

Új bioszenzorok fejlesztése az extracelluláris adenosin-nukleotidok sebzárádásban betöltött szerepének és egyéb funkcióinak megismerésére

A biológiai kompartmentumokban előforduló nukleotidok szintje és egymáshoz viszonyított aránya szigorúan szabályozott. Ilyen szorosan kontrollált nukleotid az extracelluláris ATP, mely irodalmi adatok alapján elengedhetetlen a nyálkahártyák hámsérüléseinek percek alatt történő bezárásához. Szintjének folyamatos szabályozásáért a sejtek felszínén elhelyezkedő ektonukleotidáz enzimek által katalizált defoszforiláció felelős, ami ADP-t eredményez. Nem ismert azonban, hogy a különböző adenosin-nukleotidok milyen koncentrációkban vannak jelen a sebösszehúzódnak folyamata során, és az sem, hogy szintjeik szabályozásáért milyen egyéb mechanizmusok felelősek az ektonukleotidázakon kívül. Kutatásunk célja az volt, hogy az ADP és ATP koncentrációk minél pontosabb extracelluláris feltérképezését tegyük lehetővé.

Kiválasztottunk két G-protein kapcsolt purinerg receptort, amelyek ligandjai az adenosin-nukleotidok. Ezek felhasználásával komplex molekuláris biológiai technikákkal több ATP-re és ADP-re specifikus, genetikailag kódolt fluoreszcens bioszenzort fejlesztettünk. A kódoló plazmidokat HEK293A sejtekbe transzfektáltuk, és kiszelektáltuk a legmagasabb fluoreszcens intenzitásváltozást mutató változatokat. Több mérést végezve 100 μ M-os ATP koncentráció-növekedés az ATP-re specifikus szenzor fluoreszcens jelében 93%-os, míg ugyanekkora ADP-szint emelkedés mellett az ADP-specifikus szenzoréban 48%-os emelkedést okozott átlagosan. Munkánk jelentőségét jelzi, hogy ezelőtt még nem írtak le ADP-re specifikus szenzort, és a korábbi ATP-re fejlesztett fluoreszcens bioszenzorokkal sem tapasztaltak ilyen mértékű konzisztens intenzitásváltozást.

Szenzoraink gátlószerek iránti érzékenységét is karakterizáltuk, továbbá *in vivo* kísérleteket végeztünk ektonukleotidáz inhibitorokkal a lárvakori áttetszősége miatt könnyedén tanulmányozható zebradánió modellen. Az ektonukleotidáz gátlószerek alkalmazása során a sebzárádáshoz kapcsolódóan fokozott hámsejt migrációt figyeltünk meg, mely feltételezhetően a magasabb extracelluláris ATP koncentrációkkal áll összefüggésben. Többek között ennek a kérdésnek a pontos megválaszolására adhatnak lehetőséget az új szenzoraink. Fejlesztéseinktől azt is reméljük, hogy segítségükkel feltérképezhetjük az adenosin-nukleotidok számtalan további szerepét.