIM és az ORAI fehérjecsalád tagjai alapvető szerepet játszanak. A STIM fehérjék az endoplazmatikus retikulum (ER) kalciumérzékelőiként működnek, és érzékelik, ha az ER raktárak kimerülnek. Ekkor oligomerizálódnak, az ER és a plazmamembrán kapcsolatának területére transzlokálódnak, és aggregátumokat képeznek. Az ORAI fehérjék a SOCE plazmamembrán pórusképző komponensei, és az ER kimerülésekor a STIM fehérjékkel együtt elindítják az extracelluláris kalcium beáramlását. A kalcium jelátvitel szabályozásában fontos szerepet játszik a PI(4,5)P2 (foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát) ami a STIM1 fehérjék PM-hez való kötődésében és az Orail csatornák aktiválásába játszik szerepet (Parekh & Putney, 2005).

A SOCE folyamatában szerepet játszó fehérjék hibái számos patofiziológias állapotot okozhatnak. Például az örökletes súlyos kombinált immunhiányos szindróma (SCID) egyik formájában a hibás ORAI1 működést Orail génmutációval hozták összefüggésbe. Ezenkívül a STIM1 hiánya autoimmun betegségeket idézhet elő, és a STIM1 hibájából eredő kalciumdiszreguláció szerepe is egyre világosabbá válik a tumorgenezis és a tumorprogresszió szempontjából (Feske, 2012).

2.5 A kiterjesztett szinaptotagmin fehérjék (E-syt – Extended Synaptotagmin) és szerepük a sejtek homeosztázisában

A membrán kapcsolódási helyek (MCS) két különböző sejtservecske membránja között jönnek létre, és fontos szerepet játszanak különböző élettani folyamatokban, beleértve a sejtek kalcium- és lipid-szignalizációját. Az MCS-ek lehetővé teszik a makromolekulák közvetlen cseréjét. Emellett fenntartják az organellek közötti stabilitást, sőt az intracelluláris homeosztázist is. Az MCS-ek fontos szerepet játszanak a tumorok metabolizmusában és a mikrokörnyezet szabályozásában, hozzájárulva a tumorok progressziójához, mely funkciót ki lehetne használni a tumorterápiában.

Ez a kutatási terület jelenleg alulreprezentált a szakirodalomban, pedig vizsgálata új potenciális rákellenes terápiás targetek azonosítására ad lehetőséget (Pan és mtsai., 2023).

Az ER és a plazmamembrán (PM) közötti szoros kapcsolatok kialakításában szerepet játszó fehérjéket először élesztőben azonosították. Ezek a szinaptotagmin-szerű fehérjék a trikarbinok (Tbc1/2/3), az Ist2, Scs2 és Scs22. A Tcb fehérjék emlős homológjai a kiterjesztett szinaptogaminok (E-syt1/2/3), melyek ugyancsak az ER-PM kapcsolatok kialakításában játszanak fontos szerepet (Balla, 2018).

Az E-Syt fehérjék az ER membránjában található kiterjesztett, integrált membránfehérjék, melyek a C2 domén fehérjék családjába tartoznak. Az E-Syt fehérjék fontos szerepet játszanak a sejtek működésében, mivel résztvesznek a lipidtranszportban, az ER-PM kontakt helyek kialakításában, a GLUT4 glükóz transzportban, a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) jelátvitelben és a kalcium jelátvitelben. Az E-syt membránfehérjéknek, három típusát azonosították, az E-syt1-et, az E-syt2-öt és az E-syt3-at. Felépítését tekintve, az E-syt fehérjék egy szinaptotagmin-szerű mitokondriális lipid kötő domént (SMP) és egy N-terminális, különálló transzmembrán domént (TM) tartalmaznak, amelyet a klasszikus Szinaptotagmin (Syt) fehérjétől eltérően nem kettő, hanem több, három vagy öt C2 domén követ. Az N-terminális domén az ER membránhoz rögzíti a fehérjét, míg az SMP domén a membránok közötti lipidcsere folyamatáért felel, a Ca^{2+} szenzitív C2 domének pedig biztosítják a PM-hoz való kötődést. Az ER-PM kontakt helyek kialakítása során az E-syt fehérjék C2 doménjeikkel a plazmamembránhoz kötődnek, összekötve azt az endoplazmatikus retikulummal. Ez a kapcsolat lehetővé teszi a két membrán közötti lipidcserét és a kalcium ionok áramlását. Ezek fehérjék a Ca^{2+} megkötésével és a membránok közötti kölcsönhatások szabályozásával közvetlenül befolyásolják a sejtekben a kalcium-szignalizációt (Herdman & Moss, 2016).

Az E-Syt fehérjék közül különösen az E-Syt1 játszik kulcsfontosságú szerepet a sejtek lipidtranszportjában és a Ca^{2+} jelátviteli folyamataiban. Az E-Syt1 fehérje több doménből áll: N-terminális részen található, hidrofób hajtű szerkezetű domén, ami az ER membránhoz rögzíti a fehérjét. A fehérje SMP doménje felelős a lipid transzport folyamatok közvetítéséért. Az SMP domén egy hordószerű szerkezetet alkot, amelynek belsejében hidrofób zseb található. Ez a zseb lehetővé teszi különböző lipideket, például foszfatidilkolint, foszfatidil-etanolamint, foszfatidil-inozitol és foszfatidil-serint kötését. Az SMP domének képesek dimerizálódni, ami tovább erősíti a lipidkötő képességüket és szerepet játszhat az E-Syt fehérjék oligomerizációjában.

A C2E domén, a PI (4,5) P2-ben gazdag membránokhoz való kötődésben játszik szerepet, és így az ER és a PM közötti kapcsolat kialakításáért felelős (Herdman & Moss, 2016).

Az E-Syt1 különböző doménjei között komplex kölcsönhatások alakulnak ki, amelyek a lipid transzportot szabályozzák. Az E-syt1 öt C2 doménje közül csak a C2A és a C2C domén tartalmaz Ca^{2+} kötő helyeket. A Ca^{2+} kötődése a C2C doménhez felszabadítja a C2E domént, ezáltal lehetővé téve annak kölcsönhatását a plazmamembránban elhelyezkedő PI(4,5)P2(foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát)-vel, ami a PM-hoz való kötődést eredményez. C2A domén képes kölcsönhatásba lépni az SMP doménnel ezáltal gátolni a lipidtranszport folyamatokat. A Ca^{2+} kötődése a C2A doménhez felszabadítja ezt a gátló kölcsönhatást, lehetővé téve az SMP domén által közvetített lipid transzportot (Herdman & Moss, 2016).

Az E-Syt1 null mutáns sejtekben a diacilglicerin (DAG) kiürülése a PM-ból késleltetett, és a kalcium-függő foszfatidil-szerin transzport is károsodott. Ez azt jelenti, hogy az E-Syt1 fontos szerepet játszik a PM lipid összetételének szabályozásában (Herdman & Moss, 2016).

2. Célkitűzések

Mivel a Ca^{2+} és cAMP szignalizáció elengedhetetlen szerepet tölt be a sejtek normál működése szempontjából, ezért az ezen folyamatokat szabályozó pontos mechanizmusok minél részletelesebb feltérképezése nagy jelentőséggel bír az ezzel kapcsolatos megbetegedések patomechanizmusának felderítésében és új kezelési lehetőségek azonosításában.

Ezért munkánk kezdetén célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy az E-syt1 fehérje részt vesz-e a sejtek Ca^{2+} és cAMP szignalizációjának szabályozásában. Továbbá abban az esetben, ha igen, milyen mechanizmusok révén hathat az intracelluláris Ca^{2+} és cAMP jelátvitelre.

