

DEBRECENI EGYETEM

University of Debrecen



Universitas Debreceniensis

ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

Pethő Zoltán Dénes

Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet



TDK KONFERENCIA

2010/11.

B.6. Pethő Zoltán Dénes ÁOK IV, Balajthy András ÁOK IV
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

KATIONCSATORNA-GÁTLÓSZEREK HATÁSA MITOGÉNNEL STIMULÁLT T-LIMFOCITÁKRA

A humán T-limfociták ioncsatornáinak működése nagymértékben befolyásolja ezen sejtek aktivációját, és ezáltal az immunválaszt. A legfontosabb ioncsatornák a feszültségfüggő Kv1.3 és a Ca²⁺-aktivált IKCa1 K⁺-csatornák, illetve a CRAC, vagyis a Ca²⁺-felszabadulás aktiválta Ca²⁺-csatorna. Ezen ioncsatornák gátolhatók specifikus gátlószerekkel, ami különböző mechanizmusokon keresztül a sejtaktiváció és -proliferáció gátlásához vezethet. Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy az egyes ioncsatornák gátlása a különböző koncentrációjú mitogénnel kezelt sejtek proliferációját és aktivációját hogyan befolyásolja.

A vizsgálatokhoz humán perifériás vér limfocitákat használtunk fel. A sejteket a T-sejt receptor-CD3-komplexhez és a ko-stimulátor CD28-hoz kötődő antitestekkel (anti-CD3 és anti-CD28) stimuláltuk, ezeket együttesen, különböző koncentrációkban használtuk. A sejtekhez Kv1.3 gátlószert (TEA, Anuroctoxin), IKCa1 gátlószert (TRAM-34) vagy CRAC gátlószert (2-Apb), illetve ezek kombinációját adtuk három koncentrációban: a disszociációs állandónak megfelelő, azaz átlagosan a csatornák felét gátló koncentrációban (Kd), ennek a háromszorosában (3Kd), illetve tízszeresében (10Kd). Ezt követően az ötödik napon áramlási citométerrel vizsgáltuk a sejtosztódás mértékét CFSE (karboxifluorescein szukcinimidil észter) hígítási esszével.

Eredményeink alapján az anti-CD3 és anti-CD28 koncentrációjának emelése fokozta a proliferáció mértékét. Hasonlóképp az alkalmazott gátlószerek is dóziszfüggően csökkentették az osztódó sejtek arányát, a 2-Apb kivételével. A 2-Apb viszont késleltette a sejtaktivációt, vagyis amíg a kontrollsejtek mitogénkezelés mellett a többi esetben akár négy osztódási cikluson is végigmentek, addig 2-Apb hatására csak kettőn. A mitogénkoncentráció növelésével ugyanakkor egyre kisebb lett a gátlószerek proliferációt gátló hatása, és a maximális koncentráció mellett még 10Kd koncentrációban alkalmazott gátlószert sem okozott szignifikáns csökkenést az aktivációban. A proliferáció legnagyobb mértékű gátlását a gátlószerek együttes alkalmazása esetén tapasztaltuk, ami a különböző csatornák szabályozási útvonalainak szinergizmusára utal.

Témavezető: Dr. Varga Zoltán, Prof. Dr. Panyi György

Balajthy András ÁOK III., Pethő Zoltán Dénes ÁOK III.
DEOEC, 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⁺ 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 véréből 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 kinetikát és az inaktivációból való visszatérést jellemző időállandók), és egyensúlyi paramétereiket (egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültség-függése) határoztuk meg. A teljes-sejt kapacitásra normált csúcsáram értékkel (áramsűrűség, $\bar{A}_S$) 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 ($\bar{A}_{S_{hc}}=610$ pA/pF) szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll ($\bar{A}_{S_k}=398$ pA/pF, $p=0,05$) sejtek esetében. Ezt valószínűleg a hypercholesterinaemiához társuló, chronicus gyulladásos folyamatoknak és az ezek során termelődő cytokineknek tulajdoníthatjuk.

Témavezető: Dr. Hajdú Péter, Dr. Panyi György