

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Kísérletes és Megelőző Orvostudományi Doktori Iskola

Az SPCA2 szerepe a raktárfüggetlen STIM1-ORAI1 aktivációban és a CFTR szabályozásában a szekréciós epitél sejtekben

Ph.D. Tézis

Kiss Aletta Kata

Témavezető:
Dr. Maléth József



Szeged
2025

1. A TÉZIS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

- I. Store-independent activation of STIM1-ORAI1 by SPCA2 determines the basal CFTR activity in secretory epithelial cells
Aletta Kata Kiss*, Árpád Varga*, Marietta Görög, Tamara Madácsy, Woo Young Chung, Petra Pallagi, Viktória Szabó, Petra Susánszki, Enikő Kúthy-Sutus, Dániel Varga, Péter Bíró, Ingrid Hegnes Sendstad, Tim Crul, Boldizsár Jójárt, Bálint Tél, Zsófia Horváth, Szintia Barnai, Anita Balázs, György Lázár, Miklós Erdélyi, Shmuel Muallem, József Maléth
Current Biology 35: 20 pp. 4970-4987.e7., 25 p. (2025); MTMT ID: 36356148
IF: 7.5 (D1)
- II. Human Pancreas-Derived Organoids with Controlled Polarity: Detailed Protocols and Experimental Timeline
Aletta Kiss, Attila Farkas, Ferhan Ayaydin, György Lázár, Árpád Varga, József Maléth
Current Protocols 4: 11 Paper: e70045, 25 p. (2024); MTMT ID: 35609714
IF: 2.2 (D1)

2. A TÉZIS ALAPJÁT NEM KÉPEZŐ TOVÁBBI PUBLIKÁCIÓK

- I. Impaired regulation of PMCA activity by defective CFTR expression promotes epithelial cell damage in alcoholic pancreatitis and hepatitis
Madácsy Tamara, Varga Árpád, Papp Noémi, Tél Bálint, Pallagi Petra, Szabó Viktória, **Kiss Aletta**, Fanczal Júlia, Rakonczay Zoltan, Tiszlavicz László, Rázga Zsolt, Hohwieler Meike, Kleger Alexander, Gray Mike, Hegyi Péter, Maléth József
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES (D1)
IF: 9.207
- II. Thiopurines impair the apical plasma membrane expression of CFTR in pancreatic ductal cells via RAC1 inhibition
Tél Bálint, Papp Noémi, Varga Árpád, Szabó Viktória, Görög Marietta, Susánszki Petra, Crul Tim, **Kiss Aletta**, Sendstad Ingrid H, Bagyánszki Mária, Bódi Nikolett, Hegyi Péter, Maléth József, Pallagi Petra
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES (D1)
IF: 9.234
- III. Orail calcium channel inhibition prevents progression of chronic pancreatitis
Szabó Viktória, Csákány-Papp Noémi, Görög Marietta, Madacsy Tamara, Varga Árpád, **Kiss Aletta**, Tél Bálint, Jójárt Boldizsár, Crul Tim, Dudás Krisztina, Bagyánszki Mária, Bódi Nikolett, Ayaydin Ferhan, Jee Shyam, Tiszlavicz László, Stauderman Kenneth A., Hebbar Sudarshan, Pallagi Petra, Maléth József
JCI Insight (D1)
IF: 9.484
- IV. Human pancreatic ductal organoids with controlled polarity provide a novel ex vivo tool to study epithelial cell physiology
Árpád Varga, Tamara Madácsy, Marietta Görög, **Aletta Kiss**, Petra Susánszki, Viktória Szabó, Boldizsár Jójárt, Krisztina Dudás, Gyula Jr. Farkas, Edit Szederkényi, György Lázár, Attila Farkas, Ferhan Ayaydin, Petra Pallagi, József Maléth
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES (D1)
IF: 9.234

Összes publikáció száma: 6 (ebből 2 db elsőszerezős)