3. Anyagok és módszerek

4.1 Sejtek fenntartása és szaporítása

Kísérleteinket epitél eredetű HeLa és E-syt1-3 tripla knock out (TKO) HeLa sejtvonalon végeztük, melyek az E-syt egyik izoformáját sem expresszálják. Mind a TKO HeLa, mind a hagyományos HeLa sejteket HeLa sejtenyésztő médiumban tartottuk fent (Függelék, 2. táblázat). A sejteket megközelítőleg 90%-os konfluenciáig növesztettük, majd ezt követően passzáltuk. A passzálás során a sejteket (1x) DPBS-sel (Függelék, 1. táblázat) mostuk, hogy eltávolítsuk a tenyésztőmédium maradékát a sejtekről. Ezt követően a sejteket 25% TrypLE Express emésztő oldattal (Függelék, 1. táblázat) inkubáltuk 5 percig 37°C-on sejtenyésztő inkubátorban. Az enzimatikus emésztés hatására disszociálnak a tenyésztőfelületről és egysejtes szuszpenziót alkotnak. A sejtszuszenziót összegyűjtöttük (centrifugálási lépés: 1000 rpm, 5 perc, 20 °C) és a pelletet két alkalommal mostuk (1x) DPBS-sel annak érdekében, hogy megtisztítsuk a mintát az emésztő oldat maradványoktól. Az utolsó mosási lépést követően a sejtpelletet 2 ml HeLa médiumban felvéve, megfelelő sejtmennyiség továbbvitelével új kultúrát indítottunk. A sejtenyészeteket inkubátorban tartottuk, megfelelő páratartalom, 5% CO₂ és 37°C-os körülmények között, a sejtenyésztő médiumot az optimális tápanyag ellátás biztosítása érdekében 3 naponta cseréltük.

4.2 Sejtek olvasztása és fagyasztása

Felhasználás előtt a lefagyasztott és folyékony nitrogénben tárolt sejteket 37°C-os vízfürdőben felolvasztjuk, ügyelve arra, hogy a sejtek minél kevesebb időt töltsenek szobahőmérsékleten (RT). Miután a sejtek felolvadtak az 5.1 fejezetben leírt mosási lépéseket követően, friss előmelegített HeLa tápban felvéve a sejtpelletet kultúrát indítottunk.

A fagyasztás előkészítéséhez a sejteket 5.1 fejezetben leírtakkal megegyező módszerrel egysejtes szuszpenziót hoztunk létre. Ebben az esetben a mosási lépéseket követően a pelletet speciális fagyasztó médiumban (Függelék, 3. táblázat) vettük fel, amely megvédi a sejteket a krioprezerválás során képződő jégkristályok által okozott károsodástól. A sejteket Mr. Frosty® tárolóban helyeztük el -80°C-ra maximum 48 órára, ezt követően felhasználásig folyékony nitrogénben tároltuk.

4.3 TKO HeLa sejtek transzfekciója

Az általunk elvégezni kívánt vizsgálatokhoz a TKO HeLa sejteket 2×10^4 sejt sűrűségben 6 lyukú sejtenyésző csészében növesztettük kör alakú üveglemezekre. Amikor a sejtek elérték a megfelelő konfluenciát (kb. 50%). Lipofektamin (Függelék, 5. táblázat) alapú transzfekciós módszer segítségével ko-transzfectáltuk a következő vektor kombinációkkal:

Immunfestés során használt vektor kombinációk:

C2Cx (1,2µg) • Opti-MEM (200µg) • Lipofectamin 3000 (2µg) • p3000 (4µg)	C2Ax (1,5µg) • Opti-MEM (200µg) • Lipofectamin 3000 (2µg) • p3000 (4µg)	ΔSMP (1,8µg) • Opti-MEM (200µg) • Lipofectamin 3000 (2µg) • p3000 (4µg)
C2Cx (1,2µg) +CPA • Opti-MEM (200µg) • Lipofectamin 3000 (2µg) • p3000 (4µg)	C2Ax (1,5µg) +CPA • Opti-MEM (200µg) • Lipofectamin 3000 (2µg) • p3000 (4µg)	ΔSMP (1,8µg) +CPA • Opti-MEM (200µg) • Lipofectamin 3000 (2µg) • p3000 (4µg)

1. ábra – A táblázat az immunfestés során használt vektor kombinációkat, valamint a transzfekció során alkalmazott reagensek koncentrációs mennyiségét tartalmazza. A vektor kombinációk félkövérrel kiemelve láthatók (**C2Cx**, **C2Ax**, **ΔSMP**). A táblázat alsó sorában a vektorok mellett látható „+ CPA” jelölés arra utal, hogy a kísérlet során azokat a mintákat ciklopiazon savval (CPA) kezeltük.

FRET mérés során használt vektor kombinációk:

C2Cx (1,2μg) • Opti-MEM (200μg) • Lipofectamin 3000 (2μg) • p3000 (4μg) • AC8(1,2 μg) • p147/p133(0,4 μg)	C2Ax (1,5μg) • Opti-MEM (200μg) • Lipofectamin 3000 (2μg) • p3000 (4μg) • AC8(1,2 μg) • p147/p133(0,4 μg)	ΔSMP (1,8μg) • Opti-MEM (200μg) • Lipofectamin 3000 (2μg) • p3000 (4μg) • AC8(1,2 μg) • p147/p133(0,4 μg)
C2Cx (1,2μg) • Opti-MEM (200μg) • Lipofectamin 3000 (2μg) • p3000 (4μg) • AC8(1,2 μg) • p147/p133(0,4 μg)	C2Ax (1,5μg) • Opti-MEM (200μg) • Lipofectamin 3000 (2μg) • p3000 (4μg) • AC8(1,2 μg) • p147/p133(0,4 μg)	ΔSMP (1,8μg) • Opti-MEM (200μg) • Lipofectamin 3000 (2μg) • p3000 (4μg) • AC8(1,2 μg) • p147/p133(0,4 μg)

2.ábra – A táblázat a FRET méréshez használt vektor kombinációkat, valamint a transzfekció során alkalmazott reagensek koncentrációs mennyiségét tartalmazza. Az FRET méréshez alkalmazott transzfekciós reagensek nagy részben megegyeznek az 1.ábrában leírtakhoz. Annyi különbség vélhető fel, hogy a méréshez a transzfekció során szenzorokat is alkalmazunk (AC8, p133, p147).

A transzfekciót az alábbiak szerint végeztük:

A vektor kombinációkat, valamint a lipofektamint a megfelelő koncentrációban 0.5 ml-es Eppendorf csövekbe kimértük Opti-MEM médiumba (Függelék,5.táblázat) és szobahőmérsékleten inkubáltuk 5 percig. Ezt követően a lipofektamin tartalmú Opti-MEM reagenst hozzámértük a vektorokat tartalmazó elegyhez és további 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, hogy a szükséges komplexek kialakulhassanak a transzfekcióhoz. Az inkubációs idő leteltével a transzfekciós oldatot a 6 lyukú sejtenyésztő csészében kör alakú üveglemezekre felnövesztett sejtekhez adtuk és a mintákat 37°C-on sejtenyésztő inkubátorban helyeztük over-night. A transzfekciót követően a mintákat immunfestéshez és FRET mérésekhez használtuk fel.

4.4 CPA(Ciklopiazonsav) kezelés

Az intracelluláris Ca^{2+} raktárak kiürülésének indukálására ciklopiazonsavat (CPA)(Függelék,5.táblázat) használtunk, ami egy mikotoxin, amelyet többnyire *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségbe tartozó penészgombák termelnek. A CPA gátolja a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz (SERCA) enzim működését, akkor a Ca^{2+} nem kerül vissza a sejtek Ca^{2+} raktárába így a citoplazmában megnő a kalcium-ionok koncentrációja. Ennek következtében ER-PM kapcsolódási helyek jönnek létre a raktárak visszatöltése céljából (Seidler és mtsai., 1989).

Immunfestéshez a transzfektált mintákat 10 μM CPA-val kezeltük 5 percig 37 °C-on. A FRET során ugyancsak 10 μM koncentrációban alkalmaztuk a CPA-t a mérés ideje alatt.

