

**„A cink szerepe az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  és cAMP szint szabályozásában légúti és  
intesztinális hámsejtekben” című OTKA (K79189) által támogatott kutatások  
zárójelentése**

*1. Az extracelluláris tér ionösszetételének szerepe a légúti hámsejtek  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisának szabályozásában:*

Cisztás fibrózisban (CF) a cAMP/PKA-dependens transzepiteliális anionszekréció károsodik, melynek oka a „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator” (CFTR) fehérjét kódoló génben bekövetkezett mutáció. A CF-ben alkalmazott terápiás módszerek egyike az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) emelésén keresztül a hámsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -függő Cl csatornáinak aktiválása. A purinerg P2Y receptorok G-fehérjéhez kapcsolt mechanizmussal, míg a P2X receptorok ioncsatorna-funkciójuk révén emelik a hámsejtek  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jét. Következésképpen, mindkét purinerg receptor típus fontos CF terápiás potenciállal bír. Kísérleteinkben az extracelluláris (EC) ionkörnyezet változásának hatásait vizsgáltuk a P2X purinerg receptor csatornákon keresztül történő ATP-indukálta  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásra légúti hámsejtekben. Vizsgálatainkban vad típusú (WT) és  $\Delta\text{F508}$  (dF) CFTR-t kódoló génnel stabilan transzfektált humán bronchiális hámsejteket (CFBE-41o) használtunk. Eredményeink azt mutatták, hogy ATP hatására mind a WT, mind a dF sejtekben  $\text{Ca}^{2+}$  jel jött létre, amely egy gyors és egy fenntartott komponensből állt. Az extracelluláris pH emelése 7.4-ről 7.9-re egyik sejttípusban sem változtatta meg a  $\text{Ca}^{2+}$  jel alakját. Az extracelluláris  $\text{Na}^+$  helyettesítése N-metil D-glukaminnal (NMDG) szignifikánsan növelte a  $\text{Ca}^{2+}$  jel mindkét fázisát. Extracelluláris  $\text{Na}^+$  jelenlétében a  $\text{Zn}^{2+}$  gátolta az ATP-indukálta fenntartott  $\text{Ca}^{2+}$  szignált, amely a P2X receptorok, vagy a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák gátlásán keresztül valósulhat meg. Kísérleteink az utóbbi mechanizmust igazolták, mivel az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak kiürítését követően a  $\text{Zn}^{2+}$  gátolta mind a  $\text{Ca}^{2+}$ , mind a  $\text{Ba}^{2+}$  beáramlást. Nátriummentes közegben a  $\text{Zn}^{2+}$  ATP-től függetlenül is fenntartott  $\text{Ca}^{2+}$  jelet hozott létre, melyet a purinerg receptor antagonista, suramin részlegesen gátolt, utalva a P2X receptorok jelenlétére. Immunhisztokémiai módszerekkel végzett vizsgálataink segítségével igazoltuk a P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> és P2X<sub>6</sub> izoformák jelenlétét. A  $\text{Zn}^{2+}$  indukálta  $\text{Ca}^{2+}$  jelet a PLC inhibitor U73122 szignifikánsan gátolta, mely egy G-fehérjéhez kapcsolt intracelluláris raktárból történő  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulásra utal. Az intracelluláris inozitol-triszfoszfát ( $\text{IP}_3$ ) puffereles szintén gátolta a  $\text{Zn}^{2+}$  indukálta intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást. Ez utóbbi megfigyelés szintén megerősítette a PLC és az  $\text{IP}_3$  részvételét e folyamatokban. A  $\text{Ni}^{2+}$  és a  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  hatásához hasonló  $\text{Ca}^{2+}$  választ indukált.

A fenti kísérletek arra utalnak, hogy a  $Zn^{2+}$  a működő CFTR jelenlététől függetlenül és az extracelluláris  $Na^+$  jelenlététől függően befolyásolja a CFBE41o<sup>-</sup> sejtekbe történő  $Ca^{2+}$  beáramlást. A különböző kétértékű fémionok által kiváltott  $Ca^{2+}$  szignál felveti egy divalens kation szenzitív G-fehérjéhez kapcsolt receptor jelenlétét is a légúti hámsejtek plazmamembránján. Eredményeink azt mutatják, hogy a légutakba juttatott aeroszol ionális összetétele alapvető fontossággal bírhat a tüdőbetegségek kezelésében.