Összesített IF: 46.859

3. BEVEZETÉS

3.1. Epiteliális ion- és folyadékszekréció

A szekréciós epitél sejtek számos szerv – többek között a tüdő, a hasnyálmirigy, a máj, a nyál- és verejtékmirigyek – lumenét borítják. Elsődleges feladatuk az ionok – főként a klorid (Cl^-) és a bikarbonát (HCO_3^-) – vektoriális transzportja a lumen felé, mely vízáramlással társul. Ez a folyamat biztosítja a nyálkahártyák megfelelő hidratációját, az emésztőenzimek működését, a hőszabályozásban szereplő verejtékképzést, és fenntartja a szekretált folyadékok ionösszetételét. Az epitheliális szekréció zavara számos betegség kialakulásában központi szerepet játszik, mint például a cisztás fibrózis (CF), a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás, az autoimmun eredetű exokrin mirigybetegségek (pl. Sjögren-szindróma), illetve különböző szekréciós eredetű hasmenéses kórképek. Az epitheliális transzport károsodása jól szemlélteti, hogy a szekréciós epitél sejtek megfelelő, alapszintű működése elengedhetetlen az emberi szervezet homeosztázisának fenntartásához.

3.2. A CFTR központi szerepe az epitheliális iontranszportban

Az epitheliális transzportfolyamatok során fontos szerepe van a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) Cl^- csatornának. A CFTR egy $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ csatorna, amely főként az apikális membránon helyezkedik el, és az ionok lumen felé irányuló áramlását eredményezi. Ez a folyamat a paracelluláris útvonalakon keresztül Na^+ -áramlást indukál és ozmotikus vízmozgást vált ki, így hozva létre a folyadék-szekréciót. A CFTR működése kulcsfontosságú a szekréciók viszkozitásának és pH-jának fenntartásában. A CFTR gén funkcióvesztéssel mutációi cisztás fibrózishoz vezetnek, amelyet a légutakban és a gasztrointesztinális traktusban dehidratált, savas nyák, a hasnyálmirigyben pedig a fő kivetetőcső elzáródása, valamint NaCl-ban gazdag verejték jellemez. Mindez rámutat a CFTR-mediált iontranszport kulcsfontosságú jelentőségére.

3.3. A CFTR molekuláris szabályozása

A CFTR két membránt áthidaló doménből (MSD1/2), két citoszolikus nukleotid-kötő doménből (NBD1/2), valamint a két egységet összekapcsoló szabályozó (R) doménből áll. A csatorna nyitási-záródási mechanizmusát alapvetően az R domén szabályozza, defoszforilált állapotban gátolja az NBD-dimerizációját, így a pórusnyitást is. A klasszikus CFTR-aktiváció a cAMP/protein-kináz A (PKA) útvonalon keresztül valósul meg. G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) aktivációja fokozza az adenil-ciklázok (AC) működését, amely cAMP-szint

emelkedéshez és így PKA-aktivációhoz vezet. A PKA több szerin oldalláncot foszforilál az R doménben, ezzel feloldva annak autoinhibíciót, lehetővé téve az NBD-k dimerizációját és a csatorna kinyílását. A foszforiláció-dependens szabályozáson túl a PKA közvetlen kötődéssel, foszforilációtól független módon is képes CFTR-aktivációt kiváltani, ami reverzibilis, finoman hangolható kontrollt biztosít. A CFTR működése szoros összefüggésben áll térbeli szerveződésével is, makromolekuláris komplexekbe rendeződik, amelyekben A-kináz horgonyfehérjék (AKAP-ok) és az Na^+/H^+ cserélő regulátor faktor 1 (NHERF1) kulcsfontosságú scaffoldként funkcionálnak az apikális membránon. Ezek a fehérjék PKA-t, foszfatázokat, foszfodiészterázokat (PDE-eket) és a citoszkeleton elemeit kapcsolják a CFTR-hoz, ezáltal lokális és időben precíz szabályozást tesznek lehetővé. A csatorna inaktivációja GPCR-deszenzitizáción, defoszforiláción és a PDE4 által közvetített lokális cAMP hidrolízisen keresztül valósul meg.