4.5 Immunfestés

A transzfektált sejteket az inkubáció letelte után 4% paraformaldehid (PFA) oldattal (Függelék,4.táblázat) fixáltuk 20 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően mintákat 1xPBS-el (Függelék,4.táblázat) mostuk (3x 5 perc, RT), majd a sejtek feltárását 0,01% Triton X-100-al (Függelék,4.táblázat) végeztük. A permeabilizálást követően a sejteket háromszor mostuk 1xPBS oldattal. Az aspecifikus kötési helyek elfedéséhez 10% BSA(Függelék,4.táblázat) tartalmú blokkoló oldatban inkubáltuk a mintákat 2 órán át 37°C -os inkubátorban. Az elsődleges antitesteket (anti-STIM1 antitest, anti-ORAI1 antitest) (1:200 hígításban alkalmaztuk blokkoló oldatban over-night, 4°C -on. Az inkubáció leteltével a mintákat ismételten mostuk 1xPBS oldattal (3x 5 perc, RT). A másodlagos antitesteket ugyancsak blokkoló oldatban hígítottuk 1:400 arányban és szobahőmérsékleten, fénytől védve 2 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően ismételten mosási lépés következett, a sejtmagok festését aminták fedésével egyidőben, a ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI(Függelék,4.táblázat) reagenssel végeztük és fénytől védve egy órát szárítottuk. A mintákat Leica Stelláris konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

4.6 FRET (Förster Resonance Energy Transfer) mérés

Egy olyan folyamat, amely során két fluorofor (fluoreszcens) molekula között energiaátadás történik. Igen érzékeny a két fluorofor közötti távolságra, így ideális eszköz a biomolekulák közötti kölcsönhatások és távolságok vizsgálatára. Működési alapja, hogy az egyik fluorofort, a donort gerjesztő fénnel sugározzák, majd a gerjesztett donor energiáját átadja a másik fluorofornak, az akceptornak. Ehhez a két fluorofornak nagyon közel kell lennie egymáshoz.

Az akceptor felveszi az energiát, és saját, jellemző hullámhosszán fényt bocsát ki. Így akár intracelluláris jelátviteli folyamatokat is tudunk vizsgálni. A FRET-tel követhető a jelátviteli utakban résztvevő molekulák kölcsönhatása és lokalizációja.

A méréshez való előkészületek a következő képpen történtek:

Az elvégezni kívánt vizsgálatokhoz a 4.3 fejeztben leírt eljárást végeztük el. A különbség a folyamatban a transzfekciós oldat összemérése során történik. Transzfekciós oldatba hozzá kell adnunk pluszba szenzorokat és enzimet, mint a p133 és p147 (Függelék, 5. táblázat), amelyek egy citoszolikus és egy membrán szenzor, valamint AC8 (adenilált-cikláz 8) (Függelék, 5. táblázat), amely olyan enzim, amely fontos szerepet játszik a sejtek jelátvitelében, azáltal, hogy katalizálja az ATP (adenozin-trifoszfát) ciklikus AMP-vé (cAMP) történő átalakulását.

4.7 Kiértékelés, statisztika

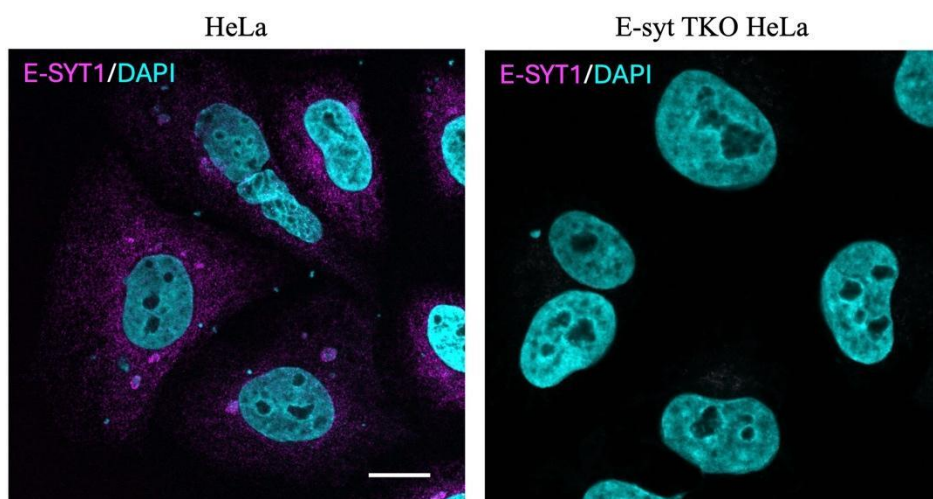
A kapott adatok statisztikai elemzését Excel és GraphPad Prism szoftverrel végeztük. Az adatokat $\pm$ SEM-ben fejeztük ki, a szignifikanciát unpaired t-teszt segítségével Welch korrekciót alkalmazva. A $p < 0,05$ értékeket szignifikánsnak tekintettük.

4. Eredmények és értékelésük:

5.1 E-syt TKO HeLa sejtvonala validálása

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy az általunk használni tervezett sejtvonala valóban nem expresszálja a vizsgálni kívánt E-syt1 fehérjét, immunfestést végeztünk. A TKO és vad típusú HeLa sejteket az Anyagok és módszerek 5.5 fejezetében leírtak alapján E-syt1 ellenanyaggal festettük és konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a fehérje jelenlétét a TKO és vad típusú HeLa sejtekben.

Azt figyeltük meg, hogy míg a vad típusú sejtekben megfigyelhető volt az E-syt1 fehérje kifejeződése, a vártan megfelelően az endoplazmatikus retikulum területén, addig a TKO HeLa sejtekben nem figyeltünk meg E-syt1 festődést. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az E-syt TKO HeLa sejtek valóban nem expresszálják az E-Syt1 fehérjét, ezért a sejt vonal alkalmas az általunk tervezett további vizsgálatok elvégzésére.



3. ábra – E-syt1 immunfestés a TKO HeLa sejt vonal validálására

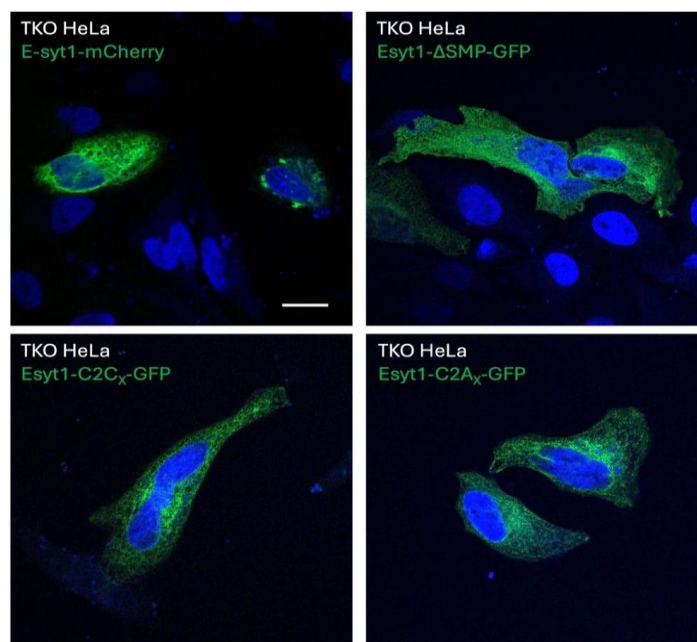
A vad típusú és E-syt tripla knock out sejt vonalak E-syt1 antitesttel történő immunfestése. A képek Leica Stellaris konfokális mikroszkóppal készültek. DAPI: cián, E-syt1: magenta. Objektív: 63x, lépték: 50 μ m.