A részletes eredményeket és megbeszélést lásd: *Hargitai D. és mtsai. Calcium entry is regulated by  $Zn^{2+}$  in relation to extracellular ionic environment in human airway epithelial cells. Respir. Physiol. Neurobiol. 2010;31:170(1):67-75.*

Tekintettel arra, hogy a  $Zn^{2+}$  indukálta  $Ca^{2+}$  válaszok nagymértékben függték az extracelluláris pH-tól és  $Na^+$  koncentrációtól, megvizsgáltuk ezek önálló hatásait is a sejtek kalcium homeosztázisára. Kísérleteinkhez CF-betegből izolált légúti hámsejtvonalat (IB3-1) használtunk. Eredményeink azt mutatják, hogy az extracelluláris médium alkalinizálása (pH: 8.2) önmagában nem képes az  $[Ca^{2+}]_i$  emelésére. Abban az esetben azonban, ha az alkalinizációval párhuzamosan lecsökkentettük az extracelluláris  $Na^+$  koncentrációt (természetesen az oldat ozmolaritásának állandó szinten tartása mellett) akkor szignifikáns  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést tapasztaltunk. Az így létrehozott intracelluláris  $Ca^{2+}$  szignál  $Cl^-$  csatornák aktiválását eredményezte. Ez az aktivitás fokozódás nifluminsav jelenlétében, valamint az intracelluláris  $Ca^{2+}$  EGTA-val történő megkötésével gátolhatónak bizonyult. Ezek az eredmények összességében a  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornák szerepére utalnak e folyamatban. Ezután megizsgáltuk az extracelluláris  $Zn^{2+}$  szerepét is mind az  $[Ca^{2+}]_i$ , mind  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornák szabályozásában. Meglepetésünkre azt találtuk, hogy miközben a  $Zn^{2+}$  fokozza az extracelluláris térből történő  $Ca^{2+}$  belépést, gátolja a  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornákat. Ezek a kísérleti eredmények arra utalnak, hogy az extracelluláris alkalinizáció a  $Na^+$  koncentráció függvényében képes olyan intracelluláris  $Ca^{2+}$  jelet indukálni, amely sikeresen növeli a  $Ca^{2+}$ -függő  $Cl^-$  csatornák aktivitását. Paradox módon azonban a  $Zn^{2+}$  hozzájárulhat a  $Ca^{2+}$  szignál erősítéséhez, de mindeközben gátolja a  $Cl^-$  szekréciót. Egy  $Na^+$ -szegény, alkalikus pH-jú (pH>7.8) aeroszol belelegeztetése kedvező hatással bírhat a CF betegek tüdőfunkciójának javítására. A légutakba juttatható  $Zn^{2+}$  koncentrációjának meghatározásához további kísérletek szükségesek.

A részletes eredményeket és megbeszélést lásd: *Dankó T. és mtsai. Extracellular alkalization stimulates calcium-activated chloride conductance in cystic fibrosis human airway epithelial cells. Cell. Physiol. Biochem. 2011;27:401-410.*

Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az ATP-függő P2X<sub>4</sub> receptor csatornákon keresztüli Ca<sup>2+</sup> beáramlás potenciális terápiás jelentőséggel bír CF-ben. A specifikus gátlószerek hiánya azonban jelentősen megnehezíti a P2X<sub>4</sub> csatornák vizsgálatát. A benzodiazepin-származék, 5-BDBD-t nemrégiben írták le, mint a P2X<sub>4</sub> csatornák hatékony gátlószereit. A P2X<sub>4</sub> receptor csatornák specifikus pozitív allosztérikus modulátora az ivermectin (IVM) jelentősen befolyásolja a receptorra ható gátlószerek hatékonyságát. Az 5-BDBD vonatkozásában ilyen adat nem áll rendelkezésre. Kísérleteinkhez a HEK-293 sejteket stabilan vagy tranziensen transzfektáltuk humán P2X<sub>4</sub> fehérjét kódoló cDNS-sel. Eredményeink azt mutatják, hogy a P2X<sub>4</sub> fehérjét expresszáló HEK-293 sejtekben az ATP befelé irányuló kation áramot indukált. Az ATP-indukálta áram jelentősen potencírozható volt IVM alkalmazásával, mely igazolta a működőképes P2X<sub>4</sub> fehérje jelenlétét. Az áram amplitúdóját az 5-BDBD koncentráció-függő módon csökkentette. Az ATP (0,5 μM) csak a P2X<sub>4</sub> fehérjét expresszáló sejtekben okozott fenntartott Ca<sup>2+</sup>-jelet. A Ca<sup>2+</sup>-jel fenntartottságát az IVM jelentősen fokozta, ugyanakkor a külső kalcium megvonása teljesen megszüntette. Mind az 5-BDBD, mind a TNP-ATP koncentráció-függő módon gátolták az ATP-indukálta Ca<sup>2+</sup> jel fenntartott részének amplitúdóját. Az 5-BDBD két különböző koncentrációjának alkalmazása jobbra tolta az ATP dózis-válasz görbét. Tekintettel arra, hogy az ATP indukálta maximális válasz nem változott, ezek az adatok arra utalnak, hogy az 5-BDBD kompetitív módon gátolja a P2X<sub>4</sub> receptor csatornákat. Az 5-BDBD az IVM és ATP együttes alkalmazásával stimulált sejtekben is megtartotta gátló hatását. Eredményeink arra utalnak, hogy az 5-BDBD kompetitív gátlószere a P2X<sub>4</sub> receptoroknak, és ezt a hatását IVM jelenlétében is megőrzi. Következésképpen, az 5-BDBD alkalmazása megkönnyíti a P2X<sub>4</sub> receptor csatorna funkcióinak feltérképezését.

