

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék
SZTE-SZAOK Belgyógyászati Klinika

Biológia TDK 2022. tavaszi forduló

A STIM1/ORAI1/SPCA2 fehérjekomplex esszenciális szerepe a CFTR aktivációjában primer poláris epitél sejtekben

Essential role of the STIM1/ORAI1/SPCA2 protein complex in CFTR activation
in primary polarized epithelial cells

Susánszki Petra

Biológus mester szakos hallgató
MSc. II. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Maléth József
Tudományos főmunkatárs

Varga Árpád
Ph.D. hallgató

Belső konzulens:

Dr. Csontné Dr. Kricsi Mónika
Habilitált egyetemi adjunktus



Szeged, 2022

1.RÖVIDÍTÉS JEGYZÉK

AC: Adenil- cikláz	Krt19: Citokeratin 19
AC1: Adenil- cikláz 1	Napa: NSF kapcsolófehérje α
AC2: Adenil- cikláz 2	Ocln: Okkludin
AC3: Adenil- cikláz 3	ORAI1: Kalcium felszabadulás-aktivált kalcium csatorna fehérje 1
AC4: Adenil- cikláz 4	Ormdl3: ORMDL szfingolipid bioszintézis szabályozó 3
AC5: Adenil- cikláz 5	PBS: foszfáttal puffertolt sóoldat
AC6: Adenil- cikláz 6	PM: Plazmamembrán
AC7: Adenil- cikláz 7	Rhbdl2: Romboidhoz kapcsolódó fehérje 2
AC8: Adenil- cikláz 8	SPCA: Szekretoros útvonal Ca^{2+} ATPáz
AC9: Adenil- cikláz 9	SPCA2: Szekretoros útvonal Ca^{2+} ATPáz 2 (ATP2C2)
Amy1a: Amiláz-1a	SPCA1: Szekretoros útvonal Ca^{2+} ATPáz 1 (ATP2C2)
Amy1b: Amiláz-1b	Septin4: Fehérje kódoló gén
Amy1c: Amiláz-1c	Septin7: Fehérje kódoló gén
ANO1: Anoktamin 1	SICE: Raktár független Ca^{2+} beáramlás
BSA: Marha szérum albumin	SOCE: Raktár függő Ca^{2+} beáramlás
Ca^{2+}: Kalcium-ion	Sox9: SRY-box transzkripció faktor 9
Calm1: Kalmodulin 1	STIM1: Stromális interakciós molekula 1
Calm2: Kalmodulin 2	STIM2: Stromális interakciós molekula 2
Calm3: Kalmodulin 3	Tmem20: Transzmembrán fehérje 20
Calm4: Kalmodulin 4	Tmem178a: Transzmembrán fehérje 178a
Calm5: Kalmodulin 5	Tmem178b: Transzmembrán fehérje 178b
cAMP: 3'-5'-Ciklikus adenzin-monofoszfát	Ubqln: Ubiquillin
Cav1: Kaveolin 1	
CFTR: Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor	
Cdh5: Kadherin5	
Cl^-: Klorid-ion	
CPA: ciklopiázinsav	
Cracr2a:	
ER: Endoplazmatikus retikulum	
FBS: Magzati marha szérum	
FOXA2: Forkhead Box A2 transzkripció faktor	
Homer1: Homer fehérje homológ 1	
HNF1-β: HNF1 Homebox B transzkripció faktor	
Ins: Inzulin	
Kcnn3: Kálium-kalcium-aktivált-csatorna N alcsalád, 3. tag	

TARTALOM

1. RÖVIDÍTÉS JEGYZÉK	2
2. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	4
3. BEVEZETÉS	5
3.1. A CFTR szerepe a poláris epitél sejtek fiziológiájában és patofiziológiájában	5
3.2. A CFTR felépítése és szignalizációs kapcsolatai	6
3.3. A raktár függő kalcium beáramlás (Store Operated Calcium Entry – SOCE) nem kizárólagos szerepe a Ca^{2+} háztartás irányításában.	8
4. CÉLKITŰZÉSEK	10
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
5.1. Egér és humán hasnyálmirigy organoid kultúrák létrehozása	11
5.2. Egér és humán hasnyálmirigy organoid kultúrák fenntartása	11
5.3. Humán hasnyálmirigy organoidok krioprezerválása	12
5.4. Egér hasnyálmirigy duktális fragmentumok izolálása.....	12
5.5. Fluoreszcens mikroszkópia.....	13
5.6. RNS izolálás és transzkriptom analízis	13
5.7. Humán hasnyálmirigy organoid metszetek immunfluoreszcens festése	13
5.8. Géncsendesítés siRNS interferenciával	14
5.9. Sztohasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (dSTORM)	14
5.10. Statisztika.....	15
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	16
6.1. Humán és egér hasnyálmirigy organoidok létrehozása és duktális identitásuk vizsgálata.	16
6.2. Az ORAI1 Ca^{2+} csatorna konstitutív működését az SPCA2 szabályozza a primer hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben.....	18
6.3. Az SPCA2 részleges átfedést mutat az apikális membránban elhelyezkedő CFTR csatornával primer epitél sejteken.	21
6.4. Az SPCA2 a STIM1-ORAI1 kapcsolat erősítésével biztosítja a CFTR működéséhez szükséges ORAI1-en keresztüli konstitutív Ca^{2+} beáramlást.	22
7. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	25
8. TÁVLATI CÉLOK	26
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	27
10. FÜGGELÉK.....	31
11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	38
12. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	39

2. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

A cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) Cl^- és HCO_3^- csatorna, az epitél sejtek ion- és folyadékszekréciójának szabályozásával tartja fenn a különböző szervek homeosztázisát. A csatorna bármilyen diszregulációja vagy hibája olyan patofiziológias állapotokhoz vezethet, mint a cisztás fibrózis (CF), a CF-hez társuló májbetegségek, hasnyálmirigy-gyulladás vagy a kolera bakteriális toxin által kiváltott túlzott szekréció. Bár a cAMP/PKA-függő foszforiláció a csatorna aktiválásának egyik központi eseménye, a cAMP és a Ca^{2+} jelátviteli útvonalak közötti szinergia több szinten is finomhangolja a CFTR által közvetített szekréciót. Csoportunk az elmúlt években megfigyelte, a CFTR aktivitásának nagymértékű függését az ORAI1 csatornán keresztüli Ca^{2+} beáramlástól, az apikális plazmamembránban (PM) lezajló jelátvitel molekuláris szerveződése azonban nagyrészt ismeretlen maradt.

Munkánk során ezért célul tűztük ki az ORAI1 Ca^{2+} csatorna-függő CFTR szabályozás hátterében meghúzódó Ca^{2+} szignalizáció molekuláris elemeinek és működésének feltárását.

Kísérleteinkhez humán és egér hasnyálmirigy szövetekből organoid kultúrákat hoztunk létre. Az organoidok identitását RNS szekvenálással és immunfluoreszcens jelölési eljárásokkal vizsgáltuk. Az intracelluláris Ca^{2+} szintet élősejtes kísérleteinkben FURA2-AM indikátorral monitoroztuk. A fehérje interakciós vizsgálatokat szuperrezolúciós, direkt sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópiával (dSTORM) és az ezt követő klaszter analízissel végeztük.

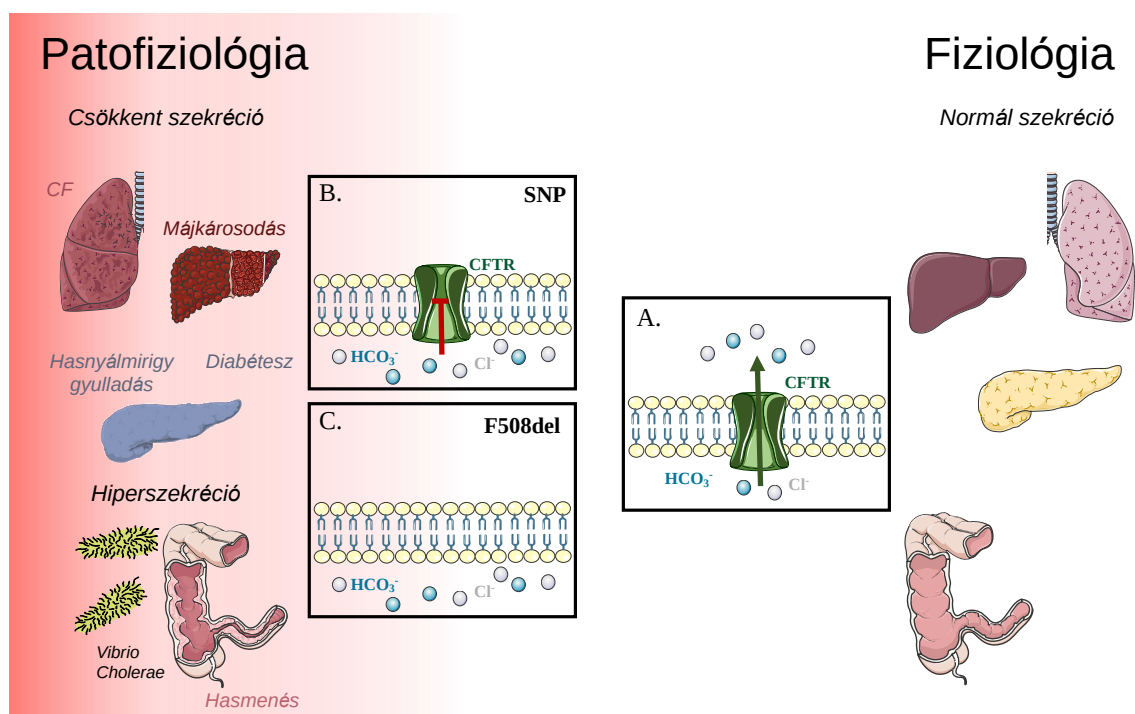
Kadaver donoroktól származó hasnyálmirigy mintákból organoid biobank építésébe kezdtünk. Az organoidokat felépítő sejtek duktális identitását RNS szekvenálási eredményeink, valamint a poláris CFTR, a citoplazmatikus KRT19, és sejtmagi SOX9, HNF1B, FOXA2 fehérjék kimutatásával igazoltuk. Kísérletesen bemutattuk az ORAI1 csatorna konstitutív működését és a bazális Ca^{2+} szinthez való hozzájárulását primer epiteliális sejtekben. Igazoltuk, hogy az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában elhelyezkedő SPCA2 (Secretory Pathway Ca^{2+} -ATPase) elengedhetetlen az ORAI1 csatorna működéséhez, mivel erősíti a ER Ca^{2+} depléciónélküli, STIM1-ORAI1 interakciót az ER-PM junkciókban.

Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az SPCA2 által mediált, ER-depléción független, ORAI1 csatornán keresztüli Ca^{2+} beáramlás határozza meg a CFTR fiziológiai aktivitását a polarizált epithéliumokban. Az általunk feltárt szabályozási mechanizmus elengedhetetlen az epitél sejtek ionszekréciójának koordinálásához.

3. BEVEZETÉS

3.1. A CFTR szerepe a poláris epitél sejtek fiziológiájában és patofiziológiájában

Az epitéliumok a különféle szervek ion és víz szekréciójának precíz koordinálásával határozzák meg a testnedvek összetételét és mennyiségét, ezáltal fenntartják a szervezet homeosztázisát [1]. A poláris epitél sejtekben a transzcelluláris sószekréciót elsősorban a Cl^- kilépése irányítja az apikális membránon keresztül [2]. A szekréció sebesség limitáló lépéseként is nevezett Cl^- kiáramlást túlnyomórészt a szintén apikálisan elhelyezkedő, CFTR (Cisztás Fibrózis Transzmembrán Konduktancia Regulátor) Cl^- és HCO_3^- csatorna aktivitásától, kisebb részben pedig egyéb Ca^{2+} dependens Cl^- csatornák (pl.: TMEM16A/ANO1) vagy transzporterek (pl.: SLC26A9) működésétől függ [3]–[5].



1. ábra A CFTR normál és hibás működésének szerepe a különféle szervek fiziológiás és patofiziológiás állapotainak kialakításában. A sematikus ábra a funkcionális, apikális CFTR csatorna működését (A.), valamint a nukleotid polimorfizmusok (B.) és az F508del mutáció okozta defektusokból eredő (C.) zavarokat mutatja be.

Az 1989-es felfedezése óta a CFTR az egyik legintenzívebben kutatott fehérjévé vált, feltehetően a cisztás fibrózisban (CF) betöltött központi szerepe miatt [6], [7]. A CF a kaukázusi populáció leggyakoribb genetikailag öröklődő betegsége, amely Európában megközelítőleg 3500 újszülöttről 1-et érint [8], [9]. Jellemzően a betegségben szenvedő egyének 70-90%-a legalább az egyik allélon hordozza az úgynevezett F508del mutációt, amely a CFTR hibás összeszereléséhez és így elégtelen membrántranszportoz vezet [10]. Az évek során mutációk egész sorát (pl.: egyetlen nukleotid polimorfizmus – SNP) azonosították, amelyek

különböző mértékben járulnak hozzá a CF progressziójához [11]. A betegségben a szekréciós elégtelenség többszervi manifesztációja olyan kórképeket eredményezhet, mint például a béllezárodási szindrómák, CF társított májbetegség, diabétesz vagy hasnyálmirigy gyulladás [12]–[15]. A halálozási ok azonban többnyire a tüdőben kialakult patológiás állapotnak köszönhető, ahol a CFTR koordinálta szekréció hiányában létrejövő sűrű, nyálkaszerű mucin elzárja a légutakat, amivel párhuzamosan a virális és bakteriális patogének elterjedésével végzetes gyulladás alakulhat ki [16]. Nem csupán a CFTR alulműködése okoz potenciálisan halált kiváltó kórképeket. A kolera enterotoxinja a CFTR aktivációjával okoz bérrendszeri tüneteket, az így kiváltott hasmenés kiszáradáshoz és halálhoz vezethet [3], [17]. Ezen okok miatt a CFTR korrekcióját és gátlását megcélzó potenciális terápiák kutatása és fejlesztése jelenleg is intenzív tudományos terület [18], [19].