5.2 E-syt1 transzfekciós plazmidok tesztelése

A vizsgálataink egyik kulcsfontosságú elemét képezik a vad típusú és különböző domén mutációkat hordozó E-syt1 plazmidok. Ezért alkalmazásuk előtt teszteltük ezen plazmidok sejtekbe való bejuttatásának hatékonyságát és a sejten belüli kifejeződésüket. Ehhez az Anyagok és módszerek 5.3 fejezetében leírtak alapján transzfekciót végeztünk TKO HeLa sejteken és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a plazmidok kifejeződését a sejtekben.

Ebben az esetben GFP vagy mCherry jelöléssel ellátott plazmidokat alkalmaztunk, így a vizualizációhoz nem volt szükség immunfestésre, csak a sejtek transzfekciót követő fixálására.

A transzfekció során az összes alkalmazott plazmid bejutott a sejtekbe. A vad típusú E-syt1-mCherry plazmid, a Ca^{2+} kötő domén mutáns E-syt1 C2Ax-GFP és C2Cx-GFP, valamint az SMP domént nem tartalmazó E-syt1 ΔSMP -GFP plazmidok is a citoplazmában, a vártan megfelelően, endoplazmatikus retikulum kötött elrendeződést mutattak. Ezek alapján az összes általunk alkalmazni kívánt plazmid megfelel az elvártaknak és alkalmazható a további kísérletek lebonyolításához.



4. ábra – Plazmidok ellenőrzése transzfekciót követően

E-syt plazmidok kifejeződése és sejten belüli lokalizációja transzfekciót követően. A képek Leica Stellaris konfokális mikroszkóppal készültek DAPI: kék, plazmidok: zöld. Obejktív: 63x, lépték: 50 μm .

5.3 Az E-syt1 Ca^{2+} kötő és SMP domének mutációjának hatása a sejtmembrán közelében kialakuló cAMP szintre

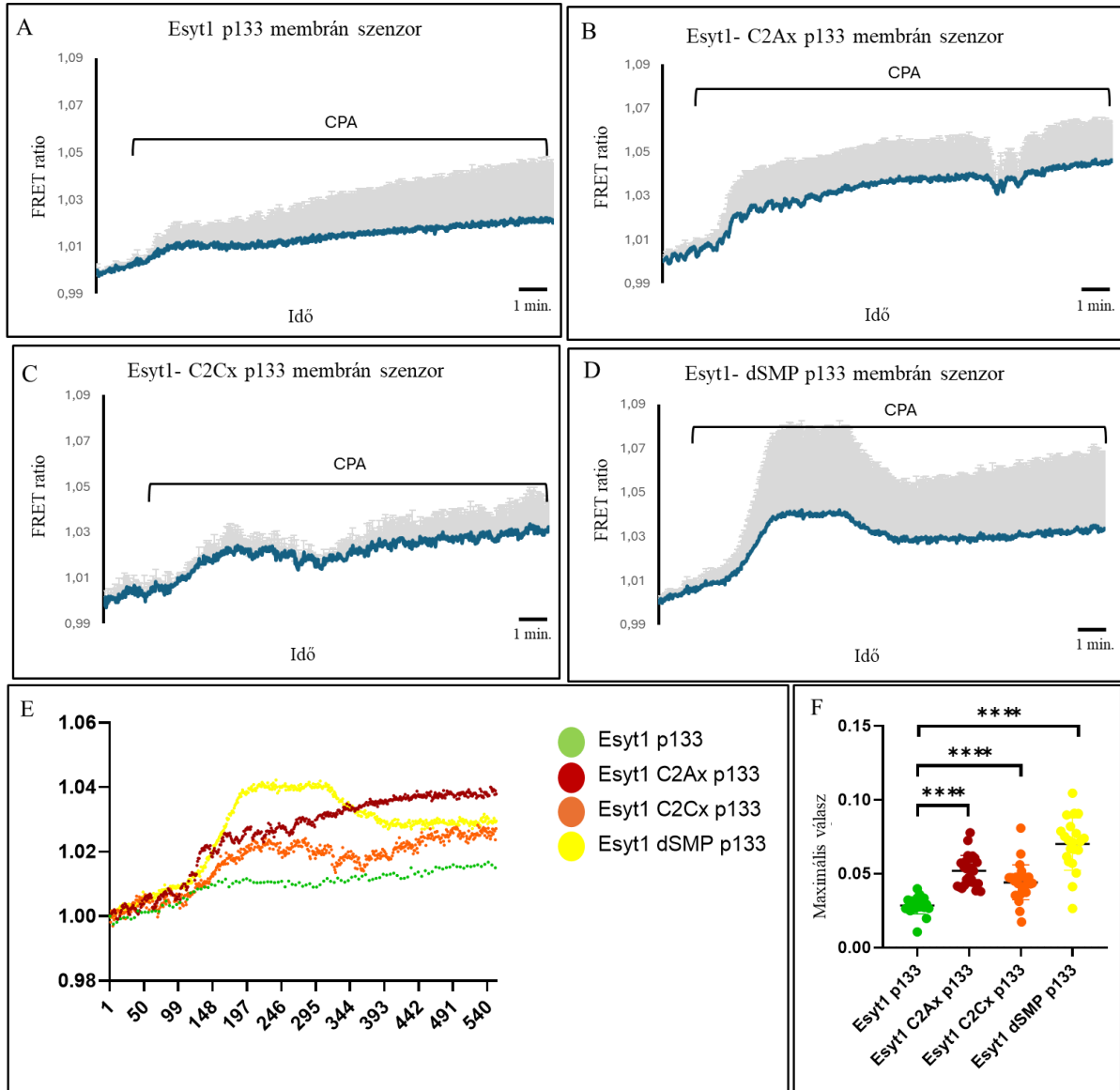
Az intracelluláris Ca^{2+} szintje befolyásolja a sejtben belüli cAMP szintet, mivel a sejtmembránban található Adenil cikláz 8-at a Ca^{2+} aktiválja, amely az ATP-t cAMP-vé alakítja. A cAMP szint meghatározására FRET méréseket alkalmaztunk. A TKO HeLa sejteket p133 membrán lokalizált FRET szenzor és AC8 (cAMP szintézisért felelős) plazmidokkal kointegráltuk a vad típusú E-syt1, a Ca^{2+} kötésben mutáns E-syt1 C2Ax és C2Cx, valamint az E-syt1 SMP doménjét nem tartalmazó plazmidokat. A FRET mérés során 10 μM CPA-val indukáltuk a Ca^{2+} raktárak kiürülését és 10 percen keresztül regisztráltuk a cAMP szint változását a membrán közeli régióban.

Azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú E-syt1 esetében a cAMP szint enyhén megemelkedik a sejtmembrán közelében. Ehhez képest azokban az esetekben amikor a sejteket a C2Ax plazmiddal transzfektáltuk a CPA kezelés hatására ugrásszerűen megemelkedett a cAMP szint, ami egy lassú, de folyamatos emelkedést mutatott egészen a kísérlet végéig. Hasonló eredményeket tapasztaltunk a C2Cx mutáns plazmiddal történt transzfekciót követően is, bár ebben az esetben a cAMP szint alacsonyabb volt. Abban az esetben, ha a sejteket az SMP domént nem tartalmazó mutáns plazmiddal transzfektáltuk azt tapasztaltuk, hogy a cAMP szint ugyancsak ugrás szerűen megemelkedett CPA kezelés hatására, azonban pár perc elteltével a felére csökkent, de nem éri el az alapállapotot.

A regisztrált cAMP szintek alapján meghatároztuk a sejtek maximális válasz értékét a legalacsonyabb és legmagasabb mért eredmények különbségéből. Ezek alapján megállapítható, hogy mind a Ca^{2+} szenzitív domének mutációja, mind az SMP domén hiánya magasabb cAMP szintet eredményez a sejtmembrán közelében.

