

A cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor hatása a sav/bázis transzporterek működésére humán hasnyálmirigy vezeték sejtekben

Ph.D. értekezés tézisei

Ignáth Imre

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
I. sz. Belgyógyászati Klinika
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
A gasztrointesztinális rendszer működése ép és kóros körülmények között
című Doktori Program

**Témavezetők: Ifj. Dr. Rakonczay Zoltán
Dr. Hegyi Péter**

Szeged
2010

1. Bevezetés

A hasnyálmirigy az emésztő rendszer részét képezi, és egyaránt rendelkezik exokrin és endokrin funkcióval. Az exokrin hasnyálmirigy két fő sejttípust tartalmaz: acinus és vezeték (duktusz) sejteket. Az acinus sejtek élettanát és kórélettanát széles körben vizsgálták. Jól ismert azonban, hogy számos hasnyálmirigy betegség (pl.: a hasnyálmirigyrák és a cisztás fibrózis, CF) a rendellenes duktális sejt működéssel magyarázható. Kutatásunk fő irányvonala az volt, hogy a duktusz sejtek szerepét, molekuláris és sejtélettani működését tanulmányozzuk.

A hasnyálmirigy duktusz sejtek abszorbeálnak és szekretálnak HCO_3^- -ot. Nyugalmi állapotban a hasnyálmirigy vezetékében az apikális membránon keresztül HCO_3^- abszorpciója zajlik. Egér hasnyálmirigy vezetékében azonosítottak egy lumenális Na^+/H^+ cserélőt (NHE3), egy Na^+ függő mechanizmust ami különbözik bármilyen ismert NHE izoformától és az elektroneutrális $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszportert (SLC4A7, NBCn1, NBC3) melyek felelősek lehetnek a HCO_3^- abszorpcióért. A visszaszívott HCO_3^- -ot a duktusz sejtek valószínűleg az extracelluláris térbe exportálják a bazolaterális AE2 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélő segítségével. A stimulált HCO_3^- szekréció az intracelluláris ciklikus AMP (cAMP) emelkedésén keresztül csökkenti ezeknek a lumenális HCO_3^- transzportereknek az aktivitását.

A HCO_3^- szekréció kezdeti lépése a HCO_3^- felvétele a duktuszsejtekbe az extracelluláris térből. A HCO_3^- a bazolaterális $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ co-transzporterrel keresztül (NBC) jut be a sejtbe, vagy a CO_2 diffúziója után a sejtben képződik a szénsav bontása útján, amit a szénsav anhidráz katalizál. Az így képződött protonokat a Na^+/H^+ cserélő (NHE) és/vagy a protonpumpák juttatják ki a sejtéből. A HCO_3^- kiválasztás az apikális membránon keresztül a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátoron (CFTR), ami egy cAMP/protein kináz (PKA) által szabályozott Cl^- csatorna, és az SLC26 családba tartozó SLC26A3 (DRA) és/vagy SLC26A6 (PAT-1) anion cserélőn át valósul meg. Mindezen apikális transzporterek egymáshoz viszonyított fontossága a HCO_3^- kiválasztásban egy tisztázatlan kérdés.

A CF a leggyakoribb halálos autoszomális recesszív betegség a kaukázusi populációban, amelyet a CFTR hiánya vagy rendellenes működése okoz. A CFTR nem megfelelő működése fontos szerepet játszik a csökkent epitheliális HCO_3^- kiválasztásban. A CFTR transzportálja ugyan a HCO_3^- -ot, de kisebb arányban, mint a Cl^- -t. Mindazonáltal még mindig nem világos, hogy a CFTR fő szerepe a HCO_3^- kiválasztásban az, hogy közvetlenül szekretálja a HCO_3^- -ot, vagy a lumenálisan kiválasztott Cl^- -al egy Cl^- forrást nyújtson az apikális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cseréhez, vagy közvetlenül aktiválja az apikális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélőket.

A Vater Ampullának a vándorló epekövek miatti elzáródása egyik jelentős rizikófaktora az akut hasnyálmirigy gyulladásnak. Az elzáródás az epe és a hasnyál visszafolyását okozhatja a hasnyálmirigybe. Hasnyálmirigy acinus sejtekben az epesavak a sejten belüli kalcium-koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) emelkedését okozzák, ami korai tripszinogén aktiválódáshoz, majd sejthalálhoz vezet.

Munkacsoportunk kutatásából ismert, hogy a lúminálisan adott alacsony koncentrációjú (0,1 mM) nem konjugált epesav, a kenodezoxikolsav (CDC) jelentősen emeli az apikális Cl^-/HCO_3^- cserélő aktivitását és a HCO_3^- szekréciót tengerimalac duktusz sejtekben és ezek a folyamatok Ca^{2+} függőek. Ezzel szemben a nagy dózisú epesav (1 mM CDC) erősen gátolja a duktális HCO_3^- transzportot. Nemrég azt is kimutattuk, hogy a HCO_3^- szekréció 1 mM CDC általi gátlását a mitokondriális károsodás okozza a sejten belüli ATP szint csökkenése miatt. A 0,1 mM CDC az apikális Cl^-/HCO_3^- cserélőre kifejtett stimuláló hatását legvalószínűbben a PAT-1 mediálja, mert az egy kompetitív gátlószerezrel (H_2 -DIDS) blokkolható volt. Mivel a HCO_3^- szekréció a CFTR és az SLC26 anion cserélők interakciója révén jön létre, ezért fontos volna tisztázni, hogy a CDC stimuláló hatása az anion cserélők aktivitására és a HCO_3^- szekrécióra függ-e a CFTR kifejeződésétől és a funkcionális Cl^- csatorna aktivitásától.

