

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Általános Orvostudományi Kar
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

**Az Orai1 csatorna gátlásának hatásai krónikus hasnyálmirigy-
gyulladásban**

Ph.D. Tézis

Szabó Viktória

Témavezetők:

Dr. Maléth József

Dr. Pallagi Petra



Szeged
2023

Publikációk listája

A tézishez kapcsolódó publikációk:

- I. **Viktória Szabó**, Noémi Csákány-Papp, Marietta Görög, Tamara Madácsy, Árpád Varga, Aletta Kiss, Bálint Tél, Boldizsár Jójárt, Tim Crul, Krisztina Dudás, Mária Bagyánszki, Nikolett Bódi, Ferhan Ayaydin, Shyam Jee, László Tiszlavicz, Kenneth Stauderman, Sudarshan Hebbar, Petra Pallagi, József Maléth; Orai1 calcium channel inhibition prevents progression of chronic pancreatitis. **THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION INSIGHT** (2023) D1 IF: **9.484**

A tézishez nem kapcsolódó publikációk:

- I. Bálint Tél, Noémi Papp, Árpád Varga, Viktória Szabó, Marietta Görög, Petra Susánszki, Tim Crul, Aletta Kis, Ingrid H Sendstad, Mária Bagyánszki, Nikolett Bódi, Péter Hegyi, József Maléth, Petra Pallagi; Thiopurines impair the apical plasma membrane expression of CFTR in pancreatic ductal cells via RAC1 inhibition. **CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES** (2023) D1 **9.234**
- II. Tamara Madácsy, Árpád Varga, Noémi Papp, Bálint Tél, Petra Pallagi, Viktória Szabó, Aletta Kiss, Júlia Fanczal, Zoltán Rakonczay Jr., László Tiszlavicz, Zsolt Rázga, Meike Hohwieler, Alexander Kleger, Mike Gray, Péter Hegyi, József Maléth; Impaired regulation of PMCA activity by defective CFTR expression promotes epithelial cell damage in alcoholic pancreatitis and hepatitis. **CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES** (2023) D1 IF: **9.234**
- III. Árpád Varga, Tamara Madácsy, Marietta Görög, Aletta Kiss, Petra Susánszki, Viktória Szabó, Boldizsár Jójárt, Krisztina Dudás, Gyula Farkas, Edit Szederkényi, György Lázár, Attila Farkas, Ferhan Ayaydin, Petra Pallagi, József Maléth; Human pancreatic ductal organoids with controlled polarity provide a novel ex vivo tool to study epithelial cell physiology. **CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES** (2023) D1 IF: **9.234**
- IV. Petra Pallagi, Marietta Görög*, Noémi Papp, Tamara Madácsy, Árpád Varga, Tim Crul, Viktória Szabó, Melinda Molnár, Krisztina Dudás, Anna Grassalkovich, Edit Szederkényi, György Lázár, Viktória Venglovecz, Péter Hegyi, József Maléth; Bile

- acid- and ethanol-mediated activation of Orail damages pancreatic ductal secretion in acute pancreatitis. **THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY** (2022) D1 **IF: 6.228**
- V. Surya Henry, Viktória Szabó, Enikő Sutus, Melinda K. Purity; RYBP is important for cardiac progenitor cell development and sarcomere formation. **PLOS ONE** (2020) Q1 **IF: 3.240**
- VI. Gergő Kovács, Viktória Szabó, Melinda K. Purity; Absence of Rybp compromises neural differentiation of embryonic stem cells. **STEM CELLS INTERNATIONAL** (2016) Q2 **IF: 3.540**
- VII. Olga Ujhelly, Viktória Szabó, Gergő Kovács, Flóra Vajda, Szilvia Mallok, János Prorok, Károly Acsai, Zoltán Hegedűs, Stefan Krebs, András Dinnyés, Melinda K. Purity; Lack of Rybp in Mouse Embryonic Stem Cells Impairs Cardiac Differentiation. **STEM CELLS AND DEVELOPMENT** (2015) Q2 **IF: 3.777**

Publikációk száma összesen: 8 (1 első szerzős)

Kumulatív IF: 53.971

Bevezetés

A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás (CP) progresszív gyulladással járó állapot, amelyet a hasnyálmirigy funkcionális és strukturális károsodása egyaránt jellemez. A CP-ben szenvedők felszívódási zavarokkal, hasnyálmirigy-gyulladás utáni cukorbetegséggel, súlyos fájdalommal és az életminőség jelentős romlásával szembesülnek. Az akut hasnyálmirigy-gyulladásban (AP) szenvedő betegek körülbelül 20-30%-ánál fordul elő kiújulás, és körülbelül 10%-uknál alakul ki CP. Ez a diagnózist követő 20-25 éven belül 50%-os halálozási arányt jelent a fertőzések, alultápláltság és a visszatérő hasnyálmirigygyulladás (RAP) szövődései miatt. A CP a hasnyálmirigy legveszélyesebb kockázati tényezője is, amely 13,3-szorosára növeli a kockázatot, és az idiopátiás és örökletes CP-ben szenvedők esetében az élethosszig tartó kockázat körülbelül 50%-os. A CP előrehaladott stádiumában a hasnyálmirigy szövetkárosodása visszafordíthatatlan, ami lehetetlenné teszi a hasnyálmirigy funkcióinak farmakológiai helyreállítását. A jelenlegi klinikai megközelítések sebészeti, endoszkópos beavatkozásokra, hasnyálmirigy enzimpótlásra, fájdalomcsillapításra és táplálkozási támogatásra támaszkodnak, az FDA által jóváhagyott CP-terápiák hiányában. A betegség progressziójának modellje szerint a RAP-ot kiváltó sentinel AP események korai CP-hez vezetnek, amely kialakult és végstádiumú CP-vé fejlődik. Míg a hasnyálmirigy elváltozásai a RAP és a korai CP esetén megszűnhetnek, előrehaladott stádiumban maradandóvá válnak. Így a RAP vagy a korai CP idején történő beavatkozás potenciálisan megakadályozhatja a progressziót, és kielégítetlen szükségleteket kezelhet.