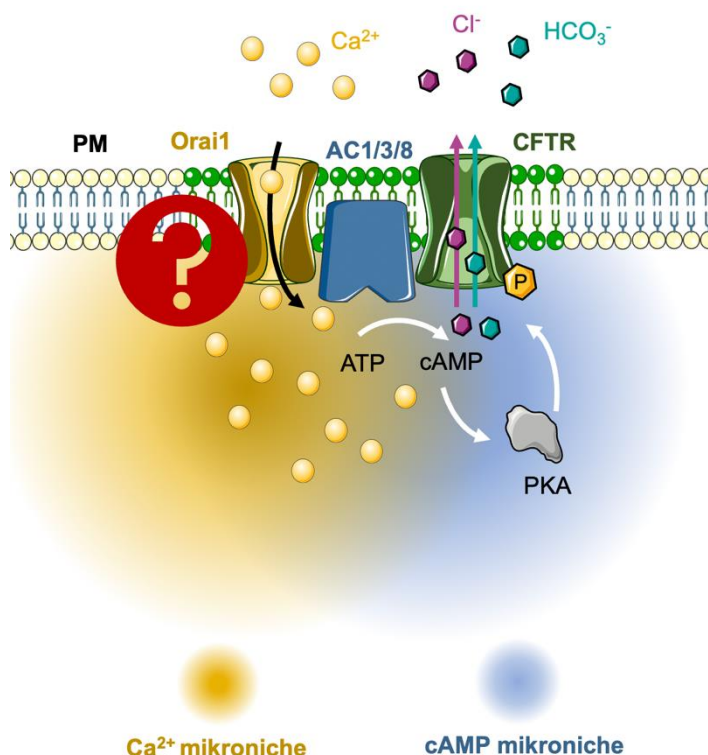
3.2. A CFTR felépítése és szignalizációs kapcsolatai

A CFTR az ABC (ATP-binding cassette) transzporterek családjába tartozó csatorna, amelyek jellemzően ATP hidrolízissel mozgatják szubsztrátjaikat intra- vagy extracelluláris irányba. Szerkezetüket tekintve hagyományosan konzervált felépítést mutatnak. A CFTR fehérje ehhez hasonlóan öt doménből áll. Egy szabályzó (R-regulatory), két-két transzmembrán (TM-transmembrane) és citoplazmatikus nukleotid kötő domén (NBD-nucleotide binding domain) építi fel [20], [21]. A CFTR kapuzását (nyitását/zárását) két folyamat határozza meg. Az aktivációhoz a citoszolikus R-domén kináz-függő foszforilációja szükséges míg a nyitást az NBD ATP kötése irányítja [22]–[24]. A csatorna zárt állapotában nem foszforilált, a reguláló domén pedig az NBD1-hez kötődik, megakadályozva az NBD1 és NBD2 közötti interakciót, így az ATP molekula hidrolízisét [20].

A CFTR foszforilációját számos kináz enzim végezheti. A Protein Kináz A általi foszforiláció a csatorna aktivitásának kulcsfontosságú szabályozója [22], [24]. Azonban számos más kináz is képes foszfát csoport elhelyezése útján kiváltani a CFTR aktiválását. Kimutatták például a Protein Kináz C (PKC) általi részleges CFTR aktivációt (az R-domén 686. és 790. szerin aminosav foszforilációjával), ami hozzájárul a későbbi PKA okozta teljes csatorna aktivitás kiváltáshoz [23], [25]–[28]. Az AMP-aktivált kináz (AMPK) a CFTR C-terminálisához kötődve képes a csatorna foszforilációjára és a zárt állapot stabilizálására, feltehetően a csatorna finomhangolását végezve ezzel [29]. A tirozinkinázok, közül a p60c-Src és a prolinban gazdag tirozinkináz 2 (PYK2) egyaránt képes aktiválni a CFTR mediálta Cl⁻ áramot [30], [31]. Korábbi kutatások azt is megállapították, hogy a CaM kináz I, és a cGMP-függő fehérje kinázok egyes izoformái is képesek a CFTR foszforilációjára, azonban egyelőre kizárólag az utóbbi szerepéről

derültek ki részletek, mégpedig az enterotoxinok által kiváltott hiperszekréciós hasmenésben betöltött aktivációs hatásairól [25], [32].

A CFTR tehát egy főként cAMP-PKA útvonal által aktivált Cl^- csatorna. Az utóbbi években azonban számos tanulmány kiemelte például a Ca^{2+} jelátvitel fontosságát az aktiváció során, valamint rámutatott a Ca^{2+} és a cAMP jelátvitel szinergizmusára, az epitél sejtek által ellátott szekréciós folyamatokban [33]. A két szignalizációs útvonal egyik kapcsolódási pontjai a cAMP molekulákat előállító fehérjecsald, az Adenil ciklázok (AC) azon tagjai, melyek az úgynevezett Ca^{2+} és Kalmodulin aktivált AC-k. Megkülönböztetünk Ca^{2+} /kalmodulin aktivált (AC1; AC3 és AC8) Ca^{2+} gátolt (AC5; AC6) és Ca^{2+} inszenzitív (AC2; AC4; AC7; AC9) AC tagokat [34], [35]. A hasnyálmirigy epitél sejtjeiben már igazolták az AC fehérjék és a Ca^{2+} szignalizáció közötti kommunikációt gyulladásos környezetben, ahol a megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} szint represszálta a Ca^{2+} gátolt AC6-ot, ami így csökkent folyadékszekrécióhoz vezetett [34]. Egy másik publikációban azt is bemutatták, hogy a CFTR aktiválódhat egy másik, PKA független módon, az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedése mellett. A folyamatban Ca^{2+} kötő kalmodulin közvetlen módon kapcsolódik a CFTR R doménjéhez, majd foszforiláció függő módon befolyásolja csatorna aktivitását [36].



Csoportunk az elmúlt évek során, a CFTR aktivitásának hátterében álló szinergista szignalizációs kapcsolatot kutatta. Azt a megfigyelést tettük, hogy a CFTR aktivitását a korábban leginkább a raktár-függő Ca^{2+} beáramlás (Store Operated Calcium Entry – SOCE) folyamatából ismert ORAI1 Ca^{2+} csatorna szabályozza. A két csatorna közötti fizikai kölcsönhatásra utaló távolságot és funkcionális kölcsönhatást egyaránt leírtunk [37]. A jelenség hátterében azonban bizonyosan nem a SOCE

2. ábra A CFTR szabályozás modellje poláris epitél sejtekben (Eredeti ábra forrása: Kiss Aletta Kata Diplomamunkája, címe: A raktár-független Ca^{2+} beáramlás irányító szerepe a szekréciós epitél sejtek CFTR aktivációjában) A piros kérdőjel az ORAI1-et szabályozó ismeretlen fehérjét/fehérjéket és mechanizmust jelöli. PM-plazmamembrán

biztosítja a CFTR aktivitásához szükséges Ca^{2+} mikronichet, mivel az általunk leírt jelenség az endoplazmatikus retikulum (ER) Ca^{2+} depléciójára nélkülözhetetlen. Így a CFTR aktivitásának szabályozása mögött meghúzódó Ca^{2+} szignalizációs elemek és az ER esetleges szerepe még ismeretlen maradt.

3.3. A raktár függő kalcium beáramlás (Store Operated Calcium Entry – SOCE) nem kizárólagos szerepe a Ca^{2+} háztartás irányításában.

A raktárfüggő Ca^{2+} belépés a nem excitábilis eukarióta sejtek Ca^{2+} szignalizációjának egyik központi mechanizmusa, melynek szerepe van az intracelluláris Ca^{2+} egyensúly fenntartásában [38], [39]. A extracelluláris Ca^{2+} beáramlás nélkülözhetetlen például az exocitózis, az enzimszabályozás, a génexpresszió regulációja, a sejtek növekedése, migrációja és proliferációja, valamint az apoptózis szabályozásához [40]. A SOCE aktiválásában, a STIM (Stromális Interakciós Molekula) és az ORAI fehérjecsald tagjai játszanak fontos szerepet [41]. A STIM fehérjék az ER Ca^{2+} szenzoraként működnek, amelyek érzékelik az ER Ca^{2+} raktárak kimerülését. Ekkor a STIM fehérjék oligomerizálódnak, az ER-PM junctionok területére transzlokálódnak és úgynevezett punctákká aggregálódnak. Az ORAI fehérjék, a SOCE PM és pórusképző komponensei. Az ER kimerülés során a STIM fehérjékkel kapcsolódva megindítják az extracelluláris Ca^{2+} beáramlását [40].

A SOCE folyamatában részt vállaló fehérjék hibája azonban számos patofiziológiai állapot kialakulásához hozzájárul. Az örökletes súlyos kombinált immunhiányos szindróma (SCID) egyik formájában szenvedő betegekben hibás ORAI1 működést írtak le, amelyet összefüggésbe hoztak a *ORAI1* gén mutációjával [42]. A STIM1 hiánya számos autoimmun betegséget okozhat, valamint a STIM1 hibájából származó Ca^{2+} diszreguláció szerepe a tumorigenezisben és tumorprogresszióban is fény derült [43], [44].

A SOCE mechanizmusához képest roppant keveset tudunk a STIM/ORAI1-mediált SICE (Store Independent Calcium Entry) útvonalak sejtfunkciókban betöltött szerepéről és a betegségekhez való hozzájárulásokról. Az azonban bizonyos, hogy az ORAI1 a SICE folyamatában való fokozott működését emlőrákból izolált sejteken már megfigyelték egy korábbi tanulmányban, melynek hátterében az ORAI1 potenciális aktivátorát, a szekretoros útvonal Ca^{2+} - ATPáz 2 (SPCA2) túltermelődését figyelték meg [45]. Ez a nem hagyományos kapcsolat az SPCA2 és az ORAI1 között rávilágított a SICE potenciális szerepére olyan folyamatokban is – így például a Ca^{2+} aktivált csatornák működtetése az epiteliális szekrécióban – melyekben a folytonos, de nem globális Ca^{2+} niche fenntartására lehet szükség.

Az SPCA fehérjéknek két tagja ismert, az SPCA1(*ATP2C1*) és SPCA2 (*ATP2C2*), amelyek jelentős hasonlóságot mutatnak szekvenciájuk tekintetében, de eloszlásuk és funkciójuk eltérő [46], [47]. Az SPCA1 az emlősök szöveteiben szinte mindenhol expresszálódik, háztartási génekhez hasonló funkciót tölthet be [48]. Az SPCA2 kifejeződése ezzel szemben, elsősorban, a szekréciós vagy abszorpciós hámsejtekre korlátozódik, így például a tüdő, a bélrendszer, a nyálmirigyek illetve a herék sejtjeiben mutatták ki [46]. Feltételezzük, hogy az SPCA2, a polarizált epitél sejtekben lehetővé teheti az ORAI1 csatorna aktiválását bizonyos membrán kompartmentek területén, irányítva ezzel a Ca^{2+} és egyéb ionok, valamint a víz transzepiteliális transzportját.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Elsődleges célkitűzésünk volt, a CFTR szabályozása mögött meghúzódó Ca^{2+} szignalizáció feltárása primer poláris epitél sejtben. Ehhez epiteliális organoid modelleket kívántunk létrehozni, hogy az azokból származó transzkriptomikai adatokból keressünk potenciális reguláló elemeket. Céljaink közé tartozott, hogy megerősítsük vagy cáfoljuk azon hipotézisünket, hogy a SICE folyamata szerepet játszhat a CFTR aktivitásának finomhangolásában.

Célunk volt továbbá, hogy CFTR szabályozásának általunk feltárt modelljét transzlációs perspektívába helyezzük a jövőbeli esetleges tumorterápiás felhasználáshoz.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Egér és humán hasnyálmirigy organoid kultúrák létrehozása

Kísérleteinkhez FVB/N (8-12 hetes, 20-25g-os) egereket használtunk fel az NIH irányelveinek megfelelően és a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló törvény (2010/63/EU) EU irányelveinek betartásával. A kísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyezte XXI./1541/2020 engedélyszámmal. A humán hasnyálmirigy minták kadaver donoroktól származtak (etikai engedély száma: 37/2017-SZTE). A szöveti mintákat mechanikai disszociációval, penge segítségével apró darabokra (megközelítőleg 1 mm²) vágtuk. Ezt követően enzimatis emésztéssel sejteket izoláltunk, melyhez az általunk frissen összeállított emésztő médiumot használtuk fel (**Függelék, 4. táblázat**). Az emésztést Erlenmeyer lombikban, 37°C-on vertikális rázó inkubátorban 165 fordulatszámon (revolutions per minute - rpm) végeztük. Az emésztés állapotát - sejtek és sejtklaszterek kiválását a szövetdarabokból - 10 percenként sztereomikroszkóp alatt ellenőriztük. Az emésztés sikerességét a szöveti darabok szétesése, a kisebb, 8-10 sejtből álló klaszterek, illetve az egysejtes állapotú heterogén szuszpenzió jelezte. A sejteket összegyűjtöttük (4 °C, 750 rpm, 10 perc), majd ezt követően a sejtpelletet mosó médiummal (**Függelék, 5. táblázat**) tisztítottuk három alkalommal (4 °C, 750 rpm, 10 perc). Az utolsó mosást követően a sejszuszenziót Matrigel mátrixba helyeztük, majd 37°C-ra előmelegített 24-lyukú sejtenyésztési lemezek közepére, 10 µl térfogatú, úgynevezett Matrigel dómokat pipettáztunk vágott végű pipettahegy segítségével. Mivel az általunk használt mátrix 4°C-ig folyékony, magasabb hőmérsékleten pedig szilárdul, a sejteket tartalmazó dómokat 37°C-os inkubátorba helyeztük 5 percre. Ezt követően meghatározott összetételű, szűrt (18 G-s tű, 20 ml-es fecskendő és 22 µm pórusátmérőjű szűrő) tápoldatot (**Függelék, 6. táblázat**) mértünk a dómokra. Az így létrehozott kultúrát állandó 37°C-os és 5%-os CO₂ tartalmú sejt-és szövettenyésztési inkubátorban tároltuk és a dómokon 2 naponta cseréltünk tápfolyadékot. A felhasznált anyagok pontos nevét és katalógus számát a **Függelék 1-6. táblázatai** tartalmazzák.

