

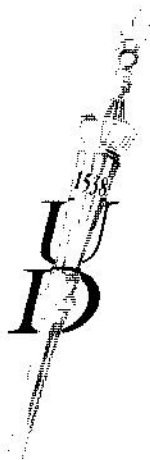
DEBRECENI EGYETEM

University of Debrecen



Universitas Debrecensis

ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI



Zakány Flóra

Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

**TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI
KONFERENCIA**

2013/14.

BIF.5. Garlati Bettina biotechnológia MSc II.

Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

P97 MELANOTRANSZFERRIN ELLENES KIMÉRA ANTIGÉN RECEPTORT KIFEJEZŐ TRANSZGÉN T-SEJTEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS SZINAPSZISKÉPZÉSÜK VIZSGÁLATA

Célkitűzések: A Science folyóirat szerkesztőse az elmúlt év legjelentősebb tudományos áttörésének a a daganatok immunterápiájával kapcsolatos legújabb eredményeket választotta és külön kiemelte kiméra antigén receptorokhoz (CAR) kapcsolódó klinikai vizsgálatokat. Ezek a receptorok olyan szintetikus, két fő doménből álló fehérjék, melyekben az antigénre specifikusan felismerni képes sejt felszíni ektodoménhez (ScFv) a T-sejt receptor szignál doménjét (TCR gamma lánc) tartalmazó citoplazmatikus endodomén van kapcsolva. Jelen kutatásomban a melanomára specifikus, a tumorsejtek felszínén nagy fokban expresszálandó p97 melanotranszferrin vizsgáltam mint lehetséges terápiás célpontot az antigénre specifikus CAR-t expresszáló in vitro sejt rendszeren.

Módszerek: Kísérleteimben MELUR humán melanoma sejtvonalat használtam. A citotoxikus T-limfocitákat humán vérből szeparáltam két lépésben. Először a teljes vérből gradiens centrifugálással elválasztottam a PBMC frakciót, majd negatív mágneses szeparálással (MACS) kinyertem a citotoxikus limfocitákat. A sejtek biotechnológiai módosítását lentivirális transzdukciós rendszerrel végeztem a kollaborációs partnertől kapott plazmidok felhasználásával. A transzdukció hatékonyságát Alexa-647 konjugált anti-humán IgG jelölést követően BD FACS Calibur áramlási citométerrel mértem, az effektor és target sejtek között kialakult szinapsziseket Zeiss LSM510 konfokális mikroszkóppal vizsgáltam.

Eredmények: Kísérleteimben sikeresen előállítottam egy p97 melanotranszferrin specifikus tumorantigént felismerni képes genetikailag módosított T-sejt populációt. Az összes szeparált limfocita 20%-a sikeresen transzdukálódott. Megállapítottam, hogy kokultúrában a kiméra antigén receptort expresszáló effektor T-sejtek felismerik a target sejteket és azokkal immunoszinapszist képeznek. Mind a szinapszis mérete, mind a szinapszist képző sejtek száma az inkubációs idővel arányosan nőtt.

Következtetések: Megállapítottam, hogy a melanomára specifikus p97 melanotranszferrin antigén sikeresen alkalmazható terápiás célpontként kiméra antigén receptort expresszáló immunsejt-terápiás rendszerben.

Témavezető: Dr. Szőör Árpád

BIF.6. Zákány Florina ÁOK VI.

Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A PÓRUSBAN LEVŐ MUTÁCIÓK HATÁSA A SHAKER KÁLIUMCSATORNA KAPUZÁSÁRA

Korábban bizonyítást nyert, hogy a feszültségkapuzott ioncsatornák közé sorolható Shaker káliumcsatorna aktivációs és C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapui csatoltak, melyet a pórust közvetlenül határoló S6-os transzmembrán helikális szegmensek inaktiváció során bekövetkező forgása biztosíthat. Kísérleteimben azt vizsgáltam, hogy az S6-os szegmensek pórus felé tekintő pozícióit érintő mutációk hatással vannak-e a két kapu közti csatolásra.

Méréseimhez olyan mutáns Shaker-IR csatornákat használtam, melyek az S6-os szegmensek 470-es pozíciójában különböző hidrofobicitású, illetve töltésű aminosavakat (Ala, Trp, Glu, Asp) tartalmaztak. A kísérleteket a tsA₂₀₁ sejtekbe tranziensen transzfektált mutáns ioncsatornákon a patch-clamp technika feszültség-zár üzemmódjában, inside-out konfigurációban végeztem. Az elektrofiziológiai mérések során a mutáns csatornák kapuzását jellemző biofizikai paramétereket határoztam meg (aktivációs- és inaktivációs időállandó; konduktancia- és inaktiváció feszültségfüggése, inaktivációból való visszatérés időállandója) és hasonlítottam össze a kontrollként használt T449A/1470A ioncsatorna megfelelő paramétereivel.

A legjelentősebb eltérést az inaktívált állapot kialakulását jellemző inaktivációs időállandóban tapasztaltam. Míg az inaktivációs időállandó értéke a kontroll csatorna esetén ~70 ms, addig ez az érték a T449A/1470A ioncsatorna esetén ~315 ms. A 470-es pozícióba helyezett szintén apoláris oldalláncú triptofán, a negatív töltésű glutamát és aszpartát kevésbé lassította az inaktivációs kinetikát (az inaktivációs időállandók rendre ~110 ms, ~125 ms, ~145 ms). A mutáns ioncsatornák inaktivációs kapuzását jellemző további, valamint az aktivációs kapuzást jellemző paraméterek esetén kisebb mértékű változást tapasztaltam a kontrollhoz képest.

Az eredmények azt mutatják, hogy a pórusban levő aminosavak fizikokémiai tulajdonságai együttesen képesek befolyásolni a Shaker csatorna C-típusú inaktivációját, amely alátámasztja az S6-os szegmensek aktivációs és inaktivációs kapu közti csatolásban betöltött szerepét.

Támogatás: TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001

Témavezető: Dr. Szántó G. Tibor, Dr. Panyi György