A CP patogenezisében genetikai és környezeti tényezők bonyolult kölcsönhatása játszik szerepet, amelyek károsítják az acináris és duktális sejteket, aktiválják a hasnyálmirigy sztellát sejtjeit (PSC) és az immunsejteket. E sejtek közös patogén eseményeinek azonosítása a potenciális gyógyszer-célpontok szempontjából kulcsfontosságú. Ilyen például az intracelluláris Ca^{2+} jelátvitel, amely az eukarióta sejtek, köztük a hasnyálmirigy sejtjeinek univerzális útvonala. A tartós Ca^{2+} -emelkedés az akut és krónikus gyulladással járó betegségek, például a hasnyálmirigy-gyulladás egyik jellemzője. Ez magában foglalja a Ca^{2+} agonista által stimulált felszabadulását az endoplazmatikus retikulum (ER) raktáraiból, ami aktiválja az STIM1-et és elősegíti az extracelluláris Ca^{2+} beáramlást a plazmamembrán Ca^{2+} csatornákon, mint az Orai és a TRPC. Ezt a folyamatot, a raktár-függő kalcium beáramlást (SOCE) az ER-fehérjék (pl. SARAF) és Orai1 szabályozzák. A szelektív Orai1-gátlás ígéretesnek bizonyult a Ca^{2+} -túlterhelés csökkentésében és a hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságának mérséklésében. Az Orai1 potenciális előnyei azonban a RAP vagy a korai CP esetében még nem vizsgáltak.

Továbbá nem világos, hogy az Orai1 által közvetített extracelluláris Ca^{2+} beáramlás szelektív megszakítása megakadályozhatja-e a funkcionális károsodást és a fibrózist CP-ben. E tanulmány célja a SOCE szerepének átfogó vizsgálata a RAP és a korai CP patogenezisében, az Orai1 gátlásának a betegség progressziójára gyakorolt hatásának értékelése, különböző exokrin hasnyálmirigy-sejttípusokra összpontosítva.

Módszerek

Emberi minták

A humán hasnyálmirigy-szövetmintákat (kontroll és CP betegekből) a Szegedi Tudományegyetem Pathologiai Intézetében gyűjtött, formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintákból nyertük. A CP diagnózisát a klinikai anamnézis és a szövettani leletek alapján állították fel. A kontroll hasnyálmirigymintákat olyan cadaver szervdonoroktól nyertük, akiknek nem volt dokumentált hasnyálmirigybetegségük.

Állatok

Kísérleteinkben 8-12 hetes, 20-25 g tömegű FVB/N egereket használtunk. Az egereket állandó 22-24°C-os szobahőmérsékleten, 12 órás fény-sötét ciklusban tartottuk, és szabad hozzáférést biztosítottunk az ételhez és italhoz. A nemek aránya 1:1 volt. VRF1(P) standard rágcsálótápot és standard almot használtunk. A kezeléseket a fényciklus alatt végeztük.

A visszatérő akut és krónikus hasnyálmirigy-gyulladás indukciója és értékelése

A RAP-ot és CP-t ismétlődő intraperitoneális (i.p.) cerulein-injekciókkal idézték elő. Az egerek minden harmadik napon 3 vagy 5 sorozatban 8 óránként 8 fizioiógias sóoldatot (p.s., kontrollcsoport) vagy 50 µg/bwkg cerulein injekciót kaptak. A CM5480 szelektív Orai1-gátlót (i.p.; 20 mg/testsúlykilogramm; a CalciMedica biztosította) vagy hordozót naponta adtuk be az utolsó 5 egymást követő napon (3 RAP-epizód után). 24 órával az utolsó cerulein-injekciók után az egereket elaltattuk, és az *in vivo* hasnyálmirigy folyadékszekréciót a korábban leírtak szerint mértük. A CP súlyosságát a hasnyálmirigy tömeg/testtömeg arányának meghatározásával, szövettani paraméterekkel és biokémiai vizsgálatokkal értékeltük.

Duktusz fragmentumok, acináris és sztellát sejtek izolálása egér hasnyálmirigyből

Végső érzéstelenítés után a hasnyálmirigyet eltávolítottuk és kollagenázzal feltártuk, majd sztereomikroszkóp alatt izoláltuk az intra/interlobuláris csatornákat. A hasnyálmirigy acináris és sztellát sejtek izolálásához a hasnyálmirigyet enzimatikusan emésztettük, 1-3 mm³-es darabokra daráltuk, és rázó vízfürdőbe helyeztük 37°C-on 20 percre (acináris) vagy 45 percre (PSC) a korábban *Fanczal és mtsai.* és *Meng és mtsai.* által leírtak szerint, módosításokkal. Az

acináris sejteket összegyűjtöttük, és kiegészített Media 199-ben reszuszpendáltuk, majd 4 órán belül felhasználtuk. A PSC-k centrifugálása és szűrése után a pelletet tápoldatban vettük fel és sejttenyésztő edényekbe tettük. A tápoldatot kétnaponta cseréltük. A PSC-kultúrákat egy hétig tartottuk fenn a későbbi elemzésig.