5.2. Egér és humán hasnyálmirigy organoid kultúrák fenntartása

Az egér és humán organoidok fenntartásához a sejt kultúrákat 6-8 naponta passzáltuk (szubkultúráltuk). A passzálás során Matrigel dómokat 1 ml-es végtérfogatú pipetta segítségével elválasztottuk a 24 lyukú sejtenyésztési lemezekről, azokat 15 ml-es Falcon csőbe tettük, majd centrifugálással összegyűjtjük a sejteket (4°C, 750 rpm, 10 perc). Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk és a sejtpellet méretétől függően 4-8 ml 25 V/V%-os TrypLE Express

– DPBS (1X) oldatban szuszpendáltuk a sejteket. Az organoidok egysejtes állapotra történő disszociációját vertikális rázóinkubátorban végeztük (37°C, 165 rpm 15 perc). Az emésztés állapotát fénymikroszkóp segítségével ellenőriztük és a folyamatot az organoidok teljes disszociációjáig folytattuk. Sikeres emésztés esetén ismét összegyűjtöttük a sejteket (4°C, 750 rpm, 10 perc). A tisztítási lépésektől elvégzett folyamat lépései megegyeztek az előző fejezetben (6.1.) ismertetett metodikával. A tumor rezekátum mintából származó organoidok létrehozása a jelen leírással teljesen megegyezett.

5.3. Humán hasnyálmirigy organoidok krioprezerválása

Az organoidok krioprezervációs előkészítéséhez egysejtes állapotú sejtszuspenziót hoztunk létre, amely folyamat megegyezik a 6.2. fejezetben leírtakkal. A fagyasztáshoz használt médium összetétele a **Függelék 7. táblázatában** található. A mintákat Mr. Frosty™ fagyasztó tárolóban -80 °C-on, 24 órán át tartottuk, majd ezt követően folyékony nitrogénbe helyeztük felhasználásig.

5.4. Egér hasnyálmirigy duktális fragmentumok izolálása

Az FVB/N egereket 270 mg/kg dózisú pentobarbitállal termináltuk, ezt követően az egyeden medián laparotómiát végeztünk és eltávolítottuk a hasnyálmirigy szövetet. A mintát 4°C-os hőmérsékletű DMEM/F12 oldatba helyeztünk. Az izoláláshoz a szövetbe izoláló oldatot (összetétele: 100 U/ml IV-es típusú kollagenáz enzim, 0.1 mg/ml szójabab tripszin inhibitor, 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA), DMEM/F12 médiumban beoldva) injektáltunk, majd szike segítségével 4 darabra vágtuk és izoláló oldatot tartalmazó Erlenmeyer-lombikba helyeztük. A mintát vertikális rázóinkubátorba helyeztük (37 °C, 30 perc). Az előemésztett hasnyálmirigy szöveten centrifuga használata nélküli ülepítéssel, háromszor mosást végeztünk DMEM/F12 médium segítségével. Ezt követően 4°C-os hordozómédiumban tároltuk (összetétele: 0.1 mg/ml szójabab tripszin inhibitor, 30 mg/ml BSA, DMEM/F12 médiumban beoldva). Az intralobuláris és interlobuláris duktuszokat mikrodisszekcióval izoláltuk, azokat fénymikroszkóp alatt választottuk szét a környező szövetektől. Az intralobuláris duktuszok és az erek megkülönböztetésében a vörösvértestek hiánya, az epitél sejtsor jellemző morfológiája, valamint a duktuszok külső átmérőjéhez viszonyított nagyméretű lumene volt segítségünkre. Az izolálás befejezését követően a duktális fragmentumokat steril tápoldatot tartalmazó Petri-csészébe tettük. Az izolált duktális fragmenteket inkubátorban tároltuk a további felhasználásig (5%-os CO₂ szint, 37°C). (**Függelék, 8. táblázat**)

5.5. Fluoreszcens mikroszkópia

Organoidokat vagy izolált hasnyálmirigy duktális fragmentumokat poli-L-lizinnel fedett fedőlemezre tapasztottuk ki és inkubáltuk HEPES-oldatban 30 percig (37 °C-on, 5 %-os CO₂). A Ca²⁺ mérésekhez Fura2-AM, az intracelluláris Cl⁻ szint változásokhoz, pedig MQAE fluoreszcens festéket alkalmaztunk. A kísérletek során Olympus IX73 inverz mikroszkópot használtunk. A fluoreszcens festékkel töltött mintákat Olympus CoolLED PE-4000 rendszerrel gerjesztettük. A fluoreszcens jelek rögzítéséhez Hamamatsu Orca-Flash 4.0 sCMOS kamerát és 20 X vízbe merülő objektívet (Olympus; NA: 0,8) 1 s felbontással használtunk. A kísérletek során, a fluoreszcens intenzitás értékeit az Olympus cellSense szoftverrel rögzítettük. Az így kapott adatok normalizációját és drift-korrekcióját követően számoltuk ki a maximális válaszreakciók mértékét, majd átlaggörbéket készítettünk Microsoft Excel programban. A kísérletben alkalmazott anyagokat, reagenseket, farmakológiai gátlószereket a **Függelék 9. és 10. táblázata** tartalmazza.

5.6. RNS izolálás és transzkriptom analízis

Az organoidokat összegyűjtöttük, egysejtes állapotú sejtszuspenziót hoztunk létre enzimatis emésztéssel (6.2. fejezet), majd a sejt pelletből RNS-t tisztítottunk. Az izoláláshoz NucleoSpin RNA Plus kit-et használtunk és a kithez mellékelt protokoll alapján, a gyártó utasításai szerint végeztük a tisztítást. Az RNS szekvenálást és a transzkriptom analízist a DeltaBio Ltd. 2000 végezte számunkra. A folyamat Illumina NextSeq 500 szekvenátor alkalmazásával történt. A génexpressziós szintjét az összehasonlíthatóság érdekében TPM értékekben határoztuk meg. (TPM= transzkript/millió transzkript érték) (**Függelék, 11. és 12. táblázat**)

5.7. Humán hasnyálmirigy organoid metszetek immunfluoreszcens festése

A még kultúrában lévő organoidokat Trypan Blue-val festettük meg (100 µl Trypan Blue + 400 µl DPBS (1X)) a későbbi láthatóság érdekében (10 perc 37°C). A felesleges festéket DPBS tisztítással távolítottuk el. A dómokat spatula segítségével kriomátrixba ágyasztuk, majd azt 20 percig, -20°C-on fagyasztottuk. Ezután 7 µm-es metszeteket készítettünk (Leica CM1860 UV Cryostat), melyeket tárgylemezre helyeztünk. Ezt követően 4 % paraformaldehid (PFA) oldatot használtunk a fixáláshoz. A PFA-t a metszetekről PBS oldattal távolítottuk el (3 x 5 perc, RT - room temperature / szobahőmérséklet). A feltárást hővel és citrátos oldattal (0,735 g nátrium citrát 250 ml desztillált vízben oldva és 1,25 ml 10%-os TBST (6,05 g Tris, 0,1% Tween 20, 0,349 g KCl, 8,76 g NaCl, 1 liter desztillált vízben beoldva) végeztük. 92°C-on 30 percig főztük a metszeteket. Ezt követően a mintákat háromszor mostuk PBS oldattal 15 percig. Az aspecifikus helyek lekötését, a blokkolás folyamatát 10%-os BSA-PBS oldatban 1,5 órán át

37°C-os inkubátorban végeztük. Az elsődleges antitesteket 1:200 hígításban használtuk 10%-os BSA-PBS oldatban (4°C, 16 óra, nedves kamrában). Az inkubációs idő leteltével ismét a metszetek háromszori mosása következett, a korábban ismertetett módon. A másodlagos antitestek hígítását rendre 1:400 arányban végeztük 10 %-os BSA-PBS oldatban (RT, fénytől elzárt környezetben, 2 órán keresztül). Az inkubációs idő leteltével és az ismételt mosás lépéseket követően (3 x 5 perc, PBS), a sejtmag festést és a minták fedését egyidőben, a ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI reagenssel végeztük. A sötétben, szobahőmérsékleten történő száradást követően a metszeteket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. (**Függelék, 13.táblázat**)

5.8. Géncsendesítés siRNS interferenciával

Az izolált egér duktális fragmentumok génspecifikus géncsendesítéséhez, azokat 50 nM siGLO transzfekciós indukátorral vagy 50 nM siRNS-sel Opti-MEM-mel és Lipofectamine 2000 reagenssel transzfektáltuk organoid tápfolyadékban (**Függelék, 6.táblázat**). Méréseinket a 24 órás csendesítést követően végeztük (**Függelék,14.táblázat**).

5.9. Sztohasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (dSTORM)

A kísérlethez szükséges HeLa sejteket fedőlemezen növesztettük majd ezt követően plazmid transzfekciót végeztünk STIM1-YFP, ORAI1-HA és SPCA2-MYC jelölt plazmidokkal. A transzfekcióhoz Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenst és Opti-MEM™ médiumot használtunk a mellékelt protokoll alapján. A SOCE aktiválásához 25 µM ciklopiazinsav (CPA) kezelést alkalmaztunk. A minták egyidejű fixálásához és feltárásához -20°C-os tömény metanolt alkalmaztunk (-20°C, 5 perc). Azt ezt követő lépések megegyeznek 5.7. fejezetben leírtakkal. A jelöléshez használt elsődleges ellenanyagokat, (anti-Myc-Tag, anti-GFP) valamint az anti-HA-tag monoklonális konjugált antitestet (Alexa Fluor 488) 1:300 arányban hígítottuk és használtuk. A másodlagos antitesteket, (Donkey anti-mouse Alexa Fluor 647, Goat-anti-rabbit Alexa Fluor 568 1:600 arányú hígításban alkalmaztuk. A mintákat az úgynevezett „blinking” puffer oldatban vizsgáltuk, amely enzimatis reakciókkal köti le a nagyenergiájú lézer alkalmazásának hatására keletkező reaktív oxigén gyököket, így megvédve a fluorofórok korai kiégését és elősegítve azok sötét fázisba tolódását (**Függelék, 16. táblázat**). A szuperrezolúciós mikroszkópos képeket, a Nanoimager S (Oxford Nanoimaging ONI Ltd) berendezéssel készítettük, majd azokat az ONI CODI elnevezésű szoftverével értékeltük ki. A kísérlethez felhasznált anyagok a **Függelék 15. és 17. táblázatában** találhatóak. A minták vizsgálatához a membránról TIRF módban készítettünk képeket.[49]

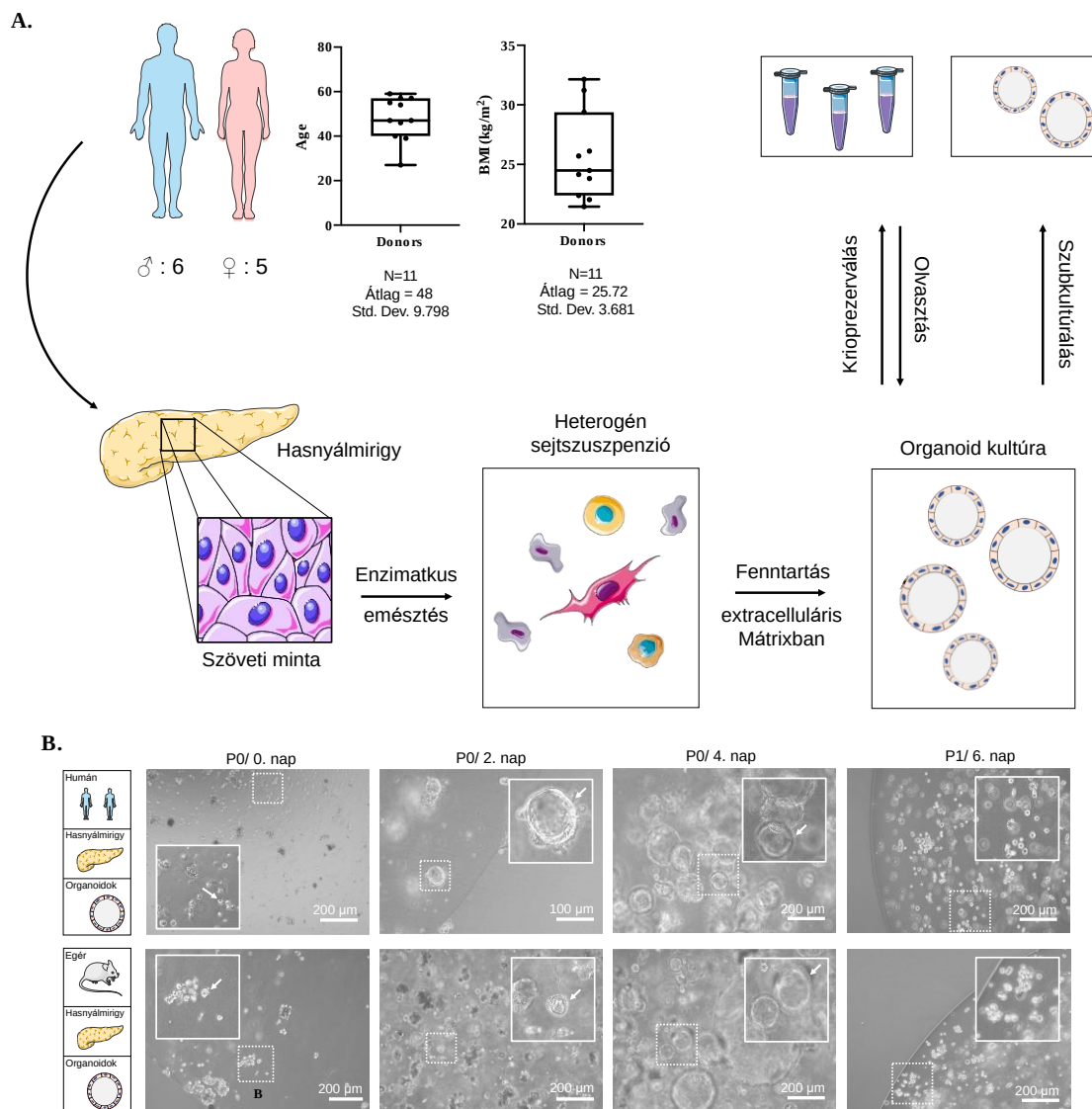
5.10. Statisztika

Az adatokat átlag $\pm$ SEM-ben fejeztük ki. A csoportok közötti szignifikáns különbséget Mann-Whitney-tesztel határoztuk meg. A $P < 0,05$ értéket szignifikánsnak tekintettük. Minden statisztikai elemzést GraphPad Prism szoftverrel végeztünk (8.3.1. verzió).

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1. Humán és egér hasnyálmirigy organoidok létrehozása és duktális identitásuk vizsgálata.