A kapott eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a kalcium raktárak kiürülését követően mind a Ca^{2+} szenzitív domén mutációk (5.ábra/B/C), mind az SMP domén (5.ábra/D) hiányában megnő a cAMP szintje a membrán közeli régióban, ami összefüggésben lehet egy megemelkedett Ca^{2+} szinttel. A megemelkedett Ca^{2+} szintet ebben az esetben okozhatja a raktárak feltöltődését követően a PM-ER kapcsolódási helyek E-syt1 általi stabilizálódása. Az E-syt1 gyűrű struktúrát formálva a PM és az ER kapcsolódási pontoknál segíti a Ca^{2+} raktárak gyors és hatékony visszatöltődését. Fiziológiás körülmények között az E-syt1 Ca^{2+} szenzitív doménjei érzékelik a megemelkedett kalcium szintet és egy negatív visszacsatolási mechanizmusnak köszönhetően megszüntetik a PM-ER kapcsolatokat.

Azonban abban az esetben, ha a Ca^{2+} szenzor doméneket elrontjuk, az E-syt1 negatív visszacsatolási mechanizmusa sérül, így a kapcsolat a raktrarak feltöltődése után is fennmarad a PM és az ER között, mely a sejtekben magasabb Ca^{2+} és cAMP szintet eredményezhet.

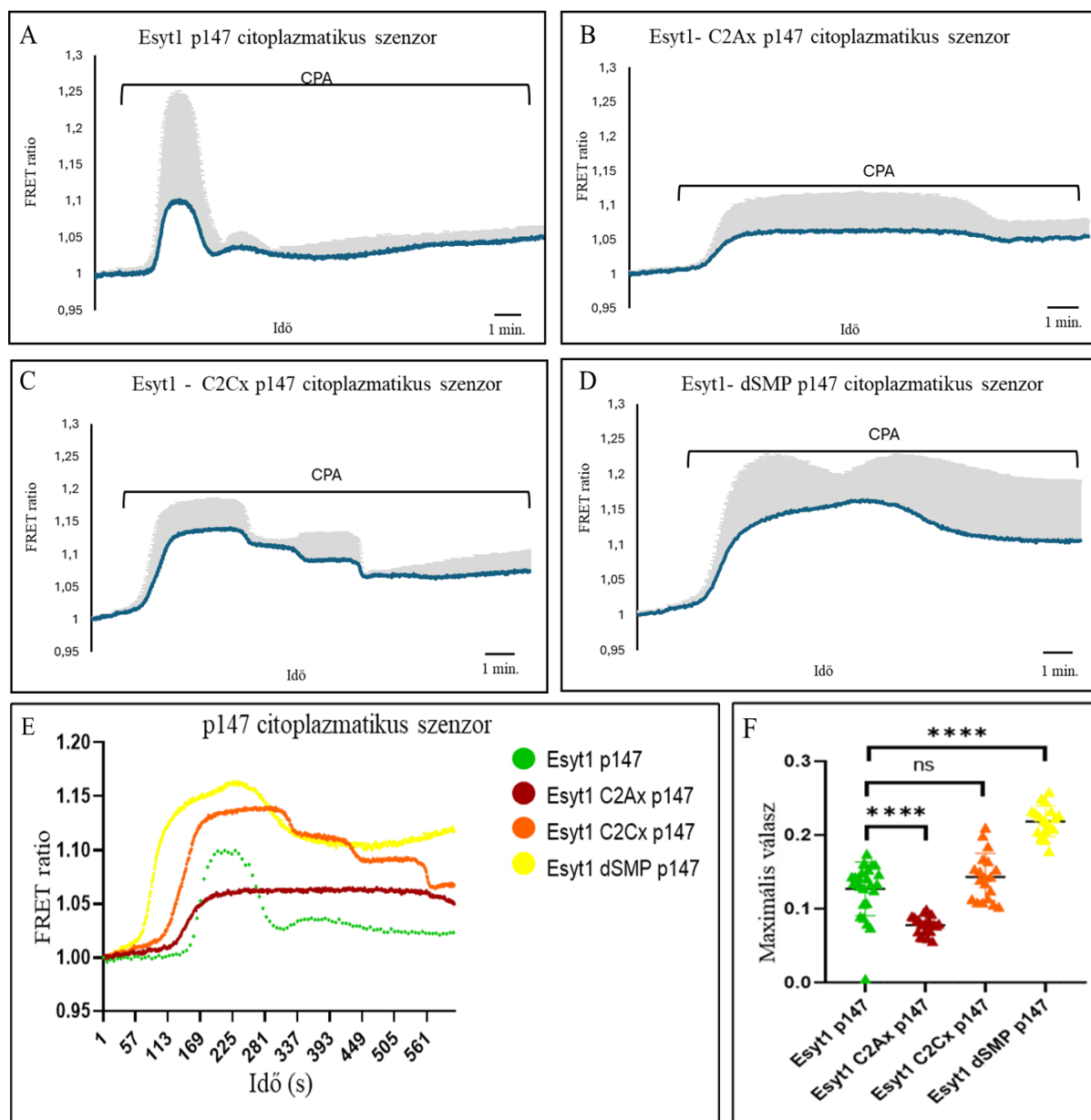


5. ábra – FRET mérés eredmények p133 membrán szenzorral

(A) Vad típusú E-syt1 plazmid transzfekciót követő cAMP szint változás. (B) ... (E) A Membrán régióban reigisztrált cAMP szintek a különböző E-syt1 plazmid transzfekciókat követően egymáshoz viszonyítva. (F) FRET mérések alapján kalkulált maximális válaszártékek.

5.4 Az E-syt1 Ca^{2+} kötő és SMP domének mutációjának hatása a citoplazmatikus cAMP szintre

Az 5.3 fejezetben leírtakhoz hasonlóan szintén Ca^{2+} szint hatását vizsgáltuk a cAMP szintre, amit a Ca^{2+} által aktivált Adenil cikláz 8 (AC8) szintetizált ATP-ből. Az 5.3 fejezetben alkalmazott p133 membránlokalizált szenzorral ellentétben, azonban a mérés során p147 citoplazmatikus FRET szenzort használtunk. A 10 μM ciklopiazon sav (CPA) indukálta Ca^{2+} kiáramlást követően intracelluláris cAMP szintet mértünk az E-syt1-C2A/C2C vagy E-syt1-SMP mutánsokban. A p147 citoplazmatikus szenzorral végzett mérések során azt tapasztaltuk, hogy a C2A domén (6.ábra/E) mutációja esetén a cAMP maximális válaszreakciója alacsonyabb volt a vad típusú E-syt1-hez képest (6.ábra/E), ami által arra következtethetünk, hogy a Ca^{2+} -érzékeny C2A domén központi szerepet játszik a cAMP termelésében vagy a jelátviteli utak aktiválásában. Ezzel ellentétben a C2C domén defektusa (6.ábra/E) nem eredményezett jelentős változást a cAMP szintekben, amely arra utal, hogy ez a domén kisebb mértékben vesz részt a cAMP szabályozásában. A plazmamembrán transzport domén hiánya (6.ábra/E) esetében azonban magasabb cAMP szinteket eredményezett, ami arra enged következtetni, hogy ennek a doménnek a funkciója normál körülmények között korlátozhatja a cAMP termelést vagy befolyásolhatja a sejtek jelátviteli mechanizmusait.