Az intracelluláris Ca^{2+} , Cl^- és pH mérése fluoreszcens mikroszkópiával

Az izolált sejtek intracelluláris Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) és Cl^- ($[Cl^-]_i$) koncentrációját, illetve intracelluláris pH-ját (pH_i) a korábban leírtak szerint mikrofluorometriával értékeltük Fura-2-AM (2 μ mol/l), MQAE (2 μ mol/l), illetve BCECF-AM (1 μ mol/l) fluoreszcens festékekkel.

Immunhisztokémiai és immunfluoreszcens jelölés

A szövettani vagy IHC vizsgálatához a hasnyálmirigyeket formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk és 4 μ m vastagságú metszeteket vágunk. Az IHC-hez specifikus antitesteket használtunk. Az immunfluoreszcencia festéshez a teljes mintákat kriosekcionáltuk, vagy a fedőlemezre növesztett PSC-eket fixáltuk és egy éjszakán át primer antitestekkel, majd 2 órán át másodlagos antitestekkel jelöltük.

Génexpressziós elemzés

A humán FFPE és egér hasnyálmirigy mintákból származó mRNS-t NucleoSpin totalRNA FFPE XS kit vagy NucleoSpin[®] RNA Plus kit segítségével izoláltuk. A PSC-ekből származó mRNS-t NucleoZOL segítségével izoláltuk a gyártó utasításai alapján. 1 μ g mRNS-t reverz transzkripcióval írtunk át, és 50 ng cDNS-t használtunk a LightCycler[®] 96 rendszerben végzett qRT-PCR-hez. A transzkriptumok szintjének fold változását a küszöbértékek *Psmb6*-ra, *GAPDH*-ra és *Rpl13a*-ra történő normalizálásával számoltuk ki.

Western blot analízis

A hasnyálmirigy-szöveteket RIPA lízispufferben szonikáltuk, majd a fehérjekoncentrációt BCA-próbával határoztuk meg. Mintánként 20 μ g fehérjét töltöttünk a gélre, majd PVDF-membránra vittük át. A fehérjéket anti-TMEM66 (SARAF) és anti-béta-aktin, majd anti-rabbit-HRP-vel történő hibridizációval mutattuk ki, és Clarity Western ECL szubsztráttal hívtuk elő, mielőtt a ChemiDoc képalkotó rendszeren vizualizáltuk.

Oil Red O festés, *in vitro* proliferációs, migrációs és sejthalál mérések

A PSC-eket fedőlemezre növesztettük és Oil Red O oldattal festettük. A sejtsűrűséget Crystal Violet festéssel határoztuk meg. Alternatív megoldásként a Crystal Violet festéket visszaoldottuk, és az optikai sűrűséget CLARIOstar[®] Plus plate reader-rel mértük. A sejtciklus fázisarányának elemzéséhez a PSC-eket bromodeoxiuridinnal (BrdU) inkubáltuk 1 órán keresztül, anti-BrdU antitesttel és DAPI-val jelöltük, majd áramlási citometriás elemzést végeztünk. Az élő/apoptotikus/necrotikus sejtek arányát Apoptosis/Necrosis Assay Kit

segítségével határoztuk meg CLARIOstar® Plus plate reader-ben. A scratch assay-hez a PSC-
ket 1 hétig konfluenciáig növesztettük, majd a monolayer megkarcolásával sejtmentes régiót
hoztunk létre, és figyeltük a sejtváándorlást 0, 10 és 20 óra elteltével.

Statisztikák

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism szoftverrel végeztük. Minden adatot átlag \pm SEM-
ben fejeztünk ki. A Shapiro-Wilk-féle normalitásvizsgálatot alkalmaztuk. Az adatok
eloszlásának normalitása alapján mind parametrikus (Unpaired t-teszt vagy egyirányú
varianciaanalízis Tukey többszörös összehasonlítás tesztjével), mind nem parametrikus (Mann-
Whitney-teszt és Kruskal-Wallis-teszt) tesztek alkalmaztunk. A 0,05 alatti P-értéket
statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

Etikai engedélyek

Az állatok felhasználása során az NIH szabályait és az EU 2010/63/EU irányelvét követtük. Az
Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács megadta a XXI./1541/2020 számú vizsgálati
engedélyt. A humán minták, köztük a cadaver donor hasnyálmirigy-minták gyűjtését és
felhasználását az EU szabványok betartásával végeztük 37/2017-SZTE.

Eredmények

A SARAF expressziója károsodott CP-ben, ami hozzájárul a hasnyálmirigy acináris sejtekbe történő túlzott extracelluláris Ca^{2+} bejutáshoz

A SARAF mennyisége csökkent AP-ben, míg a STIM1 és az Orail változatlan maradt, ami
arra utal, hogy a SARAF a SOCE más komponenseihez képest érzékenyebb lehet a patológiás
ingerekre. A CP-betegekből származó szövetmintákban az IHC a SARAF mennyiségének
jelentős csökkenését mutatta ki a hasnyálmirigy acináris sejtjeiben a kontroll hasnyálmirigyhez
képest. Továbbá a *SARAF* mRNS-expressziója is csökkent a CP-szövetmintákban. A további
vizsgálatokhoz RAP-ot indukáltunk egerekben ismétlődő cerulein injekciókkal, hogy kiváltsuk
a korai és a kései CP kialakulását. Ebben a modellben az IHC kimutatta, hogy a SARAF
mennyisége a hasnyálmirigy acinus sejtjeiben szignifikánsan alacsonyabb volt a cerulein
kezelt egerekben a kontrollhoz képest, míg a *Saraf* mRNS-expressziója nem változott
jelentősen a cerulein kezelés hatására. A SARAF szubcelluláris eloszlása a hasnyálmirigy
acináris sejtekben retikuláris intracelluláris expressziós mintázatot mutatott, feltehetően az ER-
ben, míg az Orail főként a kontroll hasnyálmirigy acináris sejtek bazolaterális membránjában
lokalizálódott. Az immunfluoreszcens festés megerősítette továbbá, hogy a cerulein
kezelt egerekben a hasnyálmirigy SARAF mennyisége jelentősen csökkent, míg az Orail
mennyisége