3.4. A Ca^{2+} jelátvitel szerepe a CFTR szabályozásában

Habár a CFTR elsődleges szabályozása a cAMP/PKA útvonalon keresztül történik, a kalcium (Ca^{2+}) jelátvitel fontos kiegészítő szerepet tölt be. A Ca^{2+} több mechanizmuson keresztül a kalmodulin kötődése révén modulálja a CFTR-t, Ca^{2+} /kalmodulin-függő kináz II (CaMKII) és tirozin-kinázok foszforilációs hatása által. A Ca^{2+} -függő szabályozás gyakran az adenil-ciklázokon (AC) keresztül érvényesül, bizonyos AC izoformák (pl. AC1, AC3, AC8) Ca^{2+} /kalmodulin által aktiválódnak, míg mások (pl. AC5, AC6) Ca^{2+} által gátoltak. Az AC izoformák sejten belüli elhelyezkedése lokális cAMP mikrodoméneket hoz létre, amelyek finoman szabályozott módon reagálnak a helyi Ca^{2+} -jelre. A különböző AC- CFTR-szabályozásban betöltött pontos szerepe azonban sejtípus-specifikus és még nem teljesen feltárt. A Ca^{2+} jelátvitel kulcsfontosságú a HCO_3^- -szekréció szabályozásában is, különösen a hasnyálmirigy duktális epitél sejtjeiben, ahol a CFTR mind Cl^- , mind HCO_3^- transzportot mediál, és így meghatározó az alkalikus pankréásznedv fenntartásában. A folyamat szabályozásában a CFTR, az SLC26 család $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélői, valamint a WNK1/SPAK kináz-útvonal Ca^{2+} -függő kölcsönhatásai vesznek részt.

3.5. Raktárfüggő és raktárfüggetlen Ca^{2+} beáramlás az epitél sejtekben

Nem ingerelhető sejtekben – így az epitél sejtekben is – a raktárvezérelt Ca^{2+} belépés (SOCE) a Ca^{2+} -beáramlás egyik fő útvonala. A SOCE-t az endoplazmatikus retikulum (ER) Ca^{2+} -szintjét érzékelő STIM-fehérjék és a plazmamembránban található ORAI-csatornák, különösen az ORAI1 közvetítik. Az ER Ca^{2+} -raktárainak kiürülésekor a STIM1 oligomerizálódik, ER-PM kontaktzónákba transzlokálódik, és ott aktiválja az ORAI1-csatornákat, ami Ca^{2+} -beáramlást,

az ER-raktárak feltöltését és Ca^{2+} -függő jelátviteli folyamatokat indít. A tüdő epitél sejteiben a SOCE hozzájárul a gyulladásos mediátorok termeléséhez és a mucin szekrécióhoz. Egyre több adat utal ugyanakkor arra, hogy az ORAI1 raktárfüggetlen Ca^{2+} -belépést (store-independent calcium entry, SICE) is képes közvetíteni. A SICE egyik kulcsregulátora a szekréciós útvonal Ca^{2+} -ATPáz 2 (SPCA2). Bizonyos sejtípusokban az SPCA2 a plazmamembránhoz jut, és C-terminális doménje révén közvetlenül kapcsolódik az ORAI1-hez, olyan Ca^{2+} -beáramlást generálva, amely független a STIM-fehérjétől, az ER-raktárak kiürülésétől és magának az SPCA2 pumpafunkciójának aktivitásától. SPCA2-mediált SICE-t írtak le emlő epitél sejtekben és emlődaganat-sejtvonalakban, ahol a fokozott Ca^{2+} -igény fedezésén túl a RAS–ERK jelátviteli út aktiválásához is hozzájárul. Annak ellenére, hogy az ORAI1-mediált Ca^{2+} -belépés szerepe számos sejtípusban ismert, és a Ca^{2+} CFTR-szabályozásban betöltött funkciója jól leírt, az ORAI1 CFTR-aktivitásra gyakorolt közvetlen hatását epiteliális sejtekben eddig nem vizsgálták. A CFTR és Ca^{2+} -érzékeny AC-ok apikális ko-lokalizációja, illetve a SICE mechanizmusok újabb leírásai alapján azonban valószínűsíthető, hogy az ORAI1 fontos szerepet tölt be a CFTR-működést meghatározó lokális Ca^{2+} mikrodomének kialakításában.