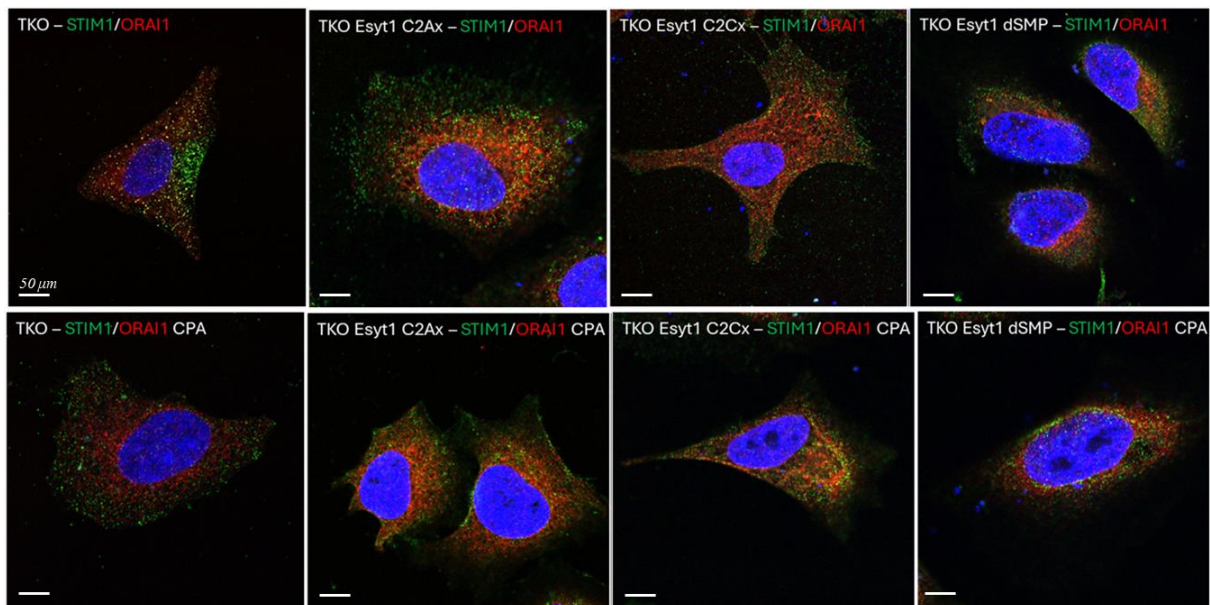
6. ábra – FRET mérés eredmények p147 citoplazmatikus szenzorral

(A) Vad típusú E-syt1 plazmid transzfekciót követő cAMP szint változás. (B) ... (E) A citoplazma régióban regisztrált cAMP szintek a különböző E-syt1 plazmid transzfekciókat követően egymáshoz viszonyítva. (F) FRET mérések alapján kalkulált maximális válaszártékek.

5.5 A STIM1 és Orai1 fehérjék kifejeződésének vizsgálata TKO Hela sejtekben

A STIM1 fehérjék az endoplazmatikus retikulum (ER) kalciumérzékelőiként működnek, és érzékelik az ER kalciumkészletének kimerülését az ORAI1 fehérjék pedig a plazmamembrán pórusképző komponenseiként szerepelnek, és a STIM1 fehérjékkel együtt aktiválják az extracelluláris kalcium beáramlását (Parekh & Putney, 2005).

Az E-syt tripla knock out (TKO) sejtekben a CPA indukciója nélkül is észlelhetők a STIM1 és ORAI1 fehérjék által létrehozott plazmamembrán és endoplazmatikus retikulum közötti kapcsolatok jelei. Emiatt arra következtethetünk, hogy ezek a sejtek valamilyen kompenzációs mechanizmust aktiválhatnak, amely lehetővé teszi számukra, hogy a Ca^{2+} jelátviteli folyamatokhoz hasonló funkciókat fenntartsák, még a E-syt fehérjék hiányában is.



7.ábra A STIM1 és az ORAI1 lokalizációjának vizsgálata immunfestés technikával

Az immunfestés során, az ORAI1, STIM1 és E-syt fehérjék, eloszlása a sejtek mutáns plazmidokkal való transzfekcióját követően és CPA-val kezelve megfigyelhető volt a PM és a ER területén. A képek Leica Stellaris konfokális mikroszkóppal készültek DAPI: kék, STIM1 és ORAI1 fehérjék: piros és zöld, Objektív: 63x, lépték: 50 μm.

6.Összefoglalás

A kutatási és klinikai adatok alapján jól ismert, hogy a tartósan megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció a hasnyálmirigy szövetének sérüléséhez és akut hasnyálmirigy-gyulladás (AP) kialakulásához vezet. Az ORAI-1 csatorna, amely a hasnyálmirigy szövetében a legnagyobb mennyiségben található, kulcsszerepet játszik az akut és krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban (CP), azonban az E-syt (Extended-synaptotagmin) fehérjék funkcióját eddig nem vizsgálták e betegség kontextusában. Az AP-ben szenvedő betegek körülbelül 20%-ánál fordul elő visszatérő akut hasnyálmirigy-gyulladás, ezeknek pedig körülbelül 35%-ánál alakul ki CP. A CP-ben szenvedő egyének esetében a 20-25 éven belüli mortalitás közel 50%, továbbá ezeknél a pácienseknél a hasnyálmirigy-rák kialakulásának kockázata akár 13-szorosára is nőhet. Meg kell említeni, hogy az idiopátiás és örökletes krónikus hasnyálmirigy-gyulladásban szenvedők körében is jelentős a hasnyálmirigy-rák kockázata, mivel ezeknél a betegek felénél fennáll a betegség kialakulásának esélye.

A kísérleti eredményeink arra adtak következtetést, hogy az E-syt1 különböző mutációi eltérő módon befolyásolják a cAMP-szinteket. A p133 plazmamembrán-szenzorral végzett vizsgálatokban, minden mutáns magasabb cAMP-szintet mutatott a vad típusú E-syt1-hez képest. Ez arra utal, hogy ezek a mutációk elősegítik az E-syt1 membránlokalizációját, vagy közvetlenül fokozzák a cAMP jelátviteli folyamatokat. Az E-syt1 szerepe az ER-PM (endoplazmatikus retikulum-plazmamembrán) kontakt helyek stabilizálásában számos szakirodalmi forrásban szerepel. Ez a stabilizáció a $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ domének révén történik, amelyek segítenek az ER-PM kontaktusok szerkezetének átalakításában, így hozzájárulnak az ER Ca^{2+} tartalmának visszatöltéséhez. E folyamat következményeként inaktíválódik a STIM-1 és ORAI-1 működése, ami korlátozza az extracelluláris Ca^{2+} bejutását (Herdman & Moss, 2016).

Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az E-syt1 fehérje a Ca^{2+} -kötő és fehérjetranszport doménjein keresztül, Ca^{2+} -függő módon hozzájárul az intracelluláris cAMP szint szabályozásához, ami valószínűleg a STIM1/ORAI1 fehérjék aktiválásán és az endoplazmatikus retikulum (ER) és a plazmamembrán (PM) közötti kapcsolatok stabilizálásán keresztül történik. Összességében megállapítható, hogy az E-syt1 különböző doménjei eltérő módon szabályozzák a cAMP szintet, amely kulcsszerepet játszik a sejtek közötti jelátviteli folyamatok irányításában.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kúthy-Sutus Enikő tudományos munkatársnak, türelmét és odaadását a felkészítem során, valamint a munkám alatt nyújtott segítségét.

Emellett, szeretném megköszönni Dr. Maléth József tudományos főmunkatársnak és egyben a kutatócsoport vezetőjének, hogy lehetőséget és támogatást biztosított számomra a tudományos munkában való részvételhez.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani az MTA SZTE Momentum Eitél Sejt Szignalizációs és Szekréción Kutatócsoport minden tagjának, akik szakmai tanácsaikkal és a laboratóriumi munkám során nyújtott segítségükkel hozzájárultak kutatásom sikeréhez.