nem mutatott kimutatható változásokat. Figyelemre méltó, hogy az Orai1 jelen volt a periacináris PSC-kben is. A kontroll és a ceruleinnel kezelt egereket a CP indukció utolsó öt napján CM5480-nal kezeltük, majd a hasnyálmirigy acinusokat izoláltuk. Annak felmérésére, hogy a SARAF csökkent jelenléte van-e hatással az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázisra, SOCE-t vizsgáltunk kontroll és ceruleinnel kezelt egerek izolált acináris klasztereiben. A SOCE-t 5 mM extracelluláris Ca^{2+} újbóli hozzáadásával aktiváltuk, miután az ER Ca^{2+} raktárait 25 μ M ciklopiazonsavval (CPA) kimerítettük Ca^{2+} -mentes oldatban. Ilyen körülmények között a SOCE szignifikánsan magasabb volt a CP csoportban. Ezzel szemben, amikor az egereket 20 mg/bwkg CM5480-nal kezeltük, a SOCE szignifikánsan csökkent a kontroll és a ceruleinnel kezelt állatokban is. Ezen adatok alapján arra következtetünk, hogy a SARAF expressziója jelentősen csökken a hasnyálmirigy acináris sejtjeiben CP során, ami az Orai1 zavart szabályozása révén túlzott extracelluláris Ca^{2+} beáramláshoz vezethet. Továbbá, a megnövekedett Orai1-mediált Ca^{2+} bejutás megelőzhető Orai1 gátlással.

Az Orai1 gátlása csökkenti a CP súlyosságát egerekben

Az Orai1 funkciójának a SARAF fehérje károsodott expressziója miatti fokozódása hozzájárulhat a sejtkárosodáshoz a korai CP-ben; ezért feltételeztük, hogy az Orai1 gátlása csökkenti a CP súlyosságát. Három epizód RAP (3x8 cerulein injekció) a korai CP egyértelmű jeleit eredményezte, beleértve az acináris sejtek atrófiáját, a fibrózist és az acináris-duktális metaplázia jelenlétét, míg 5x8 cerulein-injekciót követően a szövettan a kialakult CP-nek felelt meg, súlyos atrófiával és fibrózissal. Ezt a Crossmon trikrómfestés is megerősítette, amely szintén kimutatta, hogy a 3x8 cerulein csökkentette a parenchima százalékos arányát és mérsékelten növelte a szöveti fibrózist. Ezenkívül a hasnyálmirigy tömeg/testtömeg aránya is csökkent a 3x8 cerulein kezelés hatására. Ezek a paraméterek jelentősen romlottak az 5x8 cerulein injekcióval kezelt egereknél, amit ezen állatok súlyvesztése kísért, ami a krónikus gyulladás progressziójára utal. Fontos, hogy a CM5480 *in vivo* beadása jelentősen javította az összes paramétert. A 3x8 cerulein injekciót (korai CP) és az 5x8 cerulein injekciót+CM5480-at kapó egerek között nem mutatkozott szignifikáns különbség, ami arra utal, hogy az Orai1 gátlása hatékonyan megakadályozza a korai CP kései CP-vé történő progresszióját. A fibrózis mértékét a hasnyálmirigy hidroxiprolin (HyP) koncentrációjának mérésével is meghatároztuk, amely a kollagén egyik fő összetevője. A szövettani paraméterekkel összehangban az 5x8 cerulein injekció jelentősen megnövelte a hasnyálmirigy HyP-koncentrációját, amelyet a CM5480 csökkentett. Ezután azt kívántuk felmérni, hogy az Orai1 gátlása helyreállítja-e a CP-ben megfigyelt károsodott SARAF fehérje expressziót. Eredményeink azt mutatták, hogy a

CM5480-nal végzett *in vivo* kezelés helyreállította a SARAF fehérje expresszióját a ceruleinnel kezelt egerek hasnyálmirigy acinus sejtjeiben, míg a *Saraf* mRNS expressziójára nem volt releváns hatása. Ezzel szemben az *Orai1* génexpressziója jelentősen emelkedett a CP-ben, amit a CM5480 kezelés csökkentett. Az emelkedett *Orai1* génexpresszió nem fordult át emelkedett fehérjeexpresszióba, ami arra utal, hogy ezt más mechanizmusok kompenzálhatják. A SARAF megváltozott intracelluláris lokalizációját figyeltük meg, amely az *Orai1* gátlásakor a retikuláris lokalizációs mintázatról az acináris sejtek apikális részébe transzlokálódott. Ez az ER-nek az acinussejtek apikális pólusa felé történő újraelosztásával magyarázható. Ennél is fontosabb, hogy a kimutatható SARAF mennyisége az *Orai1* gátlásakor jelentősen megnőtt a ceruleinnel kezelt egerekben. Ezeket a megfigyeléseket Western blot analízis is alátámasztotta, amely megerősítette, hogy a SARAF hasnyálmirigy-expresszióját a cerulein kezelés figyelemre méltóan károsítja, míg a CM5480 adása részben helyreállította. Belső kontrollként a béta-aktint használtuk. Korábban leírták, hogy a gyulladással megnövekedett száma a béta-aktin fehérje emelkedett expresszióját eredményezi, ami ebben az esetben is kimutatható volt. Így az *Orai1* CM5480-nal történő gátlása helyreállítja a SARAF károsított expresszióját a hasnyálmirigy acinus sejtjeiben, és jelentős mértékben csökkentette a CP súlyosságát a betegség progressziójának mérséklésével vagy akár megszüntetésével.