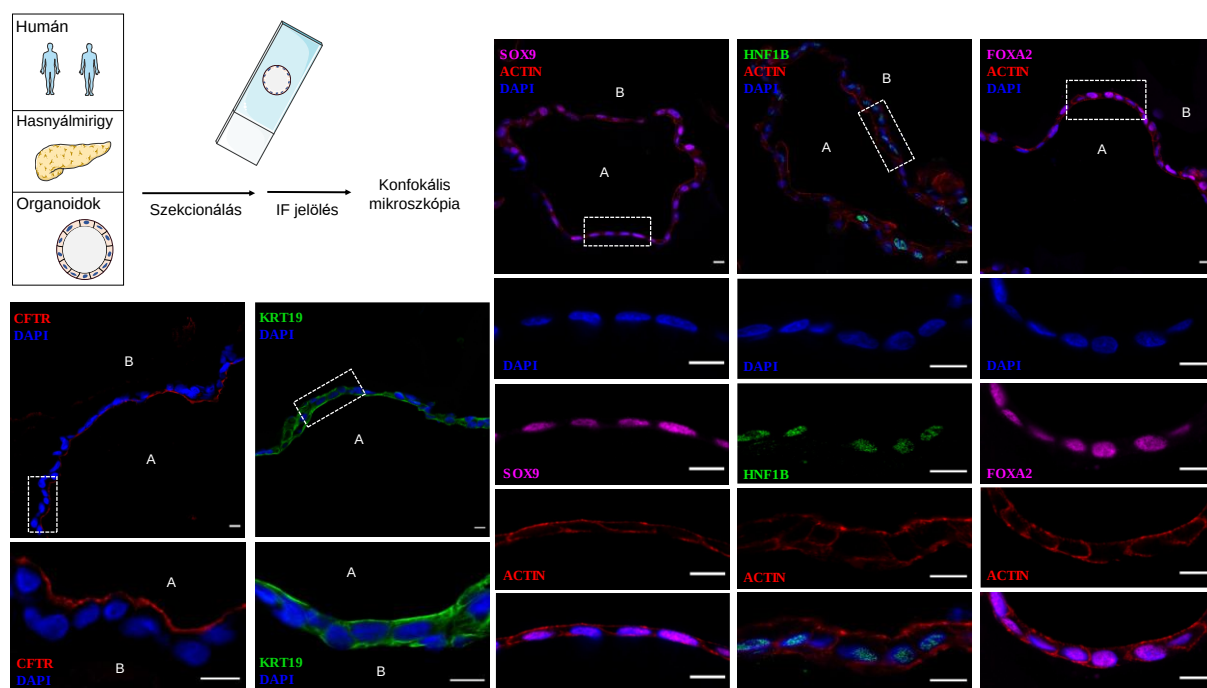
A CFTR és ORAI1 fehérjék közötti funkcionális kölcsönhatás molekuláris mechanizmusának feltárására első lépésben humán kadaver donoroktól származó, valamint FVB/N egerekből, műtéti eljárással eltávolított hasnyálmirigy szövetmintákból, organoid kultúrákat hoztunk létre.



3. ábra A humán hasnyálmirigy organoid biobank építés sematikus ábrája (**A.**) és az organoidok növekedését bemutató fénymikroszkópos képsorozat (**B.**). A képeken látható kinagyított részletek és fehér nyilak egy-egy organoid növekedését reprezentálják az első passzázs utáni állapotig.

A projekt keretén belül 11 nem-diabéteszes donortól származó mintát gyűjtöttünk (6 férfi, 5 nő; átlag életkor: 48 év, Std. dev.: 9,798; átlag BMI:25,72 kg/m^2 , Std. dev.: 3,681). A szövet enzimatus emésztésével kapott heterogén sejtszuspenzióból képződő cisztikus hasnyálmirigy organoidokat az első passzázszt követően krioprezerváltuk, biobank építésébe

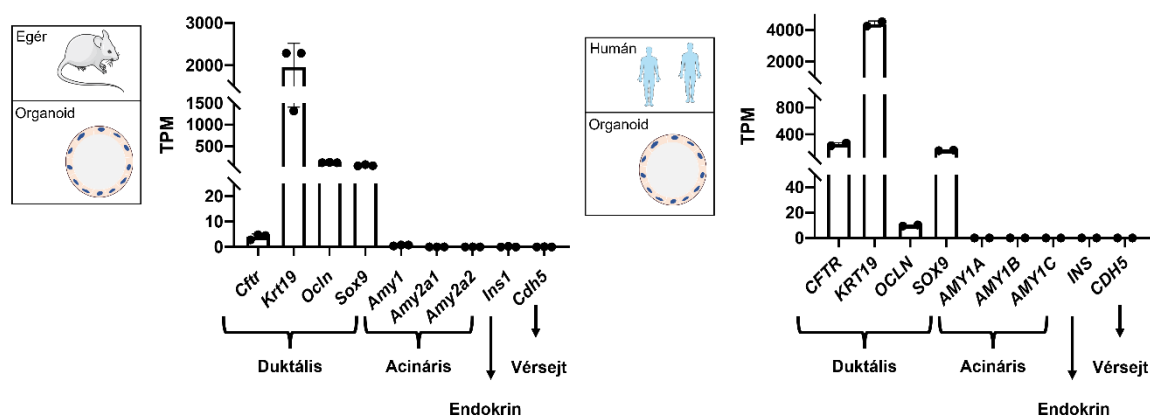
kezdünk (3/A. ábra). A humán és egér hasnyálmirigy organoid kultúrák növekedését fénymikroszkóppal követtük. Az organoidok expansziójától és az extracelluláris mátrix integritásától függően végeztük a passzálásokat, melyek során a háromdimenziós struktúrákat enzimatis disszociációval, egysejtes állapotra bontottuk (3/B. ábra). Az egér organoidok duktális sejtorsát és jellegét csoportunk már korábban bemutatta [50][51]. Így a továbbiakban a humán organoidok jellemzésével foglalkoztunk, hogy megbizonyosodjunk a további vizsgálatokra való alkalmazhatóságukról. A háromdimenziós struktúrákat szekcionáltuk, majd a hasnyálmirigy duktális epitel sejtekre jellemző markerek jelenlétét vizsgáltuk immunfluoreszcens jelöléssel és konfokális képalkotással (4. ábra). A CFTR apikális oldali lokalizációja a sejtors polaritására, míg a KRT19 citoplazmatikus elhelyezkedése a sejt epitel jellegét igazolja, a SOX9, HNF1B és FOXA2 transzkripciós faktorok sejtmagi kifejeződéséből az organoidok duktális jellegére következtettünk, ami alapján alkalmasnak találtuk őket a további transzkriptomikai vizsgálatokra.



4. ábra A humán hasnyálmirigy organoidok duktális sejtorsának vizsgálata immunfluoreszcens jelölési eljárással. (CFTR – Cisztás Fibrózis Transzmembrán Konduktancia Regulátor, KRT19 – Citokeratin 19, SOX9 – SRY Box transzkripciós faktor 9, FOXA2 – Forkhead Box A2 transzkripciós faktor, HNF1 β – HNF1 Homebox B transzkripciós faktor, ACTIN, A: apikális oldal, B: bazolaterális oldal, skála: 10 μ m)

Az organoidokat felépítő sejtek duktális sejtorsának vizsgálatát transzkriptom analízissel folytattuk. Ehhez az organoidokból RNS-t izoláltunk, majd a cDNS könyvtár előkészítését és a szekvenálást a Delta Bio2000 Kft. munkatársai végezték számunkra. A gének kifejeződésének mértékét TPM (transcript/million) értékekben adtuk meg. Az RNS szekvenálási eredményeink

alapján, a ductális epitéliumra jellemző markerek aktív kifejeződését (*CFTR*, *KRT19*, *OCN*, *SOX9*) mutattuk ki. Ezzel szemben a hasnyálmirigy más sejtípusainak például az acinus sejtek, endokrin sejtek és vérsejtek markereit nem detektáltuk. A kapott mintázat humán (N=2) és egér (N=3) organoid kultúráink esetében egyaránt megegyezett, amiből az általunk létrehozott sejt kultúrák tisztaságára következtettünk.

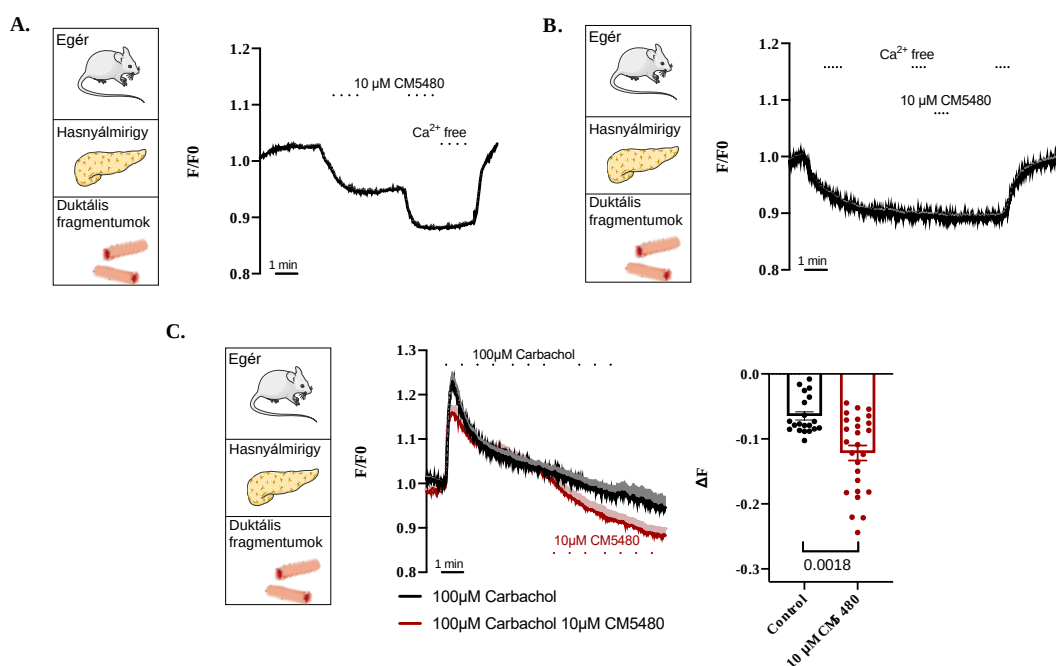


5. ábra Egér (N=3) és humán (N=2) hasnyálmirigy organoidok transzkriptom analízise (TPM=transzkript/millió) Az organoidok tisztán primer ductális epitél jellegének bizonyítása a transzkriptom analízis alapján.

6.2. Az ORAI1 Ca^{2+} csatorna konstitutív működését az SPCA2 szabályozza a primer hasnyálmirigy ductális epitél sejtekben.

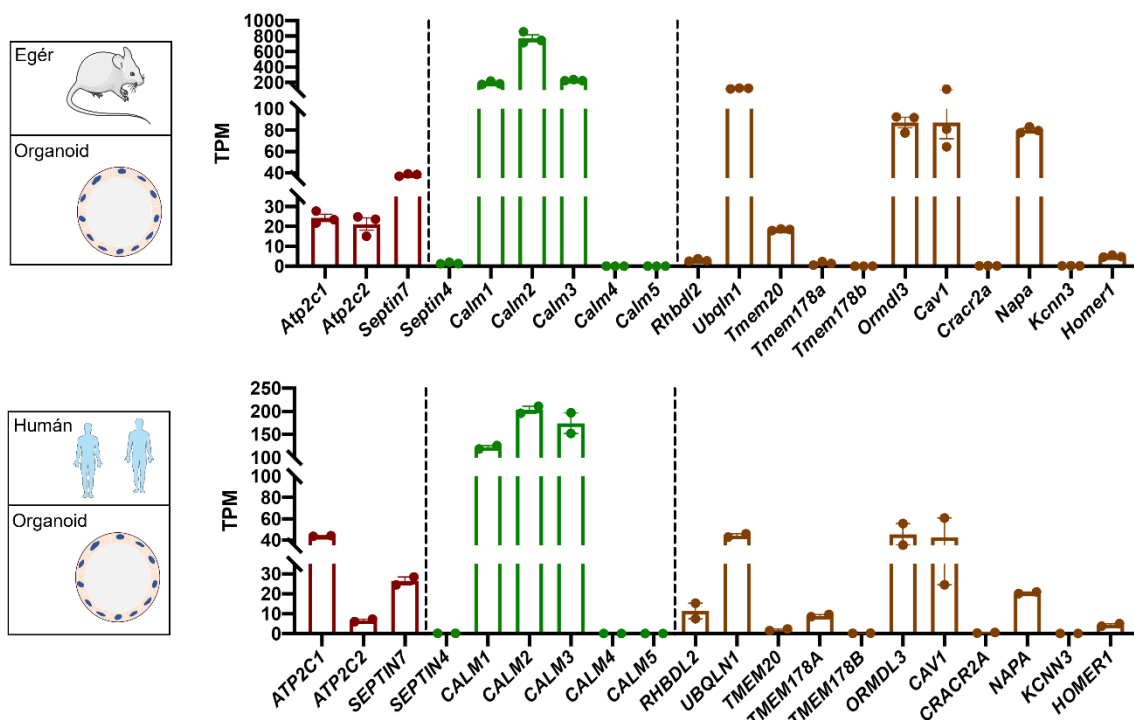
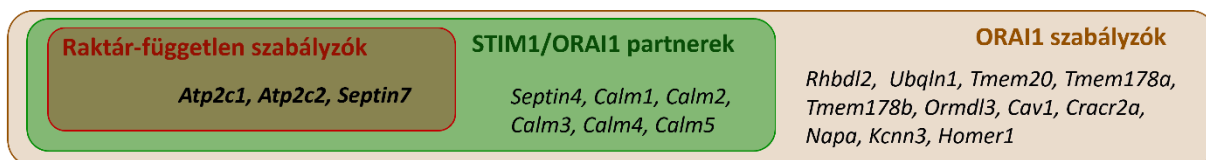
Az a korábbi megfigyelésünk, hogy *CFTR* működése az *ORAI1* csatornán keresztül beáramló Ca^{2+} ionoktól függ, felveti a Ca^{2+} csatorna szerepét a SOCE független folyamatokban, így például a bazális intracelluláris Ca^{2+} szint beállításában. Ennek vizsgálatára FURA2-AM intracelluláris Ca^{2+} indikátor és a CalciMedica cég által rendelkezésünkre bocsátott specifikus *ORAI1* inhibitor (CM4580) alkalmaztunk izolált hasnyálmirigy ductális fragmentumokon a következő kísérleti elrendezésekben. A 10 μM CM4580, Ca^{2+} tartalmú oldatban jelentősen csökkentette az intracelluláris Ca^{2+} szintet, amely az extracelluláris Ca^{2+} megvonással tovább csökkent. (6/A. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy az *ORAI1* csatorna feltehetően konstitutívan aktív, működése pedig hozzájárul a bazális Ca^{2+} szint és egyensúly beállításához a SOCE aktivációja nélkül. Azonban a folyamatban való részvétele, az extracelluláris Ca^{2+} elvonással tovább csökkenthető és a reziduális intenzitás miatt feltehetően nem kizárólagos. Hipotézisünket tovább erősítette, hogy amennyiben a kísérletet az extracelluláris Ca^{2+} elvonásával kezdtük, úgy az *ORAI1* farmakológiai gátlása nem eredményezett további intracelluláris Ca^{2+} csökkenést (6/B. ábra). A ductális epitél sejtek Ca^{2+} háztartás vizsgálatának másik elterjedt metodikája, a 100 μM karbakollal indukált csúcs-plató típusú Ca^{2+} szignál kiváltása. Megfigyeltük, hogy az *ORAI1* farmakológiai gátlása ebben az esetben is

szignifikánsan csökkentette a plató fázisban megfigyelt intracelluláris Ca^{2+} szintet (6/C. ábra). Kutatócsoportunk korábbi eredménye, miszerint az ORAI1 csatornán keresztül folyamatosan beáramló Ca^{2+} biztosítja a CFTR működését, újabb bizonyíték lehet az eddig kizárólag tumoros sejtekben megfigyelt jelenségre, az ORAI1 csatorna raktár független (ER-független) működésére. [45]