8.Függelék

HeLa /TKO HeLa sejtek fenntartásához használt anyagok és eszközök		
Komponens	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentrációk
Szövettenyésztési edény 75 cm ²	Greiner Bio, 658175	-
DPBS(1x)	Gibco, 14190-094	-
TrypLE Express	ThermoFisher, 12605-028	-
15 ml-es centrifuga cső	100 Cellstar, 188277	-
100 Sterican 18 G tű	Braun, 4667123	-
20 ml-es fecskendő	Chirana, CH0204	-
Szövettenyésztési edény 75 cm ²	Greiner Bio, 658175	-
22µm-es szűrő	Filter-Bio, FBS30PES022S	-

1.táblázat

HeLa tápoldat összetétel		
Komponens	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentrációk
DMEM GlutaMax™ Supplement	Gibco, 31966-021	86%
FBS (Fetal bovine serum)	Gibco, 10500064	5%
Antibiotic-Antimycotic	Gibco, 1524-062	1%
Kanamycin-szulfát	Gibco, 1516-0047	1%

2.táblázat

Krioprezerváláshoz használt anyagok és eszközök		
Komponens	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentrációk

FBS (Fetal bovine serum)	Gibco, 10500064	40%
HeLa tápoldat	-	55%
DMSO	Thermo, 85190	5%
Fagyasztócső 2 ml	Greiner, 122263	-

3.táblázat

Immunfestéshez használt anyagok		
Komponens	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentrációk
BSA (Bovine Serum Albumin)	PanBiotech, P061391500	-
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma, P4417-100TAB	-
ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo, P36935	-
Triton-X 100	Sigma, T9284-500ML	-
16% Paraformaldehid (PFA)	Thermo, 11400580	-
Fedőlemez	Sigma, BR475505-50EA	-

4.táblázat

Transzfektáláshoz és méréshez használt anyagok		
Komponens	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentrációk
E-syt1 plazmid	-	-
E-syt1 C2Cx plazmid	-	-
E-syt1 C2Ax plazmid	-	-
E-syt1 ΔSMP plazmid	-	-
Adenil cikláz 8 (AC8) plazmid	Origene, SKU RC211815	
P133 FRET szenzor plazmid	-	
P147 FRET szenzor plazmid	-	
Lipofectamine 2000	Invitrogen, 11668-019	-
Lipofectamine 3000 és p3000	Invitrogen, L3000015	-

Opti-MEM	Gibco, 31985-070	-
Cyclopiazonic acid CPA	9A/250007, Tocris	-

5.táblázat

9.Irodalomjegyzék

- Aguirre, A. J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D. A., Horner, J., Redston, M. S., & DePinho, R. A. (2003). Activated Kras and *Ink4a/Arf* deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development*, 17(24), 3112–3126. <https://doi.org/10.1101/gad.1158703>
- Ahuja, M., Jha, A., Maléth, J., Park, S., & Muallem, S. (2014). cAMP and Ca²⁺ signaling in secretory epithelia: Crosstalk and synergism. *Cell Calcium*, 55(6), 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.01.006>
- Balla, T. (2018). Ca²⁺ and lipid signals hold hands at endoplasmic reticulum–plasma membrane contact sites. *The Journal of Physiology*, 596(14), 2709–2716. <https://doi.org/10.1113/JP274957>
- Bardeesy, N., Cheng, K., Berger, J. H., Chu, G. C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A. F., Horner, J., Lauwers, G. Y., Hanahan, D., & DePinho, R. A. (2006). *Smad4* is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes & Development*, 20(22), 3130–3146. <https://doi.org/10.1101/gad.1478706>
- Beer, S., Zhou, J., Szabó, A., Keiles, S., Chandak, G. R., Witt, H., & Sahin-Tóth, M. (2013). Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (*CTRC*) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut*, 62(11), 1616–1624. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303090>

- Bettaieb, L., Brulé, M., Chomy, A., Diedro, M., Fruit, M., Happerneegg, E., Heni, L., Horochowska, A., Housseini, M., Klouyovo, K., Laratte, A., Leroy, A., Lewandowski, P., Louvieux, J., Moitié, A., Tellier, R., Titah, S., Vanauberg, D., Woesteland, F., ... Lehen'kyi, V. (2021). Ca²⁺ Signaling and Its Potential Targeting in Pancreatic Ductal Carcinoma. *Cancers*, 13(12), 3085. <https://doi.org/10.3390/cancers13123085>
- Bijlsma, M. F., Sadanandam, A., Tan, P., & Vermeulen, L. (2017). Molecular subtypes in cancers of the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(6), 333–342. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.33>
- Bozoky, Z., Ahmadi, S., Milman, T., Kim, T. H., Du, K., Di Paola, M., Pasyk, S., Pekhletski, R., Keller, J. P., Bear, C. E., & Forman-Kay, J. D. (2017). Synergy of cAMP and calcium signaling pathways in CFTR regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.1613546114>
- Brock, C. (2013). Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 19(42), 7231. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7231>
- Buscail, L., Bournet, B., & Cordelier, P. (2020). Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(3), 153–168. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0245-4>
- Crul, T., & Maléth, J. (2021). Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites as an Organizing Principle for Compartmentalized Calcium and cAMP Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4703. <https://doi.org/10.3390/ijms22094703>
- Delpu, Y., Hanoun, N., Lulka, H., Sicard, F., Selves, J., Buscail, L., Torrisani, J., & Cordelier, P. (2011). Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis. *Current Genomics*, 12(1), 15–24. <https://doi.org/10.2174/138920211794520132>

- Di Magliano, M. P., & Logsdon, C. D. (2013). Roles for KRAS in Pancreatic Tumor Development and Progression. *Gastroenterology*, 144(6), 1220–1229.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.071>
- El Sayed, S. A., & Mukherjee, S. (2024a). Physiology, Pancreas. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459261/>
- El Sayed, S. A., & Mukherjee, S. (2024b). Physiology, Pancreas. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459261/>
- Fesinmeyer, M. D., Austin, M. A., Li, C. I., De Roos, A. J., & Bowen, D. J. (2005). Differences in Survival by Histologic Type of Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(7), 1766–1773.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0120>
- Feske, S. (2012). Physiological and pathophysiological functions of SOCE in the immune system. *Frontiers in Bioscience*, E4(6), 2253–2268. <https://doi.org/10.2741/e540>
- Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Cañamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E. P., & Barbacid, M. (2007). Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell*, 11(3), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012>
- Halls, M. L., & Cooper, D. M. F. (2011). Regulation by Ca²⁺-Signaling Pathways of Adenylyl Cyclases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a004143–a004143. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004143>
- Hegyi, P., Maléth, J., Venglovecz, V., & Rakonczay, Z. (2011). Pancreatic Ductal Bicarbonate Secretion: Challenge of the Acinar Acid Load. *Frontiers in Physiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00036>

- Hegy, P., & Rakonczay, Z. (2015). The role of pancreatic ducts in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Pancreatology*, 15(4), S13–S17.
<https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.03.010>
- Herdman, C., & Moss, T. (2016). Extended-Synaptotagmins (E-Syts); the extended story. *Pharmacological Research*, 107, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.034>
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V. E., Hruban, R. H., Lowy, A. M., & Tuveson, D. A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437–450.
[https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00309-X](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00309-X)
- Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S., & Tuveson, D. A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7(5), 469–483.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.023>
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Anver, M. R., Biankin, A. V., Boivin, G. P., Furth, E. E., Furukawa, T., Klein, A., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Lauwers, G. Y., Longnecker, D. S., Lüttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G. J. A., Pérez-Gallego, L., Redston, M., & Tuveson, D. A. (2006). Pathology of Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Exocrine Cancer: Consensus Report and Recommendations. *Cancer Research*, 66(1), 95–106. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2168>
- Johnstone, C. (2018). Pathophysiology and nursing management of acute pancreatitis. *Nursing Standard*, 33(4), 75–82. <https://doi.org/10.7748/ns.2018.e11179>

- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S., Yu, J., Borges, M., Hruban, R. H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., & Goggins, M. (2012). Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4), 730-733.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.042>
- Karpińska, M., & Czauderna, M. (2022). Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Frontiers in Physiology*, 13, 807632. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Kleeff, J., Whitcomb, D. C., Shimosegawa, T., Esposito, I., Lerch, M. M., Gress, T., Mayerle, J., Drewes, A. M., Rebours, V., Akisik, F., Muñoz, J. E. D., & Neoptolemos, J. P. (2017). Chronic pancreatitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17060. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.60>
- Krenzer, M. E. (2016). Understanding acute pancreatitis. *Nursing*, 46(8), 34–40. <https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000484959.78110.98>
- Lankisch, P. G., Apte, M., & Banks, P. A. (2015a). Acute pancreatitis. *The Lancet*, 386(9988), 85–96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60649-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60649-8)
- Lankisch, P. G., Apte, M., & Banks, P. A. (2015b). Acute pancreatitis. *The Lancet*, 386(9988), 85–96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60649-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60649-8)
- Laukkarinen, J. M., Van Acker, G. J. D., Weiss, E. R., Steer, M. L., & Perides, G. (2007). A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate. *Gut*, 56(11), 1590–1598. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.124230>

- Li, J., Zhou, R., Zhang, J., & Li, Z.-F. (2014). Calcium signaling of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), 16146. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16146>
- M. Hofer, A. (2012). Interactions Between Calcium and cAMP Signaling. *Current Medicinal Chemistry*, 19(34), 5768–5773. <https://doi.org/10.2174/092986712804143286>
- Masson, E., Chen, J.-M., Scotet, V., Le Maréchal, C., & Férec, C. (2008). Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Human Genetics*, 123(1), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0459-3>
- Németh, B. C., & Sahin-Tóth, M. (2014). Human cationic trypsinogen (*PRSS1*) variants and chronic pancreatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(6), G466–G473. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00419.2013>
- Pallagi, P., Balla, Z., Singh, A. K., Dósa, S., Iványi, B., Kukor, Z., Tóth, A., Riederer, B., Liu, Y., Engelhardt, R., Jármai, K., Szabó, A., Janovszky, Á., Perides, G., Venglovecz, V., Maléth, J., Wittmann, T., Takács, T., Gray, M. A., ... Rakonczay, Z. (2014). The Role of Pancreatic Ductal Secretion in Protection Against Acute Pancreatitis in Mice*: *Critical Care Medicine*, 42(3), e177–e188. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000101>
- Pallagi, P., Madácsy, T., Varga, Á., & Maléth, J. (2020). Intracellular Ca²⁺ Signalling in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis: Recent Advances and Translational Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4005. <https://doi.org/10.3390/ijms21114005>
- Pan, Y., Strohmmer, D., Feng, S., Zhang, G., Cui, H., & Song, Y. (2023). The role of extended synaptotagmin at membrane contact sites in cancer research. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1291506. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1291506>

- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
- Párniczky, A., Kui, B., Szentesi, A., Balázs, A., Szűcs, Á., Mosztbacher, D., Czimmer, J., Sarlós, P., Bajor, J., Gódi, S., Vincze, Á., Illés, A., Szabó, I., Pár, G., Takács, T., Czakó, L., Szepes, Z., Rakonczay, Z., Izbéki, F., ... on behalf of the Hungarian Pancreatic Study Group. (2016). Prospective, Multicentre, Nationwide Clinical Data from 600 Cases of Acute Pancreatitis. *PLOS ONE*, 11(10), e0165309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165309>
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6)
- Rosendahl, J., Witt, H., Szmola, R., Bhatia, E., Ózsvári, B., Landt, O., Schulz, H.-U., Gress, T. M., Pfützer, R., Löhr, M., Kovacs, P., Blüher, M., Stumvoll, M., Choudhuri, G., Hegyi, P., Te Morsche, R. H., Drenth, J. P., Truninger, K., Macek, M., ... Sahin-Tóth, M. (2008). Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genetics*, 40(1), 78–82. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.44>
- Singh, V. K., Yadav, D., & Garg, P. K. (2019). Diagnosis and Management of Chronic Pancreatitis: A Review. *JAMA*, 322(24), 2422. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.19411>
- Szentesi, A., Tóth, E., Bálint, E., Fanczal, J., Madácsy, T., Laczkó, D., Ignáth, I., Balázs, A., Pallagi, P., Maléth, J., Rakonczay, Z., Kui, B., Illés, D., Márta, K., Blaskó, Á., Demcsák, A., Párniczky, A., Pár, G., Gódi, S., ... Hungarian Pancreatic Study Group. (2016). Analysis of Research Activity in Gastroenterology: Pancreatitis Is in Real Danger. *PLOS ONE*, 11(10), e0165244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165244>

- Talathi, S. S., Zimmerman, R., & Young, M. (2024). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532912/>
- Whitcomb, D. C. (2013). Genetic Risk Factors for Pancreatic Disorders. *Gastroenterology*, 144(6), 1292–1302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.069>
- Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., Ulrich, C. D., Martin, S. P., Gates, L. K., Amann, S. T., Toskes, P. P., Liddle, R., McGrath, K., Uomo, G., Post, J. C., & Ehrlich, G. D. (1996). Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature Genetics*, 14(2), 141–145.
<https://doi.org/10.1038/ng1096-141>
- Willoughby, D. (2012). Organization of cAMP signalling microdomains for optimal regulation by Ca²⁺ entry. *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 246–250.
<https://doi.org/10.1042/BST20110613>
- Zhang, I. X., Herrmann, A., Leon, J., Jeyarajan, S., Arunagiri, A., Arvan, P., Gilon, P., & Satin, L. S. (2023). ER stress increases expression of intracellular calcium channel RyR1 to modify Ca²⁺ homeostasis in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*, 299(8), 105065. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105065>
- Zhang, I. X., Raghavan, M., & Satin, L. S. (2020). The Endoplasmic Reticulum and Calcium Homeostasis in Pancreatic Beta Cells. *Endocrinology*, 161(2), bqz028.
<https://doi.org/10.1210/endocr/bqz028>
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
- Seidler, N. W., Jona, I., Vegh, M., & Martonosi, A. (1989). Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(30), 17816–17823.

**A 37. OTDK
BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Barnai Szintia** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **Az E-syt1 funkciójának tanulmányozása az intracelluláris cAMP és Ca^{2+} jelátvitel összefüggéseiben** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt¹:

Részfeladat ²	A részvétel mértéke (öt fokozatú skálán [#] jellemezve)
Sejtek tenyésztése és fenntartása (olvasztás, fagyasztás, passzálás, sejtek etetése)	5
Transzfekció (sejtek felnövesztése, plazmidok bejuttatása a sejtekbe)	5
Immunfestés (fixálás, blokkolás, antitestek felvitele)	5
A pályamunkában leírt mikroszkópok használata (Leica Stellaris konfokális mikroszkóp, Fluorescens resonance energy transfer (FRET) mikroszkóp)	4
Az adatok statisztikai feldolgozása	2
...	...

Kelt: Szeged, 2024.11.07.

Kétszerzős pályamunka esetén:

Barnai Szintia
Pályamunkát benyújtó hallgató
Barnai Szintia
aláírása

Társszerző (név)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Dr. Kúthy-Sutus Enikő
Témavezető

Dr. Kúthy-Sutus Enikő, tudományos munkatárs
aláírása

¹ A kutatási projekt azon részfeladatait, amelyekben egyáltalán nem vett részt, ne tüntesse fel a listában.

² Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható, bővíthető.

#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

^{m1}A szerző hallgató a 3 éves terepi munkából egy évben vett részt. Ebben az évben társával együtt végezte a terepi munkát, melynek során a pályamunka alapját képező fajokra vonatkozó anyagok begyűjtését a terület/vizsgálati időszak egyik felében teljes mértékben ő végezte önállóan. A fennmaradó részében az anyaggyűjtést más végezte.

^{m2}A felhasznált 5 primer közül a szerző hallgató hármát maga tervezett, a többit készen kapta.

^{m3}A western-blot reakciók tervezését (pl.: mintasorrend+mennyiség), elvi összeállítását a szerző hallgató maga végezte, ugyanakkor a munka „wet” részét jórészt a laborhoz tartozó asszisztens végezte. A kiértékelést a szerző hallgató végezte.

^{m4}Az adatok statisztikai feldolgozását a szerző hallgató témavezetőjének folyamatos segítségével végezte.