Az *Orai1* gátlása visszaszorítja a szöveti gyulladást CP-ben

A krónikus gyulladás a CP jellemzője, amely maradandó szöveti károsodáshoz és a hasnyálmirigy funkcióinak elvesztéséhez vezet; ezért megvizsgáltuk az *Orai1* gátlás hatását a pro-inflammatorikus citokin expresszióra és az immunsejtek infiltrációjára a hasnyálmirigyben. A várakozásoknak megfelelően a pro-inflammatorikus citokinek - tumor necrosis factor alpha (*Tnfa*), interleukin-1 β (*Il1b*) - és transforming growth factor β 1 (*Tgfb1*) mRNS-szintje jelentősen emelkedett a ceruleinnel kezelt egerekben, és jelentősen csökkent a CM5480 adásával a CP csoportban. Figyelemre méltó, hogy az *Orai1* gátlása a kontroll állatokban is csökkentette az *Il1b* és a *Tgfb1* expresszióját, ami az *Orai1* immunrendszerben betöltött szerepével magyarázható. Az immunsejt-infiltráció megfejtéséhez a CP során a CD3-pozitív citotoxikus és helper T-sejtek; CD8-pozitív citotoxikus T-sejtek; CD19-pozitív B-limfociták; F4/80-pozitív makrofágok és myeloperoxidáz-pozitív (MPO) neutrofil granulociták százalékos arányát határoztuk meg és normalizáltuk az összes sejt számához egy látómezőben. Az mRNS-expressziós eredményekhez hasonlóan a CP-ben a hasnyálmirigy immunsejt-infiltrációjának jelentős emelkedését észleltük, amelyet az *Orai1* gátlása jelentősen csökkentett, míg a CM5480-nak nem volt jelentős hatása a kontroll állatokban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az

Orai1 gátlása csökkenti a pro-inflammatorikus immunsejtek infiltrációját és a citokinek expresszióját, ezáltal enyhítve a CP-ben zajló gyulladásos folyamatokat.

A CM5480 jelentősen javítja a csökkent acináris és dukális sejtfunkciókat a CP-ben

Ezután azt kívántuk tisztázni, hogy a károsodott gyulladás és szöveti fibrózis elegendő-e a létfontosságú exokrin hasnyálmirigy-funkciók, például az acináris sejtek enzimermelésének vagy a dukális ion- és folyadékszekréciónak a fenntartásához. IHC és enzimaktivitás mérések kimutatták, hogy a szöveti alfa-amiláz és elasztáz aktivitás jelentősen csökkent a ceruleinnel kezelt egerekben, amit az Orai1 gátlása jelentősen javított a CP állatokban, de nem befolyásolta a kontrollokban. Ez azt jelzi, hogy a CP-ben a funkcionális acinusok száma erősen csökkent, de a CM5480 kezelés hatására jelentősen javult. Emellett a szekretin által stimulált *in vivo* dukális folyadékszekréciót jelentősen rontotta a cerulein kezelés. Ezzel szemben ez a ceruleinnel és CM5480-nal kezelt egerekben teljesen visszaállt a kontroll szintre. A dukális HCO_3^- szekréció méréséhez minden egyes kísérleti csoportba tartozó egerekből hasnyálmirigy duktus fragmentumokat izoláltunk, és az intracelluláris lúgosítást 20 mM NH_4Cl beadásával váltottuk ki $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ pufferelt extracelluláris oldatban. Ilyen körülmények között az Orai1 gátlása a kontrollcsoportban nem volt hatással a HCO_3^- extrúzióra, míg a cerulein kezelés jelentősen csökkentette a dukális HCO_3^- szekréciót, amit a CM5480 kezeléssel sikerült megakadályozni. A CFTR helytelen lokalizációja és károsodott működése a hasnyálmirigy duktus sejteiben a CP ismert jellemzői; ezért megvizsgáltuk az Orai1 gátlásának hatását ezekre a jellemzőkre is. Az intracelluláris Cl^- szintet MQAE-vel vizsgáltuk, amely a CFTR által közvetített Cl^- extrúziót tükrözi. Az extracelluláris Cl^- eltávolítása megnövelte a fluoreszcencia intenzitását, amelyet a cerulein jelentősen csökkentett. Az *in vivo* CM5480 kezelés jelentősen javította a cerulein által kiváltott csökkenést, ami a CFTR funkció helyreállítására utal. Az immunlokalizáció kimutatta, hogy a kontroll csatornáknak a CFTR és az Occludin (amelyet apikális membrán- és barrier-integritás-markerként használtak) az apikális felszínre lokalizálódott; a ceruleinnel kezelt egerekben azonban a CFTR transzlokációja volt megfigyelhető a duktus epitelsejtek citoplazmájába. Fontos, hogy az Orai1 gátlása képes volt helyreállítani a CFTR apikális plazmamembrán lokalizációját. Végül a *Cftr* mRNS-expressziójának elemzése statisztikailag mérhető csökkenést mutatott a cerulein és a cerulein+CM5480 kezelt csoportokban, de ezek valószínűleg nem biológiailag értelmezhető változások. Összefoglalva, adataink azt mutatták, hogy az Orai1 gátlása megakadályozhatja a hasnyálmirigy acináris és dukális sejteinek károsodását, és helyreállítja a fiziológiailag alapvető exokrin hasnyálmirigy funkciókat.