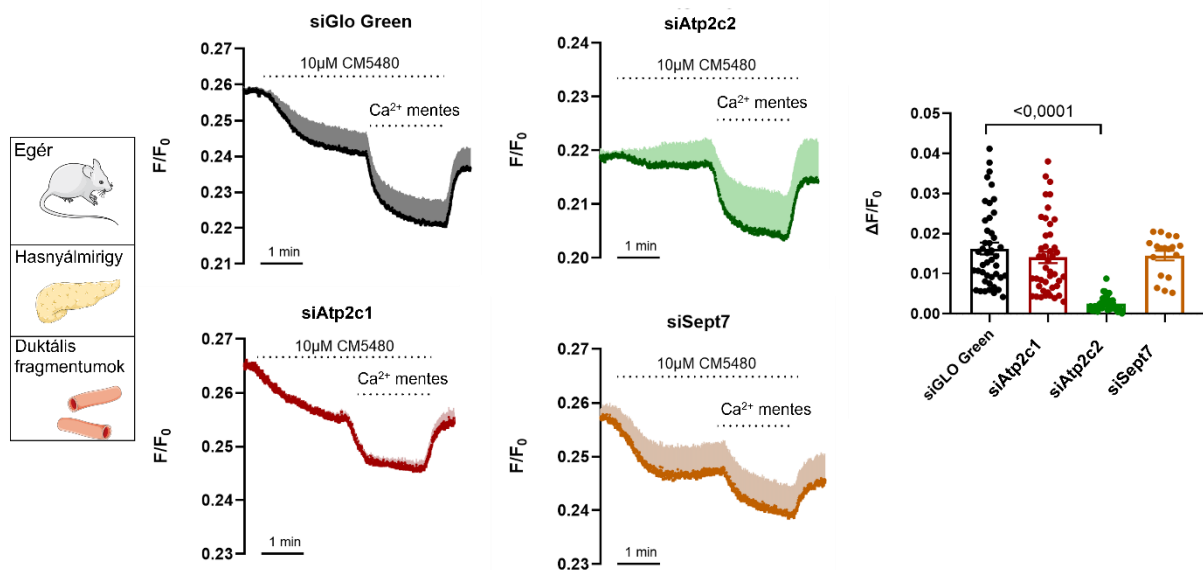
6. ábra. Az ORAI1 Ca^{2+} csatorna folyamatosan aktív a primer epitel sejtekben. 10 μM CM5480 jelentősen csökkentette a bazális Ca^{2+} szintet, melyet az extracelluláris Ca^{2+} megvonása tovább csökkentett. (A) Az extracelluláris Ca^{2+} elvonása a kísérlet elején és 10 μM CM5480 nem eredményez további intracelluláris Ca^{2+} csökkenést. (B) A 100 μM karbakollal indukált Ca^{2+} csúcs-plató típusú szignál kiváltásával megfigyelhető a 10 μM CM5480 szignifikáns, intracelluláris Ca^{2+} szintet csökkentő hatása a plató fázisban. (C) Az ábrán 3-6 kísérletből származó összesített átlaggörbék láthatóak.

A megfigyelt jelenség molekuláris hátterének pontosabb vizsgálatához a rendelkezésünkre álló irodalmi adatokból és az organoidok előzetes transzkriptomikai eredményeiből, aktív génexpresszióval rendelkező potenciálisan raktár-függő, továbbá raktár-független ORAI1 reguláló elemeket kerestünk (7. ábra), amelyek közül a raktár-független elemekre helyeztük a hangsúlyt. A szűrés során 3 potenciális elemet, az *ATP2C1*, az *ATP2C2* és a *SEPTIN7* géneket emeltük ki [52] [53]. Az *ATP2C1* génről az SPCA1, *ATP2C2*-ről az SPCA2 fehérje íródik át. Ezen fehérjék génjei mind egérből, mind pedig humán hasnyálmirigyből létrehozott organoidok esetében hasonló kifejeződést mutattak.



7. ábra Egér (N=3) és humán (N=2) hasnyálmirigy organoidok transzkriptom analízise (TPM=transzkript/millió). Az ORAI1 és a SOCE reguláló elemeinek feltérképezése, különös tekintettel a lehetséges raktár független szabályozókra

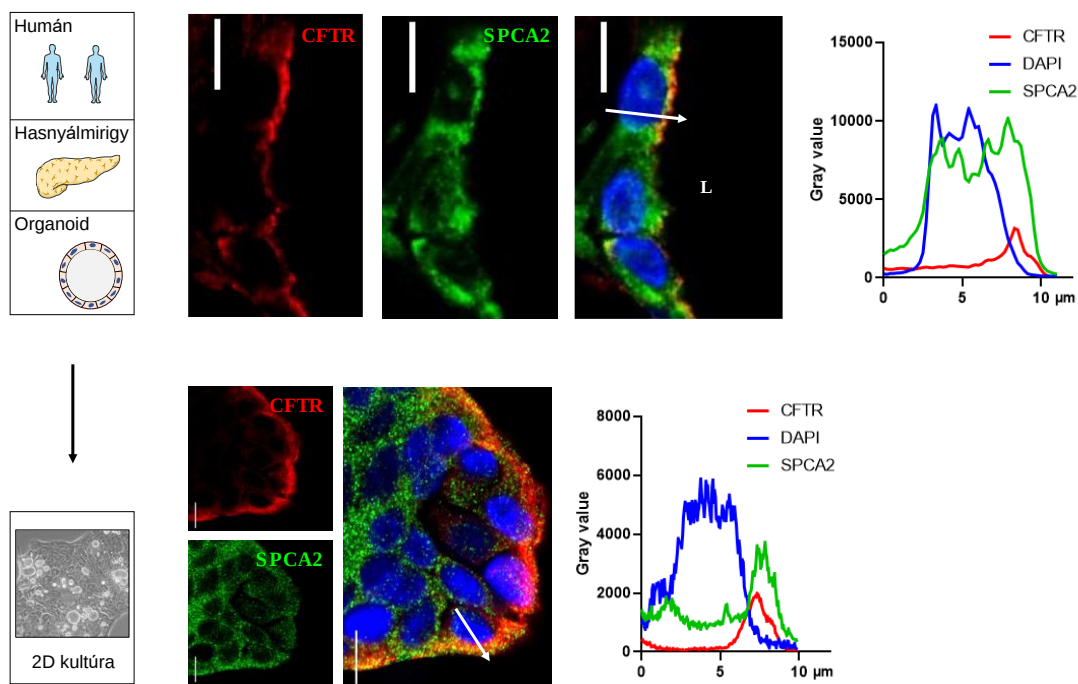
A potenciális, raktár független ORAI1 szabályozó fehérjék bazális Ca^{2+} szinthez való hozzájárulását ismét intracelluláris Ca^{2+} szint változásának monitorozásával vizsgáltuk, izolált hasnyálmirigy duktuszokban. Az *Atp2c1*, *Atp2c2* és *Sept7* géncsökkentését követően megfigyeltük, hogy az ORAI1 farmakológiai gátlószere (10 μM CM5480) által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} szint csökkenése – vagyis a csatorna konstitutív működése – kizárólag az siAtp2c2 csökkentett duktuszok esetében tűnt el (**8. ábra**). A kísérletek végén elvégzett Ca^{2+} elvonás a működő Ca^{2+} transzport aktivitást hivatott reprezentálni. Ezen eredményekből arra következtettünk, hogy az SPCA2 és ORAI1 között direkt vagy indirekt funkcionális kapcsolat van, amely független az ER Ca^{2+} depléciójától.



8. ábra A raktár-független szabályozók (Atp2c2, Atp2c1 és Sept7) specifikus géncsendesítése egér hasnyálmirigy duktális fragmentumokon, és a géncsendesítést követő Ca^{2+} mérés CM5480 jelenlétében Ca^{2+} mentes közegben (siGlo Green transzfekciós indikátor, kontroll)

6.3. Az SPCA2 részleges átfedést mutat az apikális membránban elhelyezkedő CFTR csatornával primer epitel sejteken.

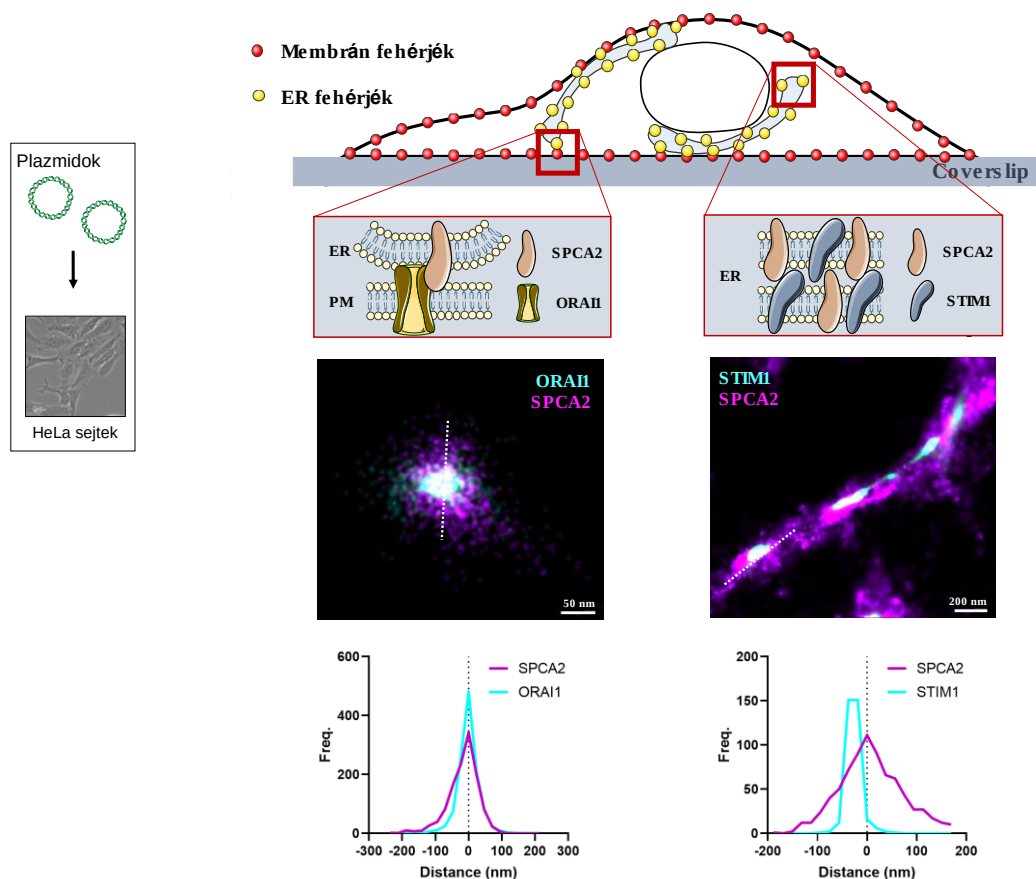
Az SPCA2 és a CFTR között feltételezett indirekt kölcsönhatást a következőkben immunfluoreszcens jelölés segítségével, fagyasztva metszett humán organoid mintákon vizsgáltuk tovább. A SPCA2 fehérje a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően citoplazmatikus, feltehetően endoplazmatikus retikulum lokalizációt mutatott, míg a CFTR a vártak megfelelően az organoidok apikális oldalán helyezkedett el (**9. ábra**). A konfokális képalkotáskor ugyan jól látható, hogy a CFTR és az SPCA2 az apikális oldalon mutat kolokalizációt, de a metszési sík esetleges torzító hatásának kiküszöbölésére, a jelölést az organoidokból létrehozott, kitapasztott 2D kultúrán is elvégeztük. Ebben az esetben is találtunk átfedést a két vizsgált fehérje elhelyezkedésében, ami tovább erősíti azt a hipotézisünket, miszerint a CFTR aktivitását szabályozó molekuláris mechanizmus az ER Ca^{2+} depléciójától ugyan független, azonban az ER közreműködésével zajlik. Ez pedig felveti a korábban csak a SOCE folyamatában szerepet játszó, az ORAI1 csatornát aktiváló ER fehérje, a STIM1 potenciális hozzájárulását az ORAI1 konstitutív működéséhez.