Az emberi hasnyálmirigy szövet korlátozott elérhetősége miatt a legtöbb HCO_3^- szekrécióról szóló tanulmányt egereken és tengerimalacokon végézik. Másrészt az immortalizált emberi duktális sejtvonalakat szintén széles körben használják a HCO_3^- transzport vizsgálatához. A CFPAC-1 sejtvonal egy 26 éves CF-os adenokarcinómás férfi hasnyálmirigyéből izolált duktális sejteiből lett létrehozva. A CFPAC-1 sejtek a leggyakoribb CFTR mutációt hordozzák homozigóta formában, amelyre az jellemző, hogy az 508. pozícióban három nukleotid deléciója fenilalanin hiányhoz (F508del) vezet. Ennek a mutáns fehérjének a nagyobbik része az endoplazmatikus retikulumban marad és degradálódik. A sérült fehérje kisebbik része eléri a plazma membránt, de nem válaszol megfelelően a cAMP stimulációra. A cAMP-analógok, foszfodiészteráz-gátlók és a forskolin nem képesek aktiválni a károsodott CFTR fehérjét. Ezeket a tulajdonságokat a sejtek több mint 80 passzáson át megtartották. Ez a tény bizonyítja, hogy a CFPAC-1 sejtek fenntarthatóak sejtvonalként és a hibás CFTR csatorna fejeződik ki bennük. Ezen a sejtvonalon már korábban jól jellemezték a H^+ és a HCO_3^- transzport folyamatokat. Úgy tűnt tehát, hogy a CFPAC-1 sejtek jól használhatóak *in vitro* modellként a CFTR génkifejeződésnek a HCO_3^- transzportra kifejtett hatásának vizsgálatára.

2. Célkitűzések

Munkám fő célkitűzései a következők vizsgálatára:

- a.) a vad típusú (vt) CFTR-t tartalmazó rekombináns Sendai vírus (SeV) vektor hatása emberi CF hasnyálmirigy- (CFPAC-1) duktális sejtekre
- b.) a vt CFTR kifejeződés hatásai a H^+ és a HCO_3^- transzport folyamatokra CF hasnyálmirigy duktusz sejtekben
- c.) a CDC hatása az intracelluláris pH-ra (pH_i), és az apikális Cl^-/HCO_3^- cserélő aktivitására vt CFTR-al transzdukált és nem transzdukált CFPAC-1 sejtekben
- d.) az alacsony dózisu CDC növeli-e a CFTR Cl^- csatorna aktivitását

3. Anyagok és módszerek

3.1. CFPAC-1 sejtkultúrák

A sejteket Iscove's modified Dulbecco's médiumban (IMDM) tenyésztettük, amelyet 10 % borjúszérummal, 2 mM glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel és 0,1 mg/ml streptomocinnel egészítettünk ki. A CFPAC-1 sejteket permeábilis poliészter membránra (12 mm átmérőjű, 0,4 μ m pórusméretű transwell) szélesztettük nagy denzitással (300.000-350.000 sejt/ cm^2).

3.2. Tengerimalac hasnyálmirigy duktusz sejtek izolálása

A patch clamp kísérletekhez kis intra- és interlobuláris duktuszokat izoláltunk 150-250 g tömegű tengerimalacok hasnyálmirigyéből. A duktuszokat overnight inkubáltuk és elasztáz emésztéssel önálló sejteket különítettünk el.

3.3. A rekombináns Sendai vírus vektor konstrukciója

A SeV vektorokat a DनावेC Corporation készítette. A kísérletek során alkalmazott teljes hosszúságú SeV génsorrendje a következő volt: a 3'-vég vezető szekvenciáját vírus gének követték: nukleokapszid-, fospho-, mátrix-, fúziós-, hemagglutinin-neuraminidáz fehérjék. A

vad típusú SeV vektort amelynek cDNS-e tartalmazta a β -galaktozidáz (LacZ) gént (SeV-LacZ), vagy a vt CFTR gént (SeV-CFTR), a LacZ vagy a SeV-CFTR fragment amplifikálásának használatával készült.

3.4. Transzdukció rekombináns Sendai vírussal

A transwelleken növesztett CFPAC-1 sejteket 3 nappal a szélesztés után SeV-CFTR-ral vagy SeV-LacZ-vel transzdukáltuk. A sejtek foszfátpufferelt sóoldat (PBS)-tal történő mosása után a SeV 6×10^5 (0,6 μ l) vagy 3×10^6 (3 μ l) plakk-képző egységeit (a fertőzés multiplicitása, MOI = 3 ill. 15) tartalmazó szérummentes IMDM-mal (33 μ l végtérfogat) apikálisan fertőztük. A sejteket bazolaterálisan csak 800 μ l szérummentes IMDM-ben inkubáltuk.

3.5. β -galaktozidáz festés

A β -galaktozidáz aktivitást *in situ* festéssel ellenőriztük.

3.6. Western blot

3.6.1. CFTR

A vt és F508del CFTR expresszióját a CFPAC-1 és kontrollként CAPAN-1 sejteket, valamint újszülött hörcsög vese sejteket használva teljes fehérje extraktumból vizsgáltuk Western blottal.

3.6.2. A PKA katalitikus alegysége

A PKA katalitikus alegységét (PKAcat) a PKA aktivitás vizsgálatához használt immunprecipitált pelletből mutattuk ki. A nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gél-elektroforézist Novex rendszer segítségével végeztük 4-12 %-os Bis-Tris poliakrilamid gélen. A fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. TBS-Tweennel (0,5 % Tween-20) és 5 % tejjel 30 percig történő blokkolás után a membránokat PKAcat-ellenes antitesttel, majd másodlagos anti-nyúl antitesttel inkubáltuk. Az immunoreaktív csíkokat erősített kemilumineszcenciával jelenítettük meg.