A CM5480 gátolja a sztellát sejtek aktiválódását

Annak megértése érdekében, hogy az *Orai1* gátlása hogyan csökkenti a hasnyálmirigy fibrózisát CP-ben, megvizsgáltuk a CM5480 hatását a PSC-kre. Az alfa simaizomaktin (α -SMA) és a vimentin (VIM) PSC-markerekkel végzett immunfluoreszcens festés viszonylag alacsony szintet mutatott a kontroll hasnyálmirigyben, amit a cerulein adagolása jelentősen megemelt, és a kétszeresen pozitív sejtek (aktivált PSC-k) egyértelműen periacináris lokalizációt mutattak. Az *Orai1* gátlása jelentősen csökkentette az α -SMA és a VIM relatív intenzitását, ami az aktivált PSC-k csökkenésére utal. Másrészt az *Acta2* (a α -SMA-t kódoló gén) mRNS-expresszióját, amely a ceruleinnel kezelt csoportban emelkedett volt, a CM5480 nem csökkentette. A α -SMA fehérje expressziójának csökkenését az *Orai1* gátlásával IHC is megerősítette. Ezenkívül a gliál fibrillar acid protein (GFAP), egy panPSC-marker (megfesti a nyugalmi és az aktivált PSC-eket) immunfestése kimutatta, hogy a kontrollcsoportokban a PSC-k viszonylag alacsony százalékban voltak jelen, de a cerulein kezelést követően megnövekedtek, ugyanakkor a GFAP növekedését az *Orai1* gátlása nem akadályozta meg. Ezzel szemben a GFAP és a α -SMA-pozitív PSC-k aránya azt jelezte, hogy az aktivált PSC-k dominánsan jelen voltak a CP-ben, és a CM5480 jelentősen csökkentette számukat. A PSC-kről ismert, hogy *in vitro* kultúrában gyorsan aktiválódnak (48 órán belül), amit az *Orai1* gátlás aktivációs folyamatra gyakorolt hatásának vizsgálatára használtunk fel. Ezért a PSC-eket kontroll egerekből izoláltuk, és egy hétig *in vitro* tartottuk. A PSC-eket 1 héten keresztül minden második napon 10 μ M CM5480 vagy vivőanyaggal kezeltük, és immunfestést végeztünk VIM, GFAP, α -SMA és *Orai1* tekintetében. A VIM és a GFAP relatív intenzitása alacsonyabb, míg az α -SMA intenzitása magasabb volt a kontrollcsoportban, ami a PSC-k aktiválódását jelzi a kontrollmintában. Ezzel szemben a CM5480 kezelés növelte a VIM és a GFAP expresszióját, de csökkentette az α -SMA expresszióját, ami a PSC aktiváció gátlására utal. Továbbá, az Oil Red O festés kimutatta, hogy a kontroll tenyészetben a PSC-ken belül a lipidcseppek viszonylag ritkák voltak a myofibroblaszt-szerű sejtekben, míg a CM5480 kezelés jelentősen növelte a kerek alakú lipidcseppeket tartalmazó nyugvó PSC-k arányát. A génexpressziós elemzés nem mutatott változást az *Orai1*, *Saraf* és *Tgfb1* mRNS szintjében, míg az *Acta2* és a Fibronectin-1 (*Fnl*) expressziója, amelyek az aktivált PSC-k markerei, jelentősen csökkent az *Orai1* gátlásakor. Figyelemre méltó, hogy a kontrollkultúrában az aktivált myofibroblaszt-szerű PSC-k spontán *Orai1* punkta képződést mutattak (a sejtek $8,51 \pm 1,373\%$ -a), ami az *Orai1* aktiváció jól leírt jellemzője, ami extracelluláris Ca^{2+} beáramlással járt együtt. Ilyen sejteket nem észleltünk a CM5480-nal kezelt tenyészetekben. Ezenkívül az *Orai1* intenzitása szignifikánsan

magasabb volt a kontrollban, mint a CM5480-kezelt sejtekben. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az Orai1 gátlása megakadályozta a nyugalmi állapotú PSC-k aktiválttá alakulását, ami magyarázatot adhat a CP-ben a fibrózis csökkent progressziójára.

Az Orai1 gátlása csökkenti az aktivált PSC-k proliferációját és károsítja a migrációt