3.6. Organoid modellek az epitél sejtek fiziológiájának vizsgálatában

A szövet-specifikus őssejtekből származó háromdimenziós organoid kultúrák a natív epitélium felépítésének és működésének számos kulcselemét képesek visszaadni. A hasnyálmirigy-, tüdő-, máj- és bél-organoidok megőrzik az apikális-bazális polaritást, a szoros kapcsolatok (tight junctionok) struktúráját és a szövetre jellemző differenciációs mintázatot. CFTR-kutatás szempontjából különösen fontos a csatorna apikális lokalizációjának és a natív fehérje–fehérje interakcióinak megőrzése. Az extracelluláris mátrixba (pl. Matrigelbe) ágyazott és WNT/R-spondin/Noggin-t tartalmazó médiumban fenntartott organoidok hosszú távon passzálhatók, miközben duktális markereket (CFTR, KRT19, OCLN, SOX9) expresszálnak, és olyan morfológiai jellemzőket mutatnak, mint a natív duktuszok (apikális mitokondriális dúsulás, kefeszegély). Az organoidok fiziológiásan releváns platformot biztosítanak a CFTR-szabályozás és az epiteliális iontranszport vizsgálatához, lehetővé téve funkcionális méréseket (pl. organoid-hízás, élősejtes Ca^{2+} -képződés, Cl^- szekréció) olyan környezetben, ahol a szabályozó fehérjék endogén szerkezete és a nanodomén szerveződése megmarad.

4. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célul tűztük ki a STIM1–ORAI1 raktárfüggetlen aktivációjának és az SPCA2 szerepének jellemzése, valamint e jelátviteli nanodomén fiziológiai jelentőségének vizsgálatát több szövet – hasnyálmirigy, tüdő, máj – polarizált epitél sejtjeiben.

2. Továbbá célunk volt annak meghatározása, hogy az SPCA2-függő Ca^{2+} -belépés hogyan szabályozza a bazális CFTR-aktivitást Ca^{2+} -érzékeny AC-okon és lokális cAMP-jelátvitelen keresztül.

3. Valamint a humán organoid kultúrák standardizálását kísérletes modellként az epiteliális ion- és folyadékszekréció vizsgálatára primer, polarizált epitél sejtekben.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Adherens sejt kultúrák és állatok

A HeLa és HEK293 sejt vonalakat a gyártó protokollja szerint tenyésztettük, és tranziens transzfekciókhoz, illetve funkcionális mérésekhez használtuk. Az organoid kultúrákhoz szükséges kondicionált médium előállítására L-WRN (ATCC-CRL-3276) sejt vonalat alkalmaztunk. A hasnyálmirigy duktális fragmentumok izolálásához, a folyadékszekréciós mérésekhez és az organoid kultúrák létrehozásához 8–12 hetes, 20–25 gramm testtömegű FVB/N egereket használtunk.

5.2. Duktális fragmentumok és acinus sejtek izolálása egér hasnyálmirigy szövetből

A hasnyálmirigy duktális fragmentumok izolálását korábban leírt módszerek szerint végeztük (Maléth et al., 2015; Fanczal et al., 2020). Röviden, a hasnyálmirigy sebészi eltávolítását követően enzimemesztést alkalmaztunk, majd sztereomikroszkóp alatt izoláltuk a kisebb duktuszokat. Az acinus sejtek izolálása során a szövet mechanikus aprítását követően kíméletes enzimemesztéssel és centrifugálási lépésekkel végeztük.

5.3. Egér és humán organoid kultúrák

Első lépésben az egér hasnyálmirigy, máj és tüdő, valamint a humán hasnyálmirigy szövetek enzimatisz emésztését végeztük 37°C-on, vertikális rázóban. A centrifugálási és mosási lépések után a sejteket Wash médiumban szuszpendáltuk, Matrigellel kevertük, majd 10 µl-es „dómk” formájában 24 lyukú sejttenyésztő lemezben tettük. A 37°C-on történő polimerizációt követően Feeding médiumot adtunk a sejtekhez, amelyet minden második napon cseréltünk. Passzáláshoz a dómkat összegyűjtöttük, TrypLE™ Express enzimmel emésztettük, mostuk,

majd friss Matrigelben újra kiraktuk. A polaritásváltott, úgynevezett apical-out humán hasnyálmirigy organoidok előállításához a Matrigelt eltávolítottuk enzimes emésztéssel és az organoidokat legalább 48 órára szuszpenziós kultúrába helyeztük, ami lehetővé tette a polaritásváltást.