3.7. Immunocitokémia

2 nappal a SeV-LacZ-vel vagy SeV-CFTR-ral történő fertőzés után a sejteket PBS-tal mostuk, majd metanollal fixáltuk és permeabilizáltuk jégen 15 percig. A monolayereket 3 %-os ló szérummal blokkoltuk 1 órán át. Ezután a sejteket 4 °C-on inkubáltuk overnight egér anti-ZO-1 vagy anti-CFTR antitesttel (1:100). A sejteket háromszor mostuk PBS-tal, majd 1 órán keresztül 3 %-os kecske szérummal inkubáltuk, majd kecske anti-egér-FITC másodlagos antitesttel (1:100) kezeltük. A filtereket PBS-tal mostuk, 1 μ g/ml propidium-jodidban inkubáltuk 5-10

percig (a sejtmagok megfestéséhez), ezután Vectashield mounting mediummal fedtük. A festést konfokális lézermikroszkóppal vizsgáltuk, amely egyaránt képes gerjesztésre és az emisszió detektálására is.

3.8. Jodid-kiáramlás vizsgálata

A jodid-kiáramlás egyensúlyi állapotának elérése után (6 perc), a sejtekre intracelluláris cAMP-szintet növelő agonistákat tartalmazó efflux oldatot mértünk 10 percen keresztül. Néhány kísérlet során a sejteket a jodid tartalmú inkubáló puffer eltávolítása után 10 μM CFTR-172-vel vagy dimetilszulfoxiddal (DMSO) kezeltük. A mintákban levő jodid mennyiségét jodid-szelektív elektródával határoztuk meg.

3.9. DRA, PAT-1, AE2, pNBC1, NHE2, NHE3 mRNS expresszió

3.9.1. mRNS izolálás és reverz transzkripció

Az összRNS-t GenEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep Kit alkalmazásával nyertük ki. A teljes RNS-t (1 μg) cDNS szintézisére használtuk fel oligodT primer alkalmazásával.

3.9.2. Szemi-quantitatív polimeráz láncreakció (PCR)

Az első szál cDNS-t Primer3 software segítségével tervezett, a kiválasztott transzporterekre specifikus PCR primerekkel amplifikáltuk. A PCR-t Taq polimerázzal végeztük. A PCR-kísérletekhez belső koncentráció-kontrollként savas riboszómális foszoproteint (XS13) használtunk, amelyet 19 ciklussal amplifikáltunk. Az elektrolit-transzporterek primereinek pozitív kontrolljaként normál humán pancreasból és HPAF sejtekből izolált teljes RNS kivonatot alkalmaztunk.

3.9.3. Real-time PCR

A DRA, PAT-1, AE2, NHE2 és NHE3 génexpresszióinak kvantitatív analízisét valós idejű (real time) PCR-rel végeztük. A real-time PCR primereket és a FAM-jelölt MGB célspecifikus fluoreszcens próbákat az Applied Biosystems-től rendeltük, és a DRA, PAT-1 AE2, NHE2, NHE3 és az XS13 vizsgálatára alkalmaztuk.

3.10. Az intracelluláris pH és intracelluláris Ca^{2+} koncentráció

A pH_i méréshez a sejteket 2 μM BCECF-AM-mel töltöttük 30 percig, majd a transwelleket egy perfúziós kamrába helyeztük egy invertált Olympus mikroszkópra. A 4-5 kis terület (ROI) egyenként 180-250 sejtjét 440 és 490 nm hullámhosszúságú fénnel világítottunk meg, majd a 490/440 fluoreszcens emissziós arányt 535 nm-en mértük. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérését a pH_i -méréshez hasonlóan hajtottuk végre, a sejteket azonban FURA2-AM-rel (5 μM) töltöttük 60 percen

keresztül. A festék gerjesztéséhez 340 és 380 nm-es filtert használtunk, és a $[Ca^{2+}]_i$ -ban történő változásokat az 510 nm-en mért fluoreszcens arányból (F_{340}/F_{380}) számoltuk.

3.11. Az össz- pH_i változás és a bázis áramlás

A pH_i -változás (ΔpH_i) meghatározásához közvetlenül az oldatsere előtt és után a maximumon 80-80 adatpontot átlagoltunk, majd különbségüket képeztük. A pH_i -változás kezdő (első 30-50 mp) értékeit az oldat váltástól a transzmembrán bázisáramlás $J(B)$ számolásánál használtuk fel. $J(B) = \Delta pH_i / \Delta t \cdot$ teljes pufferkapacitás (β_{total}). A $J(B)$ számolásához az oldatszerét megelőző 30 mp-es periódus átlag pH_i -értékeihez tartozó β_{total} értékeket alkalmaztuk. A bázis beáramlást $J(B)$ -vel, a bázis kiáramlást $-J(B)$ -vel jelöltük.

3.12. PKA aktivitás vizsgálata

A CFPAC-1 sejteket mechanikai lízissel (Polytron) homogenizáltuk háromszoros térfogatú, proteáz inhibitor koktélt (Boehringer Complete tableta) tartalmazó, jéghideg pufferben. Az egészséj-lizátumot immunprecipitációhoz használtuk. A precipitáció előtt a protein A sepharose gyöngyöt és a PKAcát antitestet a dimetil pimelimidáttal keresztkötöttük Harlow és Lane (1988) technikája alapján. 20 μg egészséj-lizátumhoz 7 μl antitest-keresztkötött protein A gyöngyöt adtunk. Az inkubációt 30 °C-on, 10 percig végeztük, majd a reakcióelegyből 15 μl -t P81 foszfozellulóz papír 1 cm^2 -ére vittük fel, amelyet ezután 3 x 5 percig 1 %-os foszforsavval mostunk. Az össz γ - ^{32}P -aktivitást Packard Instant Imager segítségével mértük. A PKA foszfortranszfer aktivitásának megállapítására 100 mM PKA peptid inhibitorát alkalmaztunk.