A PSC-k aktiválása nagymértékben növeli a proliferációjukat és a migrációjukat. Az Orai1 gátlás ezen paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálatára egér hasnyálmirigy-szövetet immunfestettünk a mitotikus markerre (foszfo-Hisztón H3 (Ser10) (pHH3)). Míg a pHH3-pozitív sejtek a kontrollcsoportokban csak szórványosan voltak kimutathatók, addig a cerulein kezelés jelentősen megnövelte a proliferáló sejtek számát az acináris klasztereken belül (intra-acináris) és az inter- vagy periacináris térben. Különösen a cerulein+CM5480 kezelt csoportban szignifikánsan több proliferáló sejtet figyeltünk meg az inter-acináris területeken. Mivel a pHH3 apoptotikus sejteket is jelöl, a cerulein+vivő és a cerulein+CM5480 hasnyálmirigy-szöveteket pHH3 és hasított-PARP (az apoptózis markere) antitesttel festettük. A ceruleinnel kezelt mintákban nem voltak kétszeresen pozitív sejtek, de a CM5480-kezelt csoport inter-/periacináris területén jelen voltak (35,25±0,83%) a pHH3 egyszeresen pozitív sejtek mellett. A további elemzéshez PSC-ket izoláltunk és *in vitro* tenyésztettünk. Először a kultúrában lévő PSC-k számát Crystal Violet festéssel vizsgáltuk, amely a képelemzés és a kolorimetriás mérés alapján is szignifikánsan alacsonyabb sejtszámot mutatott a CM5480-nal kezelt mintákban. *In vitro* pHH3 festést végeztünk annak megállapítására, hogy a csökkent sejtszám a fokozott apoptózisnak vagy a csökkent proliferációnak köszönhető-e, de nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a CM5480-kezelt kultúrák között. Hasonlóképpen nem figyeltünk meg különbséget a proliferációs marker *Ki-67* és a nukleoszóma egyik központi összetevőjének, a H3 clustered histone 4 (*H3c4*) génexpressziójában sem. Ezután áramlási citometriával számszerűsítettük a BrdU-pozitív (az újonnan szintetizált DNS-t jelölő) sejtek százalékos arányát, ami azt mutatta, hogy az S-fázisban lévő sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a CM5480-nal kezelt mintában a kontrollhoz képest. Ezzel a növekedéssel párhuzamosan a G1 és G2/M fázisban lévő sejtek átlagos számának csökkenését is megfigyeltük a kezelt kultúrákban. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az S-G2/M átmenetet lelassította vagy blokkolta az Orai1 gátlása, ami a SOCE fontosságára utal ebben a sejtciklus-fázisban a PSC-kben. Az Orai1 gátolt mintában az alacsonyabb sejtszám másik valószínűsíthető magyarázata a sejthalál megnövekedett aránya lehet. Ezt támasztja alá a PARP-pozitív PSC-k megnövekedett száma *in vivo*, ami a fokozott apoptózisra utal. Ennek tesztelésére meghatároztuk a késői apoptózis/necrosis és az élő sejtek arányát, ami az élő sejtek mérsékelt

csökkenését és az apoptotikus sejtek növekedését mutatta a CM5480-nal kezelt csoportban; azonban a különbség nem biológiailag releváns. A késői apoptotikus jelző *Casp3* génexpressziója mérsékelten alacsonyabb volt a CM5480-nal kezelt sejt kultúrákban, míg a PARP-festés nem mutatott különbséget. Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy a CM5480-nal kezelt mintákban az alacsonyabb sejtszámot a károsodott proliferáció és nem a fokozott sejthalál okozta. Végül a PSC-k migrációját hasonlítottuk össze a „sebgyógyulás” meghatározásával 0, 10 és 20 óra elteltével. A képek azt mutatták, hogy az Orai1 gátlása jelentősen csökkentette a PSC-k migrációjának sebességét, mivel a „sebzáródás” százalékos aránya szignifikánsan alacsonyabb volt 10 és 20 óra elteltével. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az Orai1 gátlása jelentősen rontja a PSC-k S-G2/M átmenetét, sejtproliferációját és migrációját.

Diszkusszió

Tanulmányunkban *in vitro* és *in vivo* kísérletek kombinációjával vizsgáltuk az Orai1 gátlásának szerepét a korai krónikus pancreatitis (CP) progressziójának megelőzésében. A CP egy legyengítő betegség, amelyet hasnyálmirigy-szöveti károsodás, gyulladás, fibrózis és károsodott exokrin funkciók jellemeznek. Vizsgálatunk az intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozásáért felelős Orai1 fehérjét érintő molekuláris mechanizmusokra összpontosított. A Ca^{2+} jelátvitel diszregulációja szerepet játszik az AP és CP patogenezisében. Először a SARAF fehérje károsodott expresszióját azonosítottuk CP-s betegek hasnyálmirigy acinus sejtjeiben. A SARAF expressziójának csökkenése a sejtekbe történő túlzott extracelluláris Ca^{2+} bejutással járt együtt. Orai1 inhibitor alkalmaztunk, amely hatékonyan mérsékelte ezt a túlzott Ca^{2+} -beáramlást, helyreállította a SARAF expresszióját, és megállította a korai CP progresszióját. Az Orai1 gátlásának pozitív hatásai közé tartozott a csökkent szövetkárosodás, a csökkent fibrózis, az alacsonyabb gyulladással járó sejtinfiltráció, az emésztőenzimek acinus sejtek általi termelésének megőrzése és a duktusz szekréciós funkciójának fenntartása. Következésképpen a tanulmány azt sugallja, hogy az Orai1 gátlása ígéretes célzott terápia az irreverzibilis, végstádiumú CP kialakulásának megelőzésére.

Megvizsgáltuk az Orai1 gátlásának hatását az exokrin hasnyálmirigy különböző sejt típusaira is. A gyulladással járó sejtek, különösen a mononukleáris sejtek, mint például a makrofágok, kritikus szerepet játszanak a CP kialakulásában és progressziójában. Az Orai1 központi szerepet játszik a T-limfociták aktiválásában, és a vizsgálat kimutatta, hogy az Orai1 gátlása csökkentette a CP patogenezisében szerepet játszó kulcsfontosságú citokinek expresszióját. Az Orai1 gátlása

csökkentette az immunsejtek infiltrációját a hasnyálmirigy-szövetbe, ami tovább erősíti potenciális terápiás szerepét. Az Orai1 gátlásának hatása kiterjedt a hasnyálmirigy acináris és duktális sejtjeire is. CP-ben e sejtek diszfunkciója az emésztőenzimek és a bikarbonátban gazdag folyadék szekréciójának károsodásához vezet. Megállapítottuk, hogy az Orai1 gátlása lehetővé tette a hasnyálmirigy acináris sejtek számára, hogy továbbra is enzimeket termeljenek, megakadályozta a duktális sejtek működésének károsodását, és helyreállította a folyadékszékrció szabályozásáért felelős kulcsfontosságú kloridcsatorna (CFTR) megfelelő sejtszintű lokalizációját.

