

# DEBRECENI EGYETEM

University of Debrecen



Universitas Debreceniensis

## ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

Pethő Zoltán Dénes

Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet



## TDK KONFERENCIA

2009/10.

**B.7. Pethő Zoltán Dénes ÁOK III., Balajthy András ÁOK III.**  
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet  
**KÜLÖNBÖZŐ STIMULÁCIÓK HATÁSÁRA BEKÖVETKEZŐ  
PROLIFERÁCIÓ ÉS IONÁRAM- VÁLTOZÁS T-LIMFOCITÁKON**

A humán T-limfociták ionáramai és ezen belül a Kv1.3 K<sup>+</sup> áramok kritikus fontossággal bírnak az immunválasz létrejötte szempontjából. A sejtek nyugalmi helyzetben is kifejezik ezt az ioncsatornát, de stimulus (pl.: immunreakció) hatására a csatornaexpresszió többszörösére fokozódik. Az elektrofiziológiai és sejtbiológiai kísérletekben stimulációhoz nem patogéneket, hanem általában egy adott szignálútvonalon ható anyagot használunk fel. Vizsgálatainkban arra voltunk kíváncsiak, hogy a szignál minőségétől (pl. PKC útvonal, Ras/Rac útvonal, Ca<sup>2+</sup> koncentráció változás) függ-e a sejteken a Kv1.3 expresszió.

A vizsgálatokhoz humán perifériás vér limfocitákat használtunk fel. A sejtek osztódását CFSE (carboxifluorescein szukcinimidil észter) hígítási esszével áramlási citométeren követtük. A sejteket mitogén lektinnel (fitohemagglutinin: PHA); diacilglicerol analóggal (forbol 12-mirisztát 13-acetát: PMA) és Ca<sup>2+</sup>-ionofór kombinációjával (ionomycin); továbbá TCR-CD3 komplexen keresztül ható antitestekkel (anti-CD3 magában; anti-CD3+ anti-CD28 együtt) stimuláltuk. Ezt követően az 5. napon áramlási citométerrel megmértük a sejtosztódás mértékét és a sejtek felépítésének változását, majd teljes-sejt patch-clamp technikával a T-sejtek membránján átfolyó Kv1.3 ionáramokat.

Áramlási citométeren vizsgálva a PHA-val kezelt sejtek osztódtak, sejtméretük a kontroll 1,6 -1,9x-esére nőtt meg, komplexitásuk szintén szignifikánsan megnőtt. Az egy sejten mérhető maximális ionáram patch-clamp technikával mérve +50 mV depolarizációnál 1 nA-tól 4 nA-ig terjedt, ami a kontrollokon mért 200 - 600 pA-es áram sokszorososa. Az anti-CD3, valamint az anti-CD3+anti-CD28 kezelés kifejezetten osztódást okozott, de ionáramokat itt csak a 800 pA - 2 nA nagyságrendben mértünk. A PMA+ionomycin kezelésekkor a sejtek szintén stimulálódtak, ekkor a mért áram 700 pA - 1,6 nA volt. Konklúzióként levonható, hogy a humán T-sejteken a Kv1.3 expresszió szempontjából a PHA kezelés bizonyult a leghatásosabbnak.

Témavezető: Dr. Varga Zoltán, Dr. Panyi György

**É.3. Balajthy András ÁOK III., Pethő Zoltán Dénes ÁOK III.**  
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet  
KV1.3 IONCSATORNÁK VIZSGÁLATA  
HYPERCHOLESTERINAEMIÁS ÁLLAPOTBAN

Ismert, hogy a sejtmembrán koleszterintartalmának változása befolyásolhatja a membránfehérjék működését. Az erre vonatkozó tanulmányok jelentős részében mesterséges úton, cyclodextrinek segítségével változtatták a membrán koleszterin tartalmát. Korábban munkacsoportunk igazolta, hogy a sejtmembrán koleszterin tartalmának növelése (in vitro koleszterin/cyclodextrin zárványkomplex kezelés) módosítja humán T-lymphocyták Kv1.3 K<sup>+</sup> ioncsatornáinak biofizikai paramétereit. Munkánk során azt vizsgáltuk meg, hogy a modellkísérletekben leírt változások megfigyelhetők-e hypercholesterinaemiás állapotú egyénekből származó T-sejtek Kv1.3 csatornáin is.

Kísérleteink során a klinikai laboratóriumi standardok szerint normális (<5,2 mmol/l) koleszterinszinttel rendelkező (kontroll, n=5), valamint hypercholesterinaemiás („hc”, a koleszterinszint a normális érték 1,5-2-szerese volt, n=5) egyének perifériás vérből izolált T-lymphocytákat vizsgáltunk. A Kv1.3 ioncsatorna biofizikai sajátosságait a patch-clamp technika teljes-sejt konfigurációjában tanulmányoztuk. A „hc” minták az I. Belklinika Lipid Szakrendelésre járó, egyéb betegségben nem szenvedő egyénektől származnak. A Kv1.3 csatornák kapuzását jellemző kinetikai (az aktivációs és inaktivációs kinetika és az inaktivációból való visszatérést jellemző időállandók), és egyensúlyi paramétereket (egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültség-függése) határoztuk meg. A teljes-sejt kapacitásra normált csúcsáram értékkel (áramsűrűség, AS) jellemeztük a csatornák expressziós szintjét.

Eredményeink azt mutatták, hogy a „hc” mintákból származó T-sejtek Kv1.3 ioncsatornáinak biofizikai tulajdonságai nem különböztek a kontroll csoportra jellemző értékektől ( $p=0,05$ ). A szérum koleszterinszint növekedése tehát nem okoz olyan biofizikai változásokat, mint amit a koleszterin/cyclodextrin zárványkomplex kezelések során tapasztaltunk. A „hc” mintából származó T-sejteken mért áramsűrűség értéke ( $AS_{hc}=610 \text{ pA/pF}$ ) szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll ( $AS_k=398 \text{ pA/pF}$ ,  $p=0,05$ ) sejtek esetében. Ezt valószínűleg a hypercholesterinaemiához társuló, chronicus gyulladásos folyamatoknak és az ezek során termelődő citokineknek tulajdoníthatjuk.

Témavezető: Dr. Hajdú Péter, Dr. Panyi György