9. ábra Humán hasnyálmirigy organoidok immunfluoreszcens jelölése a CFTR (Cisztás Fibrózis Transzmembrán Konduktancia Regulátor) és az SPCA2(Szekretoros útvonal Ca^{2+} ATPáz 2) lokalizációjának meghatározására. Az ábrán konfokális mikroszkóppal készült képek és line profil analízis látható. (L=lumen, Skála: 10 μm)

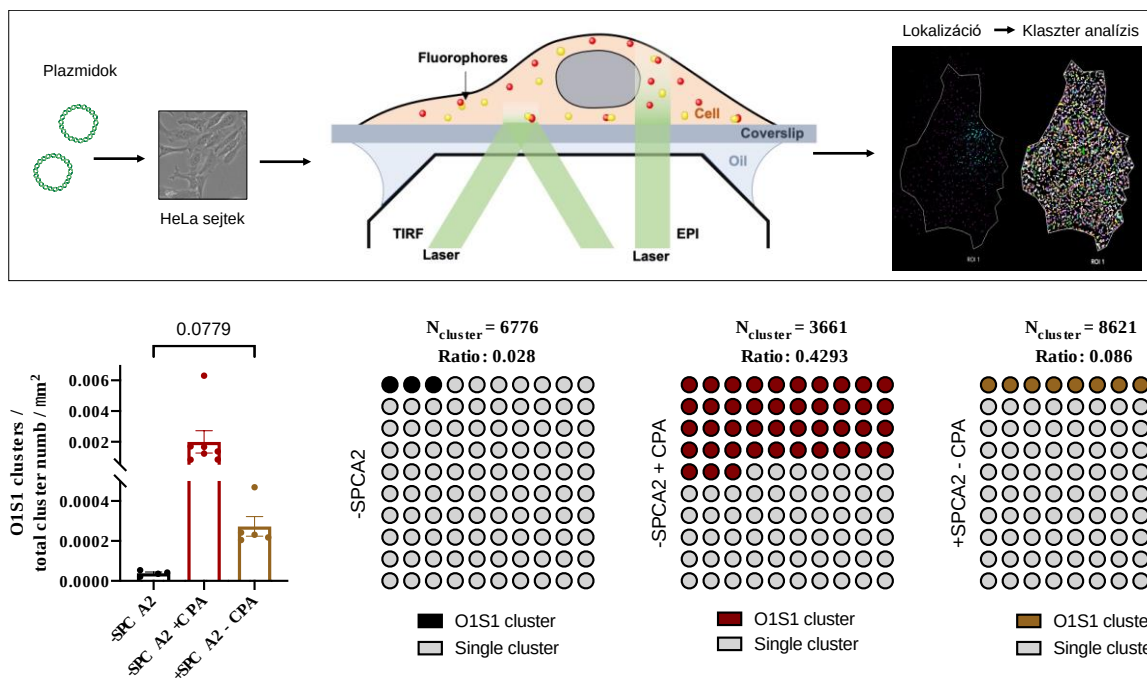
6.4. Az SPCA2 a STIM1-ORAI1 kapcsolat erősítésével biztosítja a CFTR működéséhez szükséges ORAI1-en keresztüli konstitutív Ca^{2+} beáramlást.

A STIM1 és az SPCA2 SOCE független ORAI1 aktivációban betöltött szerepének vizuális bemutatására és kísérletes bizonyítására a szuperrezolúciós mikroszkópiás (dSTORM – Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) eljárás alkalmazása mellett döntöttünk. HeLa sejtek transzfekcióját követően SOCE indukciója nélkül vizsgáltuk a STIM1, az SPCA2 és az ORAI1 elhelyezkedését. A membrán síkjában készült reprezentatív képen az ORAI1 és SPCA2 fizikai közelségét mutattuk ki, amely a ER-PM kapcsolatot igazolja. A vizsgált sejtek membrán feletti citoplazmatikus régiókban pedig az SPCA2 és a STIM1 fehérjék mutattak átfedést az általuk kirajzolt ER részletében (**10. ábra**). Ebből arra következtettünk, hogy az ER deplécio hiányában, a bazális Ca^{2+} fenntartásának érdekében létrejöhetnek ER-PM kapcsolatok, azonban ez nem jelenti a fehérjék olyan nagymértékű toborzását a junkciók területére, mint azt a SOCE folyamatában korábban megfigyelték.



10. ábra Az SPCA2-ORAI1 és SPCA2-STIM1 kolokalizációja transzfektált HeLa sejteken szuper rezolúciós mikroszkópia segítségével. (Az ábrán található rövidítések, megtalálhatóak a Rövidítés jegyzékben.)

Mivel az ORAI1csatornát hagyományosan az oligomerizálódott STIM1 klaszterek aktiválják, nem zárhattuk ki annak a lehetőségét, hogy az SPCA2 esetleg a STIM1-en keresztül fejti ki hatását. Ennek eldöntésére HeLa sejtekről készült STORM TIRF képeken klaszter analízist végeztünk, ahol STIM1-ORAI1 kolokalizációs klaszterek mennyiségét vizsgáltuk SPCA2 hiányában, annak jelenlétében, valamint SPCA2 kotranszekció nélkül, de 25 μ M CPA (ciklopiaszinsav) kezeléssel kiváltott SOCE aktivációt követően (**11. ábra**). Az SPCA2 nélkül a STIM1-ORAI1 klaszterek száma a vártnak megfelelően alacsony volt (2.8%), SPCA2 hiányában és CPA jelenlétében viszont meghaladta a 42%-ot. Indukció nélküli állapotban azonban az SPCA2 jelenléte szignifikánsan növelte a STIM1-ORAI1 interakciós klaszterek számát, ami a vártnak megfelelően nem haladta meg a SOCE által kiváltott százalékos értéket. Ez a megfigyelés pedig magyarázhatja a CFTR szabályozás hátterében álló SOCE-független Ca^{2+} szignál forrását.

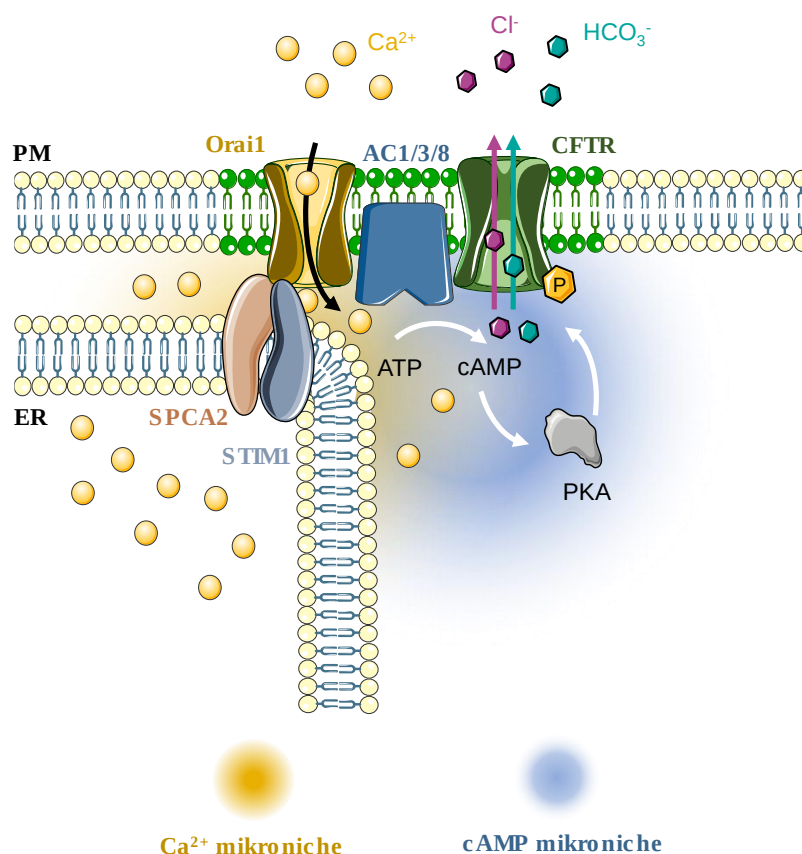


11. ábra Transzfektált HeLa sejtekről készült dSTORM TIRF képeken STIM1 és ORAI1 kolokalizációs klaszterek mennyiségének vizsgálata SPCA2 jelenlétében és hiányában $25\mu\text{M}$ CPA (ciklopiazinsav) kezeléssel kiváltott SOCE aktivációt követően

7. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kísérleteink során egér és humán hasnyálmirigyből organoid kultúrákat hoztunk létre melyek duktális identitását immunfluoreszcens jelölési eljárásokkal és RNS szekvenálással bizonyítottuk. Az intracelluláris Ca^{2+} méréseink egyértelmű bizonyítékul szolgálnak az ORAI1 csatorna konstitutív működésére primer poláris epitél sejtekben. Bemutattuk, ahogy az ORAI1 SOCE független módon részt vesz a bazális intracelluláris Ca^{2+} szint beállításában. Feltártuk, hogy ER membránjában található SPCA2 elengedhetetlen az ORAI1 csatorna, ER depléciónélküli aktivitásához és hogy a fehérje a STIM1-ORAI1 interakciók erősítésével valósítja meg az ORAI1 csatornák aktiválását. Az SPCA2-ORAI1, SPCA2-CFTR kolokalizációját konfokális és szuperrezolúciós képalkotással demonstráltuk.

Megfigyeléseink alapján a korábbi modellünket az alábbi módon egészítettük ki. A CFTR-t aktiváló ORAI1 konstitutív működéséért az SPCA2, a STIM1-ORAI1 interakciók gyakoriságának növelésével felel. Ez azonban nem jár együtt az ER Ca^{2+} depléciójával. (12. ábra)



12. ábra *STIM1/ORAI1/SPCA2* fehérjekomplex felel a CFTR aktivitásáért.

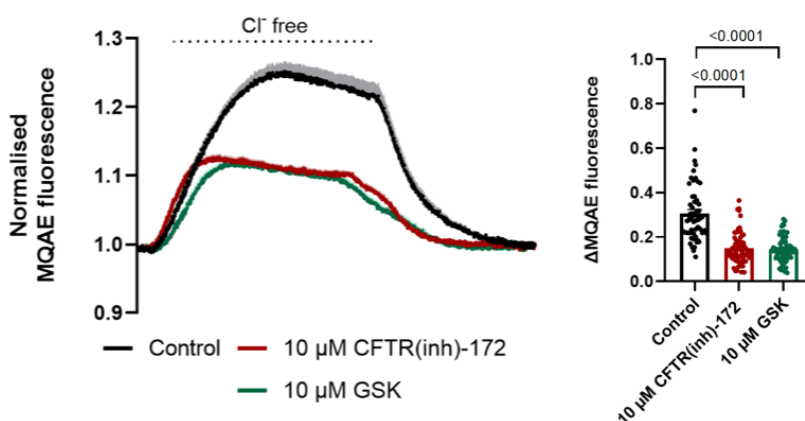
8. TÁVLATI CÉLOK

Egy nemrégiben megjelent tanulmány arról számolt be, hogy a *Cftr* KO egerekből létrehozott intesztinális organoidokban kimutatható az epitél sejtek gyorsabb osztódása és apoptózisa, ami a felgyorsult epiteliális "turnover" jelenségére utal [54]. Ez a folyamat a CFTR hiányában bekövetkező intracelluláris pH változás eredménye. Lehetségesnek tartjuk, hogy amennyiben a CFTR gátlását az ORAI1 csatornán keresztül végezzük, úgy egyrészt csökkenthetjük az adenokarcinoma sejtek migrációját, valamint érzékenyítéssel növelhetjük az antitumor kezelések hatékonyságát [44].

A közvetett CFTR gátlás előnye, hogy szelektív ORAI1 farmakológiai inhibitorokat már jelenleg is alkalmaznak például a SCID (Severe Combined Immunodeficiency), az allergiák, a hasnyálmirigy gyulladás vagy a IBD (Inflammatory Bowel Disease) kezelésében.

Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy a humán adenokarcinoma tumor rezekátumából létrehozott organoidok apikális membránjában szintén megtalálhatóak a CFTR és ORAI1 fehérjék. A CFTR és az ORAI1 között lévő funkcionális kapcsolat vizsgálatok az ORAI gátlás szignifikánsan csökkentette a CFTR mediálta Cl^- kiáramlást, amit MQAE Cl^- szenzitív fluoreszcens festékkel mutattunk ki. (14.ábra) Elképzelhetőnek tartjuk, hogy alapkutatási eredményeink transzlálhatóak lesznek a személyre szabott gyógyászatba. Így a közeljövőben javulást érhetünk el az adenokarcinómás betegek kezelési hatékonyságában és túlélésében.

Távlati célunk ezért a CFTR szabályozás eredményének részletes vizsgálata primer tumoros mintákon.