A részletes eredményeket és megbeszélést lásd: *Balázs B. és mtsai. Investigation of the inhibitory effects of the benzodiazepine derivative, 5-BDBD on P2X<sub>4</sub> purinergic receptors by two complementary methods. Cell. Physiol. Biochem. 2013;32:11-24.*

## 2. A bélhámsejtekben expresszálódó TRPV6 csatorna fehérjék permeabilitásának és gátlásának vizsgálata:

A celluláris szenzorként ismert tranziens receptor potenciál (TRP) fehérjék jelentős hasonlóságot mutatnak a *Drosophila melanogaster* retinájában található fotoreceptorok TRP fehérjéivel. A TRP „szupercsalád” fehérjéi további alcsaládokba sorolhatók. A TRPV alcsalád a kapszaicin érzékeny vanilloid receptor-1-ről kapta a nevét. A TRPV6 egy Ca<sup>2+</sup> szelektív

ioncsatornaként működik főleg a duodenumban. Korábbi adatok már utaltak arra, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -on kívül más divalens kationok is képesek átjutni a TRPV6 csatornán. Kísérleteinkben hTRPV6 fehérjét kódoló cDNS-sel transzfektáltunk a HEK293 sejteket. Eredményeink azt mutatják, hogy mind a  $\text{Zn}^{2+}$ , mind a  $\text{Cd}^{2+}$  átjut a TRPV6 csatornán. Tekintettel arra, hogy a TRPV6 csatornák konstitutívan nyitva vannak, a hTRPV6 fehérjét expresszáló HEK293 sejtekben magasabb  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t találtunk, mint a kontroll sejtekben. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációkban megfigyelhető különbség eltűnik, amennyiben a kontroll és a TRPV6 fehérjét expresszáló sejteket nominálisan  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes oldatban inkubáljuk. Érdekes megfigyelés volt, hogy a  $\text{Zn}^{2+}$  kettős hatással bír; miközben átjut a TRPV6 csatornán modulálják annak  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitását. Alacsony mikromoláris koncentrációban a  $\text{Zn}^{2+}$  növelte, míg alacsony milimoláris koncentrációban gátolta a TRPV6 csatornákat. Ezek a kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a TRPV6 fehérjék nem csak a  $\text{Ca}^{2+}$  transzportban játszanak szerepet, hanem más divalens fémionok is felszívódhatnak e csatornákon keresztül. A  $\text{Zn}^{2+}$  fontos szabályozó szerepet tölthet be a TRPV6 fehérjék szabályozásában.

A részletes eredményeket és megbeszélést lásd: *Kovacs G. és mtsai. Heavy metal cations permeate the TRPV6 epithelial cation channel. Cell Calcium. 2011 Jan;49(1):43-55.*

Korábban felvetették, hogy a TRPV6 csatornák részt vesznek az ún. „store operated”  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna (SOC) funkcióban, melynek során az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  raktárak ürülése  $\text{Ca}^{2+}$  belépést indukál az extracelluláris térből. Célunk tehát az volt, hogy megvizsgáljuk SOC gátlószerként ismert 2-APB hatását a TRPV6 csatornák aktivitására. Kísérleteinkhez a HEK293 sejteket humán TRPV6 fehérjét kódoló cDNS-sel tranziensen vagy stabilan transzfektáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a TRPV6 fehérjét expresszáló HEK-293 sejtekben mind a  $\text{Ca}^{2+}$ , mind a  $\text{Cd}^{2+}$  belépés fokozódott a kontroll sejtekhez képest. A 2-APB hatékonyan gátolta a  $\text{Ca}^{2+}$  belépést. Ez a gátló hatás azonban csak extracelluláris  $\text{Na}^+$  jelenlétében jött létre. Az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció változtatása minimális hatással volt a 2-APB által kifejtett gátlásra. Úgy véljük, hogy a 2-APB eredményesen használható a TRPV6 csatornák gátlására és alapul szolgálhat egy még hatékonyabb és csatorna-specifikus gátlószer kifejlesztéséhez.

A részletes eredményeket és megbeszélést lásd: *Kovacs G. és mtsai. Inhibition of the human epithelial calcium channel TRPV6 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). Cell Calcium. 2012 Dec;52(6):468-480.*

Az OTKA irodától olyan tájékoztatást kaptam, hogy technikai okokból kifolyólag nem lehet törölni a közleményjegyzékből a korábban már bevitt publikációkat. Következésképpen, ezúton szeretném jelezni, hogy az alábbi közlemények a kutatás előrehaladtával megjelentek eredeti szakközlemények formájában:

1. Balázs B., Dankó T., Zsembery Á.: Zn<sup>2+</sup>-induced changes in membrane permeability in human airway epithelial cells, *Acta Physiologica Hungarica*, Volume 97 (4);425, 2010
2. Király M., Farkas K., Hegyi P., Zsembery Á.: Az epitheliális nátrium csatornák (ENaC) expressziójának funkcionális vizsgálata kontroll, valamint gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek bélhámsejtjein, 51. Magyar Gasztroenterológiai Nagygyűlés, Tihany, 2009