A hasnyálmirigy PSC-k szerepét is vizsgáltuk a fibrózis kialakulásában. CP-ben a PSC-k nyugalmi állapotból aktivált, fibrózist elősegítő állapotba kerülnek. Vizsgálatunk kimutatta, hogy az Orai1 gátlása megakadályozta a PSC aktiválódását, csökkentette a fibrózist elősegítő PSC-k proliferációját és migrációját, és hozzájárult a fibrózis csökkenéséhez. Kiemelendő, hogy eredményeink relevánsak a CP patogenezisének több javasolt mechanizmusa szempontjából, továbbá, hogy az Orai1 gátlása olyan tényezőkkel foglalkozik, mint a szövetkárosodás, a gyulladás, az oxidatív stressz és a duktusz diszfunkció, amelyek mind hozzájárulnak a CP kialakulásához. Az ígéretes eredmények ellenére vannak még nyitott kérdések; tovább vizsgálendő, hogy az egérmodell mennyire alkalmas az emberi CP modellezésére, és az is, hogy lehetséges-e a CP indukcióját követő esetleges szövetregeneráció. Továbbá a kutatásunk rávilágított az Orai1 gátlásának az immunfunkciókra gyakorolt lehetséges hatására, különösen hosszú távú alkalmazás esetén.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy az Orai1 blokkolása hatékonyan megakadályozhatja a korai CP progresszióját és, hogy az Orai1 gátlása széleskörű hatást gyakorol a CP patogenezisében szerepet játszó különböző sejtfolymatokra, ami ígéretes terápiás stratégiává teszi a további folytatásra. Úgy véljük, érdemes további kutatásokat szorgalmazni az Orai1 gátlásának előnyeivel kapcsolatban a RAP-ban és korai CP-ben szenvedő betegeknél.

Az új megfigyelések összefoglalása

- Az Orai1 gátlása mérsékli a Ca^{2+} beáramlást és helyreállítja a SARAF expresszióját.
- Az Orai1 gátlása a szövetkárosodás csökkenésével jár együtt (kevesebb ödéma és fibrózis, megnövekedett parenchima mennyiség).
- A CM5480 alkalmazása szignifikánsan csökkentette a gyulladásos sejtek infiltrációját és a gyulladásos marker gének expresszióját.

- Az Orai1 gátlása segített megőrizni az acinusok funkcióját, így az acinus enzimtermelését, amit a szöveti amiláz és az elasztáz megnövekedett aktivitása bizonyított.
- A CM5480 fenntartotta a ductusz szekréciós funkciót, növelte a HCO_3^- és Cl^- szekréciót és helyreállította a CFTR fehérje apikális lokalizációját.
- Az Orai1 gátlása megakadályozta a PSC-k aktiválódását, proliferációját és migrációját, amelyek részt vesznek a túlzott ECM-fehérje-szekrécióban és a fibrózisban - ez az Orai1 gátlásának lehetséges szerepére utal a CP-ben kialakuló fibrózis kontrolljában.
- Kimutattuk, hogy az Orai1 gátlása a CP háttérében álló számos kulcsfontosságú mechanizmust képes megcélolni, kiemelve az Orai1-gátlókban rejlő lehetőségeket, mint a betegség átfogó kezelési lehetőségét.

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom mentoraimnak, Dr. Maléth Józsefnek és Dr. Pallagi Petrának a kutatásom során nyújtott rendületlen támogatásukért és útmutatásukért, témavezetésük felbecsülhetetlen értékű volt e doktori értekezés elkészítésében. Szeretném köszönetemet kifejezni Spengler Gabriellának, Ferhan Ayaydinnak, Bagyánszki Máriának és Tiszlavicz Lászlónak tudományos támogatásukért. Szeretnék köszönetet mondani kollégáimnak, Varga Árpádnak, Csákány-Papp Noéminek, Görög Mariettának, Madácsy Tamarának, Kiss Alettának, Molnár Tündének, Tél Bálintnak, Tim Crulnak, Susánszki Petrának és Csicsely Stefániának a sok segítségért, bátorításért és az együtt töltött szép időkért. Ez a munka nem valósulhatott volna meg Dudás Krisztina, Molnár Melinda, Laub Hajnalka és Sáriné Konczos Zsuzsanna segítségével és munkája nélkül. Köszönettel tartozom egész szeretett családomnak a támogatásért és a türelemért; különösen édesanyámnak, Bátorfi Katalinnak, pótapámnak, Mészáros Bertalannak, egyedülálló és utánozhatatlan testvéremnek, Bede Gábornak - mindig megkérdezték, hogy mikor doktorálok már végre, felvidítottak és motiváltak. Nem tudom eléggé megköszönni barátomnak és kollégámnak, Jójárt Boldizsárnak, hogy otthon és a laborban is végig hallgatta a kételyeimet, őszintén és szeretettel adta a legjobb tanácsokat. Köszönöm barátom családjának Edinek, Csabinak, Julcsinak, Zsófinak, Dávidnak és Fülöpnek, hogy mindig türelmesek és támogatók voltak. Örökké hálás leszek barátaimnak, Kittinek és Tamásnak, Annának és Bencének, Áronnak, Zsoltnak, Szilárdnak és Zsófinak, Marcsinak és Lórinak, akikre mindig számíthattam és ösztönöztek. Külön köszönetet szeretnék mondani Enikőnek és Adélnak, akikkel együtt kezdtük a doktori tanulmányokat, és bár útjaink néha kis időre el is váltak, mindig ott voltunk egymás mellett. Végül köszönöm az egereknek, akik életüket adták azért, hogy talán egyszer a beteg emberek egy újabb esélyt kaphassanak a gyógyulásra.