14. ábra Az ORAI1(GSK-7975A) és CFTR farmakológiai gátlószere egyaránt csökkenti a CFTR mediálta Cl^- kiáramlás mértékét adenokarcinoma rezekátumból készült organoid kultúrákban. Az ábrán 4-6 kísérletből származó összesített átlaggörbék láthatóak. Az MQAE fluoreszcens intenzitása fordítottan arányos az intracelluláris Cl^- koncentráció változásával.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] J. H. Hong, S. Park, N. Shcheynikov, és S. Muallem, „Mechanism and Synergism in Epithelial Fluid and Electrolyte Secretion”, *Pflugers Arch*, köt. 466, sz. 8, o. 1487–1499, aug. 2014, doi: 10.1007/s00424-013-1390-1.
- [2] R. A. Frizzell és J. W. Hanrahan, „Physiology of Epithelial Chloride and Fluid Secretion”, *Cold Spring Harb Perspect Med*, köt. 2, sz. 6, o. a009563, jún. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a009563.
- [3] V. Saint-Criq és M. A. Gray, „Role of CFTR in epithelial physiology”, *Cell Mol Life Sci*, köt. 74, sz. 1, o. 93–115, 2017, doi: 10.1007/s00018-016-2391-y.
- [4] A. Caputo és mtsai., „TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity”. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1163518> (elérés 2022. február 17.).
- [5] Y. D. Yang és mtsai., „TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance”, *Nature*, köt. 455, sz. 7217, o. 1210–1215, okt. 2008, doi: 10.1038/nature07313.
- [6] B. Kerem és mtsai., „Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis”, *Science*, köt. 245, sz. 4922, o. 1073–1080, szept. 1989, doi: 10.1126/science.2570460.
- [7] J. R. Riordan és mtsai., „Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA”, *Science*, köt. 245, sz. 4922, o. 1066–1073, szept. 1989, doi: 10.1126/science.2475911.
- [8] K. W. Southern és mtsai., „A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe”, *J Cyst Fibros*, köt. 6, sz. 1, o. 57–65, 2007, doi: 10.1016/j.jcf.2006.05.008.
- [9] D. Salvatore és mtsai., „An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellanea”, *J Cyst Fibros*, köt. 10, sz. 2, o. 71–85, márc. 2011, doi: 10.1016/j.jcf.2010.12.005.
- [10] K. De Boeck, A. Zolin, H. Cuppens, H. V. Olesen, és L. Viviani, „The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis”, *J Cyst Fibros*, köt. 13, sz. 4, o. 403–409, júl. 2014, doi: 10.1016/j.jcf.2013.12.003.
- [11] F. M. Gisler, T. von Kanel, R. Kraemer, A. Schaller, és S. Gallati, „Identification of SNPs in the cystic fibrosis interactome influencing pulmonary progression in cystic fibrosis”, *Eur J Hum Genet*, köt. 21, sz. 4, o. 397–403, ápr. 2013, doi: 10.1038/ejhg.2012.181.
- [12] H. P. J. van der Doef, F. T. M. Kokke, F. J. A. Beek, J. W. Woestenenk, S. P. Froeling, és R. H. J. Houwen, „Constipation in pediatric cystic fibrosis patients: an underestimated medical condition”, *J Cyst Fibros*, köt. 9, sz. 1, o. 59–63, 2010, doi: 10.1016/j.jcf.2009.11.003.
- [13] N. Kobelska-Dubiel, B. Klineciewicz, és W. Cichy, „Liver disease in cystic fibrosis”, *Prz Gastroenterol*, köt. 9, sz. 3, o. 136–141, 2014, doi: 10.5114/pg.2014.43574.
- [14] A. Granados, C. L. Chan, K. L. Ode, A. Moheet, A. Moran, és R. Holl, „Cystic fibrosis related diabetes: Pathophysiology, screening and diagnosis”, *J Cyst Fibros*, köt. 18 Suppl 2, o. S3–S9, okt. 2019, doi: 10.1016/j.jcf.2019.08.016.
- [15] K. De Boeck, M. Weren, M. Proesmans, és E. Kerem, „Pancreatitis among patients with cystic fibrosis: correlation with pancreatic status and genotype”, *Pediatrics*, köt. 115, sz. 4, o. e463–469, ápr. 2005, doi: 10.1542/peds.2004-1764.
- [16] D. Borowitz, „CFTR, bicarbonate, and the pathophysiology of cystic fibrosis”, *Pediatr Pulmonol*, köt. 50 Suppl 40, o. S24–S30, okt. 2015, doi: 10.1002/ppul.23247.
- [17] C. O. Randak, „An elusive adenylate cyclase complicit in cholera is exposed”, *Journal of Biological Chemistry*, köt. 293, sz. 33, o. 12960–12961, aug. 2018, doi: 10.1074/jbc.H118.004669.
- [18] K. Ridley és M. Condren, „Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor: The First Triple-Combination Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Modulating Therapy”, *J*

- Pediatr Pharmacol Ther*, köt. 25, sz. 3, o. 192–197, 2020, doi: 10.5863/1551-6776-25.3.192.
- [19] J. Thiagarajah és A. Verkman, „CFTR Inhibitors for Treating Diarrheal Disease”, *Clin Pharmacol Ther*, köt. 92, sz. 3, o. 287–290, szept. 2012, doi: 10.1038/clpt.2012.114.
- [20] F. Liu, Z. Zhang, L. Csanády, D. C. Gadsby, és J. Chen, „Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel”, *Cell*, köt. 169, sz. 1, o. 85–95.e8, márc. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.024.
- [21] I. Callebaut, P. A. Chong, és J. D. Forman-Kay, „CFTR structure”, *J Cyst Fibros*, köt. 17, sz. 2S, o. S5–S8, márc. 2018, doi: 10.1016/j.jcf.2017.08.008.
- [22] H. A. Berger és mtsai., „Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel”, *J Clin Invest*, köt. 88, sz. 4, o. 1422–1431, okt. 1991, doi: 10.1172/JCI115450.
- [23] M. R. Picciotto, J. A. Cohn, G. Bertuzzi, P. Greengard, és A. C. Nairn, „Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”, *J Biol Chem*, köt. 267, sz. 18, o. 12742–12752, jún. 1992.
- [24] M. P. Anderson, H. A. Berger, D. P. Rich, R. J. Gregory, A. E. Smith, és M. J. Welsh, „Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel”, *Cell*, köt. 67, sz. 4, o. 775–784, nov. 1991, doi: 10.1016/0092-8674(91)90072-7.
- [25] H. A. Berger, S. M. Travis, és M. J. Welsh, „Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases.”, *Journal of Biological Chemistry*, köt. 268, sz. 3, o. 2037–2047, jan. 1993, doi: 10.1016/S0021-9258(18)53959-4.
- [26] J. A. Tabcharani, X. B. Chang, J. R. Riordan, és J. W. Hanrahan, „Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene”, *Nature*, köt. 352, sz. 6336, o. 628–631, 1991, doi: 10.1038/352628a0.
- [27] V. Chappe, D. A. Hinkson, T. Zhu, X.-B. Chang, J. R. Riordan, és J. W. Hanrahan, „Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA”, *J Physiol*, köt. 548, sz. Pt 1, o. 39–52, ápr. 2003, doi: 10.1113/jphysiol.2002.035790.
- [28] Y. Jia, C. J. Mathews, és J. W. Hanrahan, „Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A”, *J Biol Chem*, köt. 272, sz. 8, o. 4978–4984, febr. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.8.4978.
- [29] K. R. Hallows, J. E. McCane, B. E. Kemp, L. A. Witters, és J. K. Foskett, „Regulation of Channel Gating by AMP-activated Protein Kinase Modulates Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Activity in Lung Submucosal Cells **”, *Journal of Biological Chemistry*, köt. 278, sz. 2, o. 998–1004, jan. 2003, doi: 10.1074/jbc.M210621200.
- [30] H. Fischer és T. E. Machen, „The tyrosine kinase p60c-src regulates the fast gate of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel”, *Biophys J*, köt. 71, sz. 6, o. 3073–3082, 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79501-2.
- [31] A. Billet és mtsai., „Potential sites of CFTR activation by tyrosine kinases”, *Channels (Austin)*, köt. 10, sz. 3, o. 247–251, dec. 2015, doi: 10.1080/19336950.2015.1126010.
- [32] P. J. French és mtsai., „Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II”, *J Biol Chem*, köt. 270, sz. 44, o. 26626–26631, 1995, doi: 10.1074/jbc.270.44.26626.
- [33] M. Ahuja, A. Jha, J. Maléth, S. Park, és S. Muallem, „cAMP and Ca²⁺ signaling in secretory epithelia: Crosstalk and synergism”, *Cell Calcium*, köt. 55, sz. 6, o. 385–393, jún. 2014, doi: 10.1016/j.ceca.2014.01.006.
- [34] M. L. Halls és D. M. F. Cooper, „Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, köt. 3, sz. 1, o. a004143, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004143.
- [35] D. Willoughby, „Organization of cAMP signalling microdomains for optimal regulation

- by Ca^{2+} entry”, *Biochem Soc Trans*, köt. 40, sz. 1, o. 246–250, febr. 2012, doi: 10.1042/BST20110613.
- [36] Z. Bozoky és mtsai., „Synergy of cAMP and calcium signaling pathways in CFTR regulation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, köt. 114, sz. 11, o. E2086–E2095, márc. 2017, doi: 10.1073/pnas.1613546114.
- [37] „Interplay of ORAI1 Ca^{2+} channel and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in epithelial physiology (MTMT)”. <https://m2.mtmt.hu/gui2/?mode=browse¶ms=publication;32592532> (elérés 2022. április 9.).
- [38] J. W. Putney, „A model for receptor-regulated calcium entry”, *Cell Calcium*, köt. 7, sz. 1, o. 1–12, febr. 1986, doi: 10.1016/0143-4160(86)90026-6.
- [39] M. J. Berridge, „Capacitative calcium entry.”, *Biochem J*, köt. 312, sz. Pt 1, o. 1–11, nov. 1995.
- [40] A. B. Parekh és J. W. Putney, „Store-Operated Calcium Channels”, *Physiological Reviews*, köt. 85, sz. 2, o. 757–810, ápr. 2005, doi: 10.1152/physrev.00057.2003.
- [41] P. G. Hogan, R. S. Lewis, és A. Rao, „Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI”, *Annu Rev Immunol*, köt. 28, o. 491–533, ápr. 2010, doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132550.
- [42] Y. Zhou, S. Ramachandran, M. Oh-hora, A. Rao, és P. G. Hogan, „Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, köt. 107, sz. 11, o. 4896–4901, márc. 2010, doi: 10.1073/pnas.1001169107.
- [43] S. Feske, „ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond”, *Immunological Reviews*, köt. 231, sz. 1, o. 189–209, 2009, doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00818.x.
- [44] S. Yang, J. J. Zhang, és X.-Y. Huang, „Orail and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis”, *Cancer Cell*, köt. 15, sz. 2, o. 124–134, 0 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.019.
- [45] M. Chamli, L. Rodat-Despoix, és H. Ouadid-Ahidouch, „Store-Independent Calcium Entry and Related Signaling Pathways in Breast Cancer”, *Genes (Basel)*, köt. 12, sz. 7, o. 994, jún. 2021, doi: 10.3390/genes12070994.
- [46] J. Vanoevenen és mtsai., „The secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca^{2+} ions”, *J Biol Chem*, köt. 280, sz. 24, o. 22800–22808, jún. 2005, doi: 10.1074/jbc.M501026200.
- [47] M. Xiang, D. Mohamalawari, és R. Rao, „A novel isoform of the secretory pathway $\text{Ca}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$ -ATPase, hSPCA2, has unusual properties and is expressed in the brain”, *J Biol Chem*, köt. 280, sz. 12, o. 11608–11614, márc. 2005, doi: 10.1074/jbc.M413116200.
- [48] G. W. Okunade és mtsai., „Loss of the Atp2c1 secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) in mice causes Golgi stress, apoptosis, and midgestational death in homozygous embryos and squamous cell tumors in adult heterozygotes”, *J Biol Chem*, köt. 282, sz. 36, o. 26517–26527, szept. 2007, doi: 10.1074/jbc.M703029200.
- [49] K. N. Fish, „Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy”, *Curr Protoc Cytom*, köt. 0 12, o. Unit12.18, okt. 2009, doi: 10.1002/0471142956.cy1218s50.
- [50] R. Molnár és mtsai., „Mouse pancreatic ductal organoid culture as a relevant model to study exocrine pancreatic ion secretion”, *Lab Invest*, köt. 100, sz. 1, o. 84–97, jan. 2020, doi: 10.1038/s41374-019-0300-3.
- [51] A. K. Kiss, „A raktár-független Ca^{2+} beáramlás irányító szerepe a szekréciós epitél sejtek CFTR aktivációjában”.
- [52] „SPCA2 Regulates Orail Trafficking and Store Independent Ca^{2+} Entry in a Model of Lactation”. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067348> (elérés 2021. december 8.).

- [53] B. K. Deb, T. Pathak, és G. Hasan, „Store-independent modulation of Ca(2+) entry through Orai by Septin 7”, *Nat Commun*, köt. 7, o. 11751, máj. 2016, doi: 10.1038/ncomms11751.
- [54] A. M. Strubberg és mtsai., „Cfr Modulates Wnt/ β -Catenin Signaling and Stem Cell Proliferation in Murine Intestine”, *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, köt. 5, sz. 3, o. 253–271, 0 2018, doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.11.013.
- [55] „Translocation between PI(4,5)P2-poor and PI(4,5)P2-rich microdomains during store depletion determines STIM1 conformation and Orai1 gating | Nature Communications”. <https://www.nature.com/articles/ncomms6843> (elérés 2022. április 10.).

10. FÜGGELÉK

ORGANOID KULTÚRÁK FENNTARTÁSÁHOZ HASZNÁLT ESZKÖZÖK		
Komponens megnevezése	Gyártó	Katalógusszám
15 ml-es centrifuga cső	100 Cellstar,	188277
24-lyukú sejtenyésztési lemez	Greiner bio	662160
100 Sterican 18 G tű	Braun	4667123
20 ml-es fecskendő	Chirana	CH0204
22µm-es szűrő	Filter-Bio	FBS30PES022S
Petri csésze 100*20 cm	Greiner-Bio One	664160

1. táblázat

ORGANOID KULTÚRÁK FENTARTÁSÁHOZ HASZNÁLT ANYAGOK		
Komponens megnevezése	Gyártó	Katalógusszám
TrypLE Express	ThermoFisher	12605-028
Matrigel	Corning	354234

2. táblázat

SPLITTING MÉDIUM ÖSSZETÉTELE		
Komponens megnevezése	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentráció
Advanced DMEM F12	Gibco, 12634010	500 ml
1M HEPES	Gibco, 15630080	10 mM
GlutaMax Supplement	Gibco, 35050061	1X
Primocin	InvivoGen, ant-pm-2	1X

3. táblázat

EMÉSZTŐ MÉDIUM ÖSSZETÉTELE		
Komponens megnevezése	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentráció
Slitting médium	-	19,098 ml
Kollagenáz IV.	Gibco, 17104019	1250 U/ml
Diszpáz	Sigma, D4693-1G	1 mg/ml
Szójabab Tripszin Inhibitor	Thermo, 17075029	2 mg/ml
Antibiotic-Antimycotic	Gibco, 15240062	1X
Kanamycin-szulfát	Gibco, 15160047	1X
Vorikonazol	Tocris, 3760/10	2 µg/ml
FBS	Gibco, 10500064	2,50%

4. táblázat

MOSÓ MÉDIUM ÖSSZETÉTELE		
Komponens megnevezése	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentráció
Splitting médium	-	47,746 ml
FBS	Gibco, 10500064	2,50%
Kanamycin-szulfát	Gibco, 15160047	1X
AA	Gibco, 15240062	1X
Vorikonazol	Tocris, 3760/10	2,5µg/ml

5. táblázat

TÁPOLDAT ÖSSZETÉTELE		
Komponens megnevezése	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentráció
Splitting medium	-	22,808 ml
L-WRN kondicionált médium	-	25 ml
A-83	Tocris, 2939	500 nM
EGF	Thermo, PMG8041	50 ng/ml
FGF	Thermo, PHG0360	100 ng/ml
Gastrin I.	Tocris, 3006	0,01 µM
N-acetilcisztein	Sigma, A9165-56	1,25 mM
Nikotinamid	Sigma, NO636-100G	10 mM
B-27 Supplement	Thermo, 17504-001	1X
Prosztaglandin E2	Tocris, 2296	1 µM
Y-27632 ROCK inhibitor	Tocris, 1254	10,5 µM