3.13. Elektrofiziológia

A patch pipettákat boroszilikát üvegből húztuk és tűzben csiszoltuk. A pipetták rezisztenciája 3 és 5 $M\Omega$ között volt. A seal ellenállás tipikusan 5 és 10 $G\Omega$ között volt. Az önálló ductus sejtek whole cell áramának rögzítését EPC-7 erősítővel végeztük szobahőmérsékleten. Az adatokat 1 kHz-nél szűrtük, 2 kHz-n vettünk mintát CED 1401 interface segítségével, és az adatokat a számítógép merevlemezére mentettük el.

3.14. Statisztikai analízis

Kísérleteink során a különböző CFPAC-1 sejtcsoportoknál eltérések voltak a HCO_3^- -felvétel sebességében és mértékében, ezért az azonos napon végzett méréseket egy sejtcsoporttal hajtottuk végre random sorrendben, és ahol lehetett, ott önkontrollós méréseket végeztünk. A

statisztikai analízis során Student-féle páros vagy páratlan t-próbát illetve variancia analízist alkalmaztuk.

4. Eredmények és következtetések

4.1 A SeV vektor-mediált génbevitel hatékonysága

A génbevitel hatékonyságának vizsgálatához a polarizált CFPAC-1 sejteket SeV-LacZ vektorral transzdukáltuk az apikális vagy a bazolaterális oldal felől egy órán át ($n = 6$). LacZ aktivitást a fertőzés után 48 és 96 óra között mértünk. A kezdeti kísérletek azt mutatták, hogy a bazolaterális oldal felől adott SeV-LacZ esetében csak kismértékű volt a génbevitel határfoka. Mindazonáltal, SeV-LacZ fertőzést ($MOI = 3$) követően az apikális membránon, erős, homogén LacZ aktivitást figyeltünk meg a sejtek 32 ± 2 százalékában. A magasabb titerű, $MOI = 15$ fertőzés esetén a sejtek 68 ± 3 százalékában volt LacZ aktivitás. Összességében megállapíthatjuk, hogy a CFPAC-1 sejtek SeV vektorral végzett transzdukciója hatékonyabb volt az apikális membrán felől és világosan látszott, hogy a transzdukált sejtek száma arányban állt a használt SeV vektor mennyiségével.

4.2. A SeV vektor-mediált transzdukció hatása a CFTR expresszióra

A nem transzdukált natív, illetve a SeV-LacZ-vel transzdukált CFPAC-1 sejtek nagyon kevés CFTR fehérjét expresszáltak. Ezekben a sejtekben Western blottal csak az éretlen CFTR-t tudtuk detektálni. A SeV-CFTR-ral transzdukált CFPAC-1 sejtekben viszont nagy mennyiségben tudtuk kimutatni a CFTR-nak mind az érett, mind az éretlen formáját. Mivel a CFTR overexpresszió a fehérje miszlokalizációját eredményezheti, így immunocitokémiával meghatároztuk a fehérje elhelyezkedését. A CFTR a SeV-CFTR sejtek ($MOI=3$) apikális oldalára lokalizálódott. A CFTR funkcionális aktivitását a jodid kiáramlás vizsgálatával végeztük. A sejten belüli cAMP szint növekedésének nem volt hatása a jodid kiáramlásra sem SeV-LacZ ($MOI = 3$), sem SeV-CFTR ($MOI = 15$) sejtekben. Ezzel szemben a SeV-CFTR-ral ($MOI = 3$) transzdukált CFPAC-1 sejtek esetében ötből négy kísérletben serkentette a jodid kiáramlást.

4.3. A DRA, PAT-1, AE2, pNBC1, NHE2 és NHE3 mRNS expressziója SeV vektorral transzdukált CFPAC-1 sejtekben

A szemi-quantitatív PCR vizsgálataink szerint a PAT-1, AE2, és pNBC1 is konstitutívan expresszálódott a nem transzdukált és a SeV vektorral transzdukált CFPAC-1 sejtekben. Mindazonáltal, nem detektáltunk viszont DRA, NHE2, és NHE3 mRNS expressziót. A CFTR transzdukciónak nem volt nyilvánvaló hatása a PAT-1, AE2 és pNBC1 mRNS szintjére. DRA, NHE2 és NHE3 mRNS vt CFTR expresszió esetén sem volt kimutatható. A kontrollként használt XS13 háztartási gén hasonló mértékben expresszálódott minden mintában. Az előző kísérleti eredményeket megerősítendően szintén végeztünk néhány real-time RT-PCR kísérletet. Ezeknél sem találtunk statisztikai különbséget a PAT-1 és az AE2 kifejeződés mértékében a különböző sejtszöveteknél. Szintén nem tudtuk kimutatni DRA, NHE2, és NHE3 expressziót valamennyi sejtszövetet vizsgálva. Az adatok azt jelzik, hogy a CFTR kivételével a CFPAC-1 sejtek expresszálják a HCO_3^- szekrécióhoz szükséges kulcs transzportereket, nevezetesen a pNBC1-t és PAT-1-t. A génterápia szempontjából fontos, hogy a SeV vektorral való fertőzés a MOI = 3 és a MOI = 15 sejtekben (CFTR-ral, vagy CFTR expresszió nélkül) sem hatott ezeknek a kulcs transzportereknek az expressziójára.