5.4. Konstrukciók, transzekciók, irányított mutagenézis és géncsendesítés

Az ORAI1, STIM1, SPCA2 és különböző AC-ok expressziós konstrukcióit kollaborációs partnerektől, illetve kereskedelmi gyártóktól (ORIGENE, Addgene) szereztük be. A tranziens transzekciókat Lipofectamine 2000 segítségével végeztük. Az irányított mutagenézishez Q5 termotabil DNS-polimerázt alkalmaztunk. A géncsendesítést (pl. siAtp2c1, siAtp2c2, siSEPT7, siOrai1, siStim1, siAC-ok) egér hasnyálmirigy duktális fragmentumokban és humán organoidokban validált siRNS-ek segítségével, Lipofectamine 2000-rel végeztük. Mivel több fehérje heterológ túltermeltetése gyakran felborítja az endogén fehérjeszerkezetet, a főbb kísérleteket primer sejtekben, endogén fehérjeszint mellett is megismételtük.

5.5. Génexpresszió analízis

A teljes mRNS-t egér hasnyálmirigy duktális fragmentumokból NucleoSpin RNA XS kittel izoláltuk a gyártói protokoll szerint. A koncentrációt NanoDrop™ One/OneC spektrofotométerrel mértük, majd 1 µg mRNS-ből cDNS-t szintetizáltunk. A géncsendesítéseket követő génexpresszió-változásokat qRT-PCR-rel mértük, az adatfeldolgozás a $\Delta\Delta C_q$ módszerrel történt.

5.6. Egér hasnyálmirigy organoidok transzkriptomikai analízise RNS-szekvenálással

Az organoidokból a Matrigel eltávolítása után összegyűjtött sejtpelletből izoláltunk RNS-t, majd Illumina NextSeq 500 platformon végeztünk RNS szekvenálást. A génexpressziót TPM (transzkript per millió) értékekkel jellemeztük, a TPM<1 értéket nem-expresszált génként definiáltuk. A humán CFTR gén TPM-értékeit a laborunkban korábban publikált adatokból vettük át.

5.7. Immunfluoreszcens jelölés és konfokális mikroszkópia

Az organoidokat és a duktális fragmentumokból készített metszeteket 4%-os PFA–PBS oldattal fixáltuk, majd mosás és antigén-feltárás után BSA-t tartalmazó oldatban blokkoltuk. Ezt követően elsődleges és fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagokkal jelöltük meg a

célfehérjéket (pl. ORAI1, CFTR, SPCA2, STIM1, ductalis markerek). A képeket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal rögzítettük.

5.8. Western blot és sejtfelszíni biotinizáció

A HeLa sejteket ORAI1-, STIM1- és SPCA2-konstrukciókkal transzfektáltuk, majd 18 óra után RIPA pufferben, proteáz gátlókkal kiegészítve lizáltuk. A fehérjéket SDS-PAGE-en választottuk szét, majd membránra transzferáltuk. GAPDH-t, HA-t és a tag-eket specifikus ellenanyagokkal detektáltuk. A sejtfelszíni fehérjék vizsgálatához Pierce™ Cell Surface Biotinylation and Isolation Kitet használtunk a gyártó által mellékelt protokoll szerint. A blottok denzitometriai kiértékelését ImageJ-vel végeztük.

5.9. Fluoreszcens mikroszkópia

A sejten belüli Ca^{2+} -szint követésére Fura-2-AM, a Cl^- -szekréció mérésére MQAE festéket alkalmaztunk. A Ca^{2+} -mérések F340/F380 arányokon alapultak, a bazális szintet és a farmakonokra (pl. CM5480, CPA, karbakol) adott válaszokat kvantifikáltuk. Minden ROI egy