6. táblázat

KRIOPREZERVÁLÁSHOZ HASZNÁLT ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK		
Komponens megnevezése	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentráció
FBS	Gibco, 10500064	40%
DMSO	Thermo, 85190	5%
Feeding medium	-	55%
Cryos fagyasztó cső	Greiner Bio-One, 121278	-

7. táblázat

EGÉR DUKTÁLIS FRAGMENTUMOK IZOLÁLÁSA	
Komponens	Gyártó és katalógusszám
DMEM/F12	Sigma, D6421
BSA (Bovine serum album)	Sigma, A3983-100G
Kollagenáz IV.	Worthington, LS005273
Szójabab tripszin inhibitor	Sigma, 10109886001
L-Glutamin	Thermo, 25030081
FBS (Fetal bovine serum)	Thermo, 10500064
McCoy's 5A Modified Medium	Sigma, M8403
Petri csésze	Greiner, 627160

8. táblázat

FLUORESZCENS MIKROSZKÓPIA I.			
		Felhasznált oldatok	
Komponens	Gyártó és katalógusszám	Standard HEPES oldat (pH=7,5)	Ca ²⁺ mentes HEPES oldat (pH=7,5)
NaCl	Sigma, S9888	140 mM	142 mM
KCl	Sigma, P3911	5 mM	5 mM
Mg2Cl	Sigma, M2670	1 mM	1 mM
CaCl2	Sigma, 223506	1mM	-
HEPES	Sigma, H3375	10 mM	10 mM
Glükóz	Sigma, G8270	10 mM	10 mM
EGTA	Sigma, E4378	-	1mM

9. táblázat

FLUORESZCENS MIKROSZKÓPIA II.	
Komponens	Gyártó és katalógusszám
Poly-L-lizin	Sigma, P8920-100ML
Fedő üveg	VWR, ECN 631-1583
Fura2-AM	Invitrogen, F1201
CM5480	CalciMedica biztosította
Karbakol	Sigma, PHR1511
MQAE	Invitrogen, E3101
GSK-7975A	Merck, 534351
CFTR(inh)-172	Biotechne, 3430
CryoMatrix	Thermo, 6769006

10. táblázat

RNS IZOLÁLÁS ÉS TRANZKRIPTOM ANALÍZIS (EGÉR TPM ÉRTÉKEK)					
Gén neve	Gén ID	1.minta	2.minta	3.minta	Átlag
<i>Atp2c1</i>	ENSMUSG000000325 70	27,7010274 8	23,4233760 9	21,7587684 8	24,2943906 8
<i>Atp2c2</i>	ENSMUSG000000341 12	15,0437188 6	24,8730647 2	23,616354 3	21,1777125 3
<i>Septin7</i>	ENSMUSG000000018 33	36,8601915 3	39,1054429 6	38,4973455 7	38,1543266 9
<i>Septin4</i>	ENSMUSG000000204 86	1,96420621	1,31535476 8	1,16842050 8	1,48266049 5
<i>Calm1</i>	ENSMUSG000000011 75	218,939614 1	184,038535 9	176,189379 2	193,055843 1
<i>Calm2</i>	ENSMUSG000000364 38	855,703864 3	745,320987 3	715,603666 6	772,209506 1
<i>Calm3</i>	ENSMUSG000000193 70	238,12823	221,854748 9	223,646117 2	227,876365 4
<i>Calm4</i>	ENSMUSG000000337 65	0	0	0	0
<i>Calm5</i>	ENSMUSG000000992 69	0	0	0	0
<i>Rhbd12</i>	ENSMUSG000000433 33	2,70178471 8	3,74012773 3	2,56143317 3	3,00111520 8

<i>Ubqln1</i>	ENSMUSG000000053 12	116,188125 5	128,972162	126,349662 4	123,83665
<i>Tmem20</i>	ENSMUSG000000440 26	18,4451196 9	18,7680396 5	17,9908481 8	18,4013358 4
<i>Tmem178a</i>	ENSMUSG000000242 45	1,37548481 3	0,55266616	2,31827825 5	1,41547640 9
<i>Tmem178b</i>	ENSMUSG000000577 16	0	0	0	0
<i>Ormdl3</i>	ENSMUSG000000381 50	77,2622751 3	92,1656859 6	91,6022121 2	87,0100577 4
<i>Cav1</i>	ENSMUSG000000076 55	115,602496	64,3660300 4	80,7876495 3	86,9187251 9
<i>Cracr2a</i>	ENSMUSG000000614 14	0,19877490 1	0,2695519	0,11824250 9	0,19552310 3
<i>Napa</i>	ENSMUSG000000060 24	79,4860193 6	83,1235596 5	77,5217379 8	80,0437723 3
<i>Kcnn3</i>	ENSMUSG000000007 94	0,29762029 1	0,11210910 5	0,11065082 2	0,17346007 3
<i>Homer1</i>	ENSMUSG000000076 17	5,60566467	4,77426772 3	4,61560464 6	4,99851234 6
<i>Cftr</i>	ENSMUSG000000413 01	2,80399325 1	4,82844459 7	4,49757045 6	4,04333610 1
<i>Krt19</i>	ENSMUSG000000209 11	1321,44354 3	2284,94297 2	2282,40143 8	1962,92931 8
<i>Ocln</i>	ENSMUSG000000216 38	118,427656 9	125,213050 5	120,297498 1	121,312735 2
<i>Sox9</i>	ENSMUSG000000005 67	76,1622739 4	45,7326903 6	48,5497166 4	56,8148936 5
<i>Amy1a</i>	ENSMUSG000000742 64	0,75218360 8	0,74800782 7	0,40269706 6	0,63429616 7
<i>Amy1b</i>	-	-	-	-	-
<i>Amy1c</i>	-	-	-	-	-
<i>Ins</i>	ENSMUSG000000358 04	4,08192868 3	2,48578891 4	2,47874782 7	3,01548847 5
<i>Cdh5</i>	ENSMUSG000000318 71	0,12334164 7	0,05575314 1	0,05502792	0,07804090 3

11. táblázat

RNS IZOLÁLÁS ÉS TRANSZKRIPTOM ANALÍZIS (HUMÁN TPM ÉRTÉKEK)				
Gén neve	Gén ID	1. minta	2. minta	Átlag
ATP2C1	ENSG00000017260	43,64690084	44,31688021	43,98189052
ATP2C2	ENSG00000064270	7,20904996	6,055694643	6,632372302
SEPTIN7	ENSG00000122545	24,50329581	28,51264827	26,50797204
SEPTIN4	ENSG00000108387	0,139058135	0,15531563	0,147186883

<i>CALM1</i>	ENSG00000198668	118,8602159	126,1885104	122,5243631
<i>CALM2</i>	ENSG00000143933	211,1985284	196,3215082	203,7600183
<i>CALM3</i>	ENSG00000160014	196,9667331	152,2918063	174,6292697
<i>CALM4</i>	-	0	0	0
<i>CALM5</i>	-	0	0	0
<i>RHBDL2</i>	ENSG00000158315	7,459827475	15,33534237	11,39758492
<i>UBQLN1</i>	ENSG00000135018	42,87108226	46,06257186	44,46682706
<i>TMEM20</i>	ENSG00000176273	1,491633613	2,348629281	1,920131447
<i>TMEM178A</i>	ENSG00000152154	9,601268508	8,452663666	9,026966087
<i>TMEM178B</i>	ENSG00000261115	0,164300079	0,25950718	0,21190363
<i>ORMDL3</i>	ENSG00000172057	35,54843526	55,6820517	45,61524348
<i>CAV1</i>	ENSG00000105974	60,86522094	24,52331408	42,69426751
<i>CRACR2A</i>	ENSG00000130038	0,561778164	0,299467872	0,430623018
<i>NAPA</i>	ENSG00000105402	20,17123758	20,95648255	20,56386006
<i>KCNN3</i>	ENSG00000143603	0,011704807	0,010168071	0,010936439
<i>HOMER1</i>	ENSG00000152413	3,776023288	5,032735671	4,404379479
<i>CFTR</i>	ENSG00000001626	270,8121378	233,5550621	252,1836
<i>KRT19</i>	ENSG00000171345	4519,559425	4249,294276	4384,42685
<i>OCLN</i>	ENSG00000197822	10,35812245	9,427652887	9,892887667
<i>SOX9</i>	ENSG00000125398	165,1077898	157,0287641	161,0682769
<i>AMY1A</i>	ENSG00000237763	0	0	0
<i>AMY1B</i>	ENSG00000174876	0	0	0
<i>AMY1C</i>	ENSG00000187733	0	0	0
<i>INS</i>	ENSG00000254647	0	0	0
<i>CDH5</i>	ENSG00000179776	0,130846735	0,136401275	0,133624005

12. táblázat

IMMUNFESTÉSHEZ HASZNÁLT ANYAGOK		
Komponens megnevezése	Gyártó	Katalógusszám
ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo	P36935
BSA (Bovine Serum Albumin)	PanBiotech	P061391500
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma	P4417-100TAB

Paraformaldehid 16%	Thermo	11400580
Tween20	Sigma	P1379-100ml
Nátrium-citrát	Sigma	71402-1kg
Tris	Sigma	T1503
Nátrium-klorid	Sigma	746398
Kálium-klorid	Sigma	746436
FOXA2 monoklonális antitest	Abcam	ab108422
HNF1-B monoklonális antitest	Abcam	ab236759
KRT19 monoklonális antitest	Thermo Scientific	MAS-16358
SOX9 monoclonális antitest	Abcam	ab185966
CFTR monoklonális antitest	Abcam	ab2784
ATP2C2 poliklonális antitest	Thermo Scientific	PA567396
Donkey anti mouse-647 Alexa Fluor	Thermo Scientific	A31571
Goat-anti-rabbit-488 Alexa Fluor	Thermo Scientific	A11034

13. táblázat

GÉNCSENDESÍTÉS	
Komponens	Gyártó és katalógusszám
Opti-MEM	Gibco, 31985-070
Lipofectamine 2000	Invitrogen, 11668-019
siGLO Green	Horizon, D-00163-01
siSpca2	Dharmacon, L-065820-01-0005
siSpca1	Dharmacon, L-041293-00-0005
siSept7	Dharmacon, L-042160-01-0005

14. táblázat

SZUPERREZOLÚCIÓS MIKROSKÓPIA	
Komponens	Gyártó és katalógusszám
Lipofectamine 2000	Invitrogen, 11668-019
SPCA2-MYC plazmid	Origene, RC212990
ORAI1-HA plazmid	Shmuel Muallem vezető kutató nagylelkű ajándéka [55].
STIM1-YFP plazmid	
Metanol	Sigma, 34860
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma, P4417-100TAB
Kétkomponensű ragasztóanyag	Picodent, 1300 7100
Fedőlemez	Sigma, BR475505-50EA
HA-tag monoklonális antitest konjugált Alexa Fluor 488	Cell Signaling Technology, 2350S
Myc -Tag poliklonális antitest	Thermo Scientific, A21281
Anti-GFP antitest	Thermo Scientific, A11122
Donkey anti mouse-647 Alexa Fluor	Thermo Scientific, A31571
Goat-anti-rabbit-568 Alexa Fluor	ThermoFisher A11011

15. táblázat

BLINKING PUFFER ÖSSZETÉTELE		
Komponens	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentrációk
Glükóz	Sigma, G8270	55,56 mM
Glükóz oxidáz	Sigma, G2133-50KU	100 U
Katalóz	Sigma, C100	2000 U
Ciszteamin hidroklorid	Sigma, M6500	100 U

16. táblázat

HELA SEJTEK TENYÉSZTÉSE		
Komponens	Gyártó és katalógusszám	Végkoncentrációk
DMEM GlutaMax™ Supplement	Gibco, 31966-021	86%
FBS (Fetal bovine serum)	Gibco, 10500064	10%
GlutaMax™	Gibco, 35050-061	2%
Antibiotic-Antimycotic	Gibco, 1524-062	1%
Kanamycin-szulfát	Gibco, 1516-0047	1%
Szövettenyésztési edény 75 cm ²	Greiner Bio 658175	-
DPBS	Gibco, 14190-094	-

17. táblázat

11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Maléth József* tudományos főmunkatársnak és a kutatócsoport vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a kísérletes munka feltételeit.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Varga Árpád* Ph.D. hallgatónak, akit kérdéseimmel mindig felkereshettem és a munka során mindig segítségemre volt és a lehető legtürelmesebb módon segített.

Köszönöm továbbá az *MTA SZTE Lendület Eritél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport* többi tagjának a hasznos tanácsokat és a támogató légkört.

Szeretném megköszönni, *Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika*, habilitált egyetemi adjunktusnak, hogy vállalta, hogy a belső konzulensem lesz.

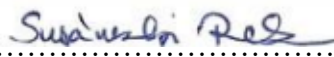
Szeretném megköszönni az *Édesanyámnak*, aki támogatott és biztatott, valamint lehetővé tette, hogy elindulhassak az álmain felé.

12. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Susánszki Petra nyilatkozom, hogy a 2023-as 36. OTDK-ra benyújtott **A STIM1/ORAI1/SPCA2 fehérjekomplex esszenciális szerepe a CFTR aktivációjában primer poláris epitél sejtekben** című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Feladat/részfeladat	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)
Sejtizolálást egér hasnyálmirigy szövetből	100%	-
Sejtizolálást humán hasnyálmirigy szövetből	100%	-
Organoid kultúrák létrehozása és fenntartása	100%	-
Duktális fragmentumok izolálását és géncsendesítését	100%	-
Immunfluoreszcens festést és képalkotást	80%	20%
RNS izolálást	100%	-
Minta előkészítést és képalkotás szuperrezolúciós mikroszkóppal és klaszter analízis	40%	60%
Fluoreszcens mikroszkóppal történő mérést és adatelemzést	50%	50%
HeLa sejt kultúrák fenntartása és előkészítése	100%	-
Ábrák elkészítését	50%	50%
Kapcsolódó irodalom feldolgozását	100%	-

Kelt.: Szeged, 2022. 04. 10.

.....

 Susánszki Petra
 Pályamunkát beadó hallgató