4.4. A SeV vektor fertőzés hatása a CFPAC-1 sejtek integritására

4.4.1 Transzepiteliális ellenállás

A transzepiteliális ellenállás (R_T) az epiteliális szövet szerkezeti épségének mérésére használható, mivel az elektromos ellenállást főleg a tight junction-ok elektromos vezetőképessége határozzák meg. A poliészter Transwellen tenyésztett CFPAC-1 sejtek 2-3 nappal a szélesztés után váltak konfluensé. A R_T 4-5 nap folyamán folyamatosan növekedett egy $199 \pm 10 \Omega \text{ cm}^2$ maximum szintig a nem transzdukált. A R_T szignifikánsan magasabb volt a SeV-LacZ (MOI = 3: $400 \pm 15 \Omega \text{ cm}^2$, MOI = 15: $314 \pm 13 \Omega \text{ cm}^2$) és a SeV-CFTR transzdukált sejtekben (MOI = 3: $243 \pm 5 \Omega \text{ cm}^2$, MOI = 15: $268 \pm 9 \Omega \text{ cm}^2$) összehasonlítva a nem transzdukált sejtekkel (n = 9-69). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a SeV vektorral való transzdukció nem bontotta meg a CFPAC-1 epitélium szerkezeti épségét, sőt az epitélium inkább kissé szorosabbá vált a vírushatás után.

4.4.2. A ZO-1 expressziója polarizált natív és SeV transzdukált CFPAC-1 sejt kultúrákban

A ZO-1 tight junction fehérje a sejtek apikális részére lokalizálódott és a tight junction expressziójának megfelelően egy jellemző mintázatot mutatott mind a kontroll, mind a SeV transzdukált CFPAC-1 sejtekben. A ZO-1 expressziójában nem volt megfigyelhető különbség a különböző sejtszövetekben.

4.5. A SeV transzdukált CFPAC-1 sejtek nyugalmi pH_i -ja és pufferkapacitása

Az intrinzik puffer kapacitás (β_i) és a nyugalmi pH_i kulcsfontosságú paraméterei a HCO_3^- -ot szekretáló epitél sejteknek. A CFPAC-1 sejtek nyugalmi pH_i -ja standard HEPES oldatban $7,11 \pm 0,08$ ($n = 6$) volt és nem volt szignifikáns különbség a SeV-CFTR (MOI = 3) fertőzött sejtekhez ($7,09 \pm 0,10$, $n = 6$) képest. Standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldatban a SeV-LacZ sejtek (MOI=15) nyugalmi pH_i értéke szignifikánsan magasabb volt ($7,26 \pm 0,01$) a SeV-CFTR sejtekhez ($7,20 \pm 0,02$) képest ($n=12$). Korábban kimutattuk, hogy a β_i rendkívül variábilis a különböző CFPAC-1 monolayerekben. Egy előző tanulmányban azt találtuk, hogy a nem fertőzött CFPAC-1 sejtek puffer kapacitása 34 ± 8 mM/pH volt $7,0$ - $7,2$ pH_i érték között. A SeV-CFTR és SeV-LacZ transzdukált (MOI = 15) sejtek ($n=9$ - 11) β_i értékei ennél a pH_i tartománynál 46 ± 7 és 46 ± 6 mM/pH volt. Ezek a β_i értékek statisztikailag nem különböznek egymástól. Eredményeink azt mutatják, hogy SeV vektorfertőzésnek nincs nyilvánvaló hatása a CFPAC-1 sejtek pH_i szabályozó mechanizmusaira és a β_i -ra .

4.6. A CFTR expresszió hatása a CFPAC-1 sejtek funkcionális polaritására

Rakonczay és munkatársai korábban (2006) kimutatták, hogy a CFPAC-1 monolayer apikális és bazolaterális membránja különbözőképpen eresztí át a CO_2 -t és HCO_3^- -ot. A bazolaterális oldalon adott standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldat gyors intracelluláris alkalizációt okozott, ami arra utal, hogy a bazolaterális membrán gyorsabban engedi át a HCO_3^- -ot, mint a CO_2 -ot. Ez főleg a bazolaterális NBC jelenlétével magyarázható. Ezzel ellentétben az apikális membránon a $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ tartalmú oldat gyors sejten belüli acidifikációt okozott, ami a CO_2 diffúziójával magyarázható. A hasnyálmirigy duktuszok apikális membránja meggátolja a HCO_3^- visszadiffundálását a lumenből, aminek valószínűleg élettani okai vannak, hiszen a szekretált HCO_3^- -nak a duktuszok lumenében kell maradnia. A CFPAC-1 sejtek funkcionális polaritását vizsgálva SeV transzdukciót végeztünk SeV-LacZ és SeV-CFTR vektorokkal apikális és bazolaterális oldalon. Kezdetben, az apikális és a bazolaterális membránt is standard HEPES oldattal perfundáltuk, azután az apikális oldalon áramló oldatot standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -ra cseréltük. Ez gyors sejten belüli acidózist okozott a CO_2 sejtbe diffundálása miatt. A következő lépésben apikálisan $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldatot adtunk, a ΔpH_i és a $-J(B)$ $0,20 \pm 0,01$ és $+23,7 \pm 0,9$ mM B/min volt. A gyors intracelluláris savasodás után a pH_i stabilan alacsonyabb maradt. Végül a bazolaterális oldatot standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldatra cseréltük, ami gyors alkalizációt okozott, minden bizonnyal a sejtek gyors HCO_3^- felvétele miatt (a ΔpH_i és $J(B)$ $0,37 \pm 0,01$ illetve $17,14 \pm 0,74$ mM b/min volt). Az apikális standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldat adását követően a pH_i csökkenés

nem mutatott szignifikáns különbséget SeV-LacZ MOI=3 sejtekben. Mindazonáltal a gyors savasodás után a kísérletek körülbelül 50 százalékában a pH_i lassan emelkedett SeV-CFTR sejtekben. A CFTR korlátozott áteresztőképességet mutat HCO_3^- -ra, így ezt a lassú alkalizációt a HCO_3^- visszaáramlása okozhatja a lumenális kompartmentenből a CFTR-on keresztül. A bazolaterális oldalon adott standard HCO_3^-/CO_2 oldat alkalizációt okozott a MOI = 15 és a MOI=3 SeV-CFTR sejtekben egyaránt. Az alacsony titerű (MOI = 3) SeV-CFTR-ral transzdukált sejtekben a pH_i változás hasonló volt a SeV-LacZ sejtekben megfigyelthez. Ezek az adatok kapcsolatban lehetnek a CFTR hiperexpressziójával. Magas titerű (MOI = 15) SeV transzdukció esetén vagy csökken a bazolaterális membránon belépő HCO_3^- mennyisége, vagy nő az apikális membránon át történő HCO_3^- kiáramlás. Mindazonáltal, a magas koncentrációjú SeV vektorral transzdukált sejtek is egyértelműen megtartották a tipikus különbségeket az apikális és bazolaterális CO_2 , valamint HCO_3^- áteresztőképességüket illetően.

4.7. A SeV vektor fertőzés és a CFTR expresszió hatása a Cl^-/HCO_3^- cserélő aktivitására

A pankreasz ductusz sejtek bazolaterális és apikális membránján is megfigyelhető anioncserélő aktivitás. A bazolaterális anioncserélő élettani szerepe tisztázatlan. A hasnyálmirigy ductusok apikális membránján keresztüli HCO_3^- szekrécióban a CFTR-nak és az SLC26 család Cl^-/HCO_3^- cserélőjének is szerepe van. A PCR adataink azt mutatják, hogy a CFPAC-1 sejtekben a PAT-1 SLC26 anion cserélő expresszálódik. Az anion cserélő hasnyálmirigy ductusz sejtek funkciójában betöltött szerepére vonatkozóan úgy döntöttünk, megvizsgáljuk a SeV vektorral való transzdukció és a CFTR expresszió hatását az anion cserélők aktivitására.

4.7.1 Bazolaterális membrán

A Cl^- elvonása a bazolaterális standard HCO_3^-/CO_2 oldatból egyértelmű pH_i növekedését okozott, amely azt mutatta, hogy a CFPAC-1 sejtek bazolaterális membránján van anion csere aktivitás. Amikor ugyanazt a kísérletet hajtottuk végre a SeV-CFTR transzdukált sejteken, a Cl^- elvonás okozta alkalizáció szignifikánsan kisebb volt. Az adatok azt mutatják, hogy CFTR-ral transzdukált CFPAC-1 sejtekben gátlódik a bazolaterális Cl^-/HCO_3^- cserélő és azt, hogy a cAMP-nek nincs hatása az anion cserélő aktivitására.

4.7.2. Apikális membrán

Miután a natív és SeV-LacZ CFPAC-1 sejteket az apikális oldal felől Cl^- mentes Cl^-/HCO_3^- oldattal perfundáltuk, cAMP jelenlétében és hiányában sem változott a pH_i . Ezzel ellentétben az alacsony vírus titerű SeV-CFTR (MOI=3) sejtek apikális felszínéről való Cl^- elvonás egyértelmű intracelluláris alkalizációt okozott. A vt CFTR expressziója tehát anioncserélő aktivitást indukál a CFPAC-1 sejtek apikális membránján. A SeV-CFTR (MOI = 3) sejtek

cAMP-vel való stimulációja növelte mind a pH_i alkalizáció gyorsaságát, mind a nagyságát Cl^- elvonást követően. A SeV-CFTR (MOI = 15) sejtekben a Cl^- elvonás a MOI = 3 sejtekhez képest szignifikánsan nagyobb alkalizációt okozott, mely nem volt fokozható cAMP stimulációt követően. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a CFTR-ral fertőzött MOI = 3 és MOI = 15 CFPAC-1 sejtek is rendelkeznek apikális Cl^-/HCO_3^- cserélő aktivitással ami csak MOI = 3 esetén volt stimulálható cAMP-vel. A cAMP-stimulált anion cserélő aktivitás a MOI = 3 SeV-CFTR sejtekben teljesen gátolható volt 500 μM H₂DIDS alkalmazásával. A cAMP stimulálta anioncserélő aktivitás elektrogenerálásának tesztelésére a SeV-CFTR (MOI = 3) sejteket bazolaterálisan K^+ mentes vagy magas K^+ tartalmú HCO_3^- oldattal perfundáltuk 10 perccel az apikális Cl^- elvonás előtt. Az apikális Cl^- elvonás bazolaterális K^+ hiányában nem okozott szignifikáns változást $J(B)$ ($1,48 \pm 0,22$ mM b/min) és ΔpH_i ($0,066 \pm 0,009$) a standard értékekhez ($J(B)$: $1,54 \pm 0,29$ mM b/min, ΔpH_i : $0,05 \pm 0,008$, $n = 7$) képest. Ráadásul, az apikális Cl^- elvonás a magas bazolaterális K^+ tartalmú HCO_3^-/CO_2 oldatban sem okozott változást a $J(B)$ értékében ($3,12 \pm 0,49$ mM b/min), viszont szignifikánsan növelte a ΔpH_i értékét ($0,12 \pm 0,01$) a kontrollhoz képest. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a cAMP stimulálta apikális Cl^-/HCO_3^- cserélő aktivitás elektroneutrális. A specifikus CFTR gátló CFTR_{inh}-172-nek nem volt hatása sem a pH_i alkalizáció gyorsaságára sem a nagyságára a SeV-CFTR (MOI = 3) CFPAC-1 sejteknél. A CFTR Cl^- transzportja valószínűleg nem szükséges az apikális Cl^-/HCO_3^- cserélő aktivitáshoz.

4.8. A CFTR expresszió hatása a PKA aktivitásra és expresszióra

A SeV-CFTR-ral transzdukált (MOI=15) sejtekben az apikális Cl^-/HCO_3^- cserélő állandó aktivitást mutatott, és nem hatott rá a cAMP, így felmerült, hogy a nagyobb vírus titernél károsodik a sejtek cAMP szignalizációs rendszere. Ezért meghatároztuk a PKA aktivitást és a 42 kDa molekulatömegű PKAcát mennyiségét a natív és a SeV-sal transzdukált CFPAC-1 sejtekben. A PKA aktivitás nem különbözött a natív, a SeV-LacZ és a SeV-CFTR (MOI=3) CFPAC-1 sejtekben. Körülbelül ugyanakkora PKA aktivitás volt megfigyelhető a SeV-LacZ (MOI=15) sejtekben. Ezzel ellentétben azonban a PKA aktivitás szinte detektálhatatlan volt a magasabb vírus titerrel transzdukált SeV-CFTR sejteknél. A PKAcát mennyisége minden sejtcsoportban körülbelül azonos volt. Az adatok szerint a CFTR hiperexpressziója SeV-CFTR MOI=15 sejtekben gátolja a PKA aktivitást, így ez magyarázhatja a cAMP stimuláció hiányát az apikális Cl^-/HCO_3^- cserélők esetében. Világosan látszik tehát, hogy a cAMP szignalizációs útvonal gátlása hátrány lenne génterápia esetén, és úgy tűnik, hogy a CFTR overexpresszióját a CF betegek pankreász duktusz sejtjeiben el kell kerülni.

4.9. A CFTR expresszió hatása az apikális Na^+/H^+ cserélő aktivitására

Az apikális NHE aktivitását kimutatták a fő hasnyálmirigy-vezetékben, ami szerepet játszhat HCO_3^- abszorpciójában a duktusz lumenből. A HCO_3^- szekréció valószínűleg egy védő mechanizmus, amely lugosítja a duktusz belső terét, ezáltal csökkenti a proenzimek aktiválását bekövetkező változásokat, amikor a szekréció alacsony az emésztés közti időszakok alatt. Rakonczay és munkatársai (2006) nemrég kimutatták, hogy a CFPAC-1 sejteknek is van apikális NHE aktivitása. SeV-LacZ (MOI=15) fertőzött CFPAC-1 sejtekben mind apikális, mind bazolaterális oldalon 20 mM-os NH_4Cl pulzus standard Na^+ mentes HEPES oldatot adva a sejtek intracelluláris pH_i szintjének 6,7 értékre csökkenését okozta. Ebben a Na^+ -hiányos állapotban a pH_i stabilizálódott ezen az értéken, amely azt mutatja, hogy nincs jelen Na^+ -független pH_i helyreállító-mechanizmus, mint amilyen pl. a H^+ pumpa. Az apikális Na^+ -visszaadás hatására az apikális NHE aktiválódásnak megfelelően emelkedett a pH_i . Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a SeV-LacZ sejteknél alkalmaztuk az NH_4Cl pulzust cAMP köztél jelenlétében. A Na^+ -visszaadás hatása a pH_i -ra és a $J(\text{B})$ -ra szignifikánsan nagyobb volt a SeV-CFTR sejtekben a SeV-LacZ-vel fertőzöttekhez képest. A SeV-CFTR sejtekben nem volt szignifikáns hatása a cAMP-nek a $J(\text{B})$ Na^+ -visszaadásra adott reakciójában. Ezek az adatok felvetik, hogy a CFPAC-1 sejtek apikális membránjában található NHE aktivitását a funkcionális CFTR fokozza, de a cAMP stimuláció nem befolyásolja.

4.10. A kenodezoxikólsav hatása a pH_i -ra

Az epesavas kísérletekhez SeV-LacZ vagy SeV-CFTR (MOI=3) transzdukált CFPAC-1 sejteket használtunk. A CDC (0,1 és 1 mM) standard HEPES oldatban dózis-függő módon csökkentette a pH_i -t a CFPAC-1 sejtekben. Mindkét dózis esetében a CDC apikális membrán felől történő alkalmazása nagyobb mértékű intracelluláris acidifikációt okozott, mint bazolaterálisan. Ráadásul az 1 mM CDC által kiváltott $-J_B$ a CFTR-ral transzdukált sejteknél szignifikánsan kisebb volt, mint a LacZ-vel transzdukált sejtek esetében. Ez azt jelzi, hogy a CFTR csökkenti az epesavak sejtebe való bejutásának mértékét.

4.11. A kenodezoxikólsav hatása az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra

A CDC alkalmazása dóziszfüggő emelkedést okozott az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban. 0,1 mM CDC lassú emelkedést váltott az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban, amely később lassan csökkent. Ezzel ellentétben az 1 mM CDC gyors $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést váltott ki, amelyet egy tartós plató fázis követett. A korábbi, tengerimalacon végzett kísérleteink eredményeivel összhangban azt találtuk, hogy a CDC az

apikális oldal felől szignifikánsan nagyobb Ca^{2+} szignált váltott ki, mint a bazolaterális membrán felől. A CDC egyidejű, kétoldali alkalmazása még nagyobb Ca^{2+} szignált váltott ki. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ adatok összefoglalása azt mutatja, hogy a CFTR expresszióknak nem volt hatása a CDC által kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ válaszra. Ezek szerint a CFTR expresszió nem vesz részt a CDC-indukálta Ca^{2+} -szignalizációban.

4.12. A CFTR expresszió szükséges a kenodezoxikólsav indukálta apikális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélő aktivitáshoz

Az apikális Cl^- elvonásnak a standard $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldatból a SeV-LacZ-vel fertőzött sejtek esetében nem volt hatása a pH_i -ra sem a 0,1 mM CDC jelenlétében sem annak hiányában. A SeV-CFTR-ral transzdukált sejtek esetében az apikális Cl^- elvonás pH_i -emelkedést váltott ki ($J_B = 0,61 \pm 0,07$ mM B/min, $\Delta\text{pH}_i = 0,018 \pm 0,003$; $n = 6$), mely szignifikánsan nagyobb volt 0,1 mM CDC jelenlétében ($J_B = 1,75 \pm 0,08$ mM B/min, $\Delta\text{pH}_i = 0,059 \pm 0,006$; $n = 6$).

4.13. A kenodezoxikólsav nem aktiválja a CFTR Cl^- áramát

Tengerimalac duktusz sejteken „whole cell patch clamp” kísérletekkel teszteltük, hogy az alacsony dózisu CDC-nek van-e hatása a CFTR Cl^- áramára. A perfúziós oldatban lévő 0,1 mM CDC-nek nem volt hatása a teljes sejt áramokra, viszont ugyanezekben a sejtekben jellegzetes CFTR áramot lehetett kiváltani (10-ből 7 sejt esetén) 5 μM forskolinnal. A magasabb CDC (0,5 mM) koncentráció a vizsgált sejtek nagyobb részénél (8-ből 5 sejt esetén) már membrán-instabilitást okozott.

5. Összefoglalás

A SeV egy hatásos CFTR gén beviteli vektor az emberi hasnyálmirigy vezeték sejtéknél. A SeV közvetítette CFTR génbevitel sokkal hatásosabb az apikális membrán felől, mint a bazolaterális membrán felől. A hatékony *in vivo* géntranszfer a hasnyálmirigybe valószínűleg a vírus retrográd fertőzését igényelné a pankreász duktuszokban. A CF-os betegek 62 %-a funkcióképtelen hasnyálmiriggyel születik, így az esetek többségében a génterápiát *in utero* kellene elvégezni. Így a génterápia leginkább a betegek kisebb csoportjának segíthetne, akik megfelelően működő pankreással születtek, de későbbi életükben lesz hasnyálmirigy elégtelenségük. Fontos, hogy a CFTR-ral fertőzött CF sejtek fenntartják a normális epiteliális integritást és az apikális

membránjuk Cl^- és HCO_3^- transzport folyamatait. A CFTR Cl^- csatorna szabályozza az SLC26, SLC4A2 (korábban AE2) és az NHE transzporterek aktivitását. Bemutattuk, hogy az apikális anion cserét a duktuszokban a PAT-1 mediálja. A PAT-1 aktivitása fokozható cAMP stimulációval, de az AE2-t és az apikális NHE transzportert nem befolyásolja a stimulált szekréció. A CDC adminisztrációja a pankréász duktusz sejteken dózis-függő pH_i csökkenést, és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést okozott. A kis dózisu CDC a CFTR Cl^- transzportjától függetlenül stimulálta az apikális $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélő aktivitást. Hipotézisünk szerint a CDC indukálta HCO_3^- szekréció kimossa a toxikus epesavat a duktális rendszerből és ez védőmechanizmusként szolgálhat az akut biliáris hasnyálmirigy-gyulladás ellen.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani azoknak az embereknek, akik segítettek nekem, a doktori tanulmány elkészítésében.

Köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Lonovics Jánosnak** és **Prof. Dr. Wittmann Tibornak**, az I. sz. Belgyógyászati Klinika volt és jelenlegi vezetőjének, akik biztosították kutatómunkámhoz a feltételeket.

Hálás köszönettel tartozom **Prof. Dr. Varró Andrásnak**, a Farmakológiai Intézet vezetőjének, aki biztosította számunkra a lehetőséget, hogy az intézetben dolgozhassak.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Takács Tamásnak**, aki lehetőséget biztosított, hogy csatlakozhassam tudományos kutatócsoportjához.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Ifj. Dr. Rakonczay Zoltánnak** és **Dr. Hegyi Péternek**, akik szakmai tanácsaikkal, biztatásukkal, építő jellegű kritikáikkal alapvetően hozzájárultak szakmai fejlődésemhez és sikeres munkámhoz.

Köszönetet szeretnék mondani **Prof. Barry E Argent-nek** és **Dr. Mike A Gray-nek**, a Newcastle-i Egyetem munkatársainak a diszkusszióikért és a kollaborációs munkában betöltött sokrétű szerepükért.

Szintén szeretnék köszönetet mondani a munkatársaimnak, **Pallagi Petrának**, **Venglovecz Viktóriának**, **Ózsvári Bélának**, **Farkas Klaudiának**, **Schnúr Andreának**, **Maléth Józsefnek**, **Czepán Mátyásnak**, és **Biczó Györgynek** a munkám során nyújtott segítségükért.

Külön megköszönöm **Fuksz Zoltánnénak**, **Magyarné Pálfi Editnek**, **Sitkei Ágnesnek**, **Árva Miklósnénak**, **Horesnyiné Tündinek** és **Enyinginé Etusnak** a kitűnő technikai asszisztenciájukat, ami nélkül ez az értekezés nem jöhetett volna létre.

Szeretném megköszönni társszerzőim segítségét.

7. Közlemények

Az értekezés alapját képező közlemények:

I.

Ignáth I, Hegyi P, Venglovecz V, Székely C, Carr G, Hasegawa M, Inoue M, Takács T, Argent BA, Gray MA, Rakonczay Z Jr. CFTR expression but not Cl⁻ transport is involved in the stimulatory effect of bile acids on apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity in human pancreatic duct cells. *Pancreas*, 2009, 38: 921-9.

IF: 2,708

II.

Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Hasegawa M, Inoue M, You J, Iida A, **Ignáth I**, Alton EW, Griesenbach U, Óvári G, Vág J, Da Paula AC, Crawford RM, Varga G, Amaral MD, Mehta A, Lonovics J, Argent BE, Gray MA. CFTR gene transfer to human cystic fibrosis pancreatic duct cells using a Sendai virus vector. *J Cell Physiol*, 2008, 214: 442-55.

IF: 4,313

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

Tóth-Molnár E, Venglovecz V, Ózsvári B, Rakonczay Z Jr, Varró A, Tóth A, Lonovics J, Takács T, **Ignáth I**, Iványi B, Hegyi P. A new experimental method to study the acid/base transporters and their regulation in lacrimal gland ductal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 3746-55.

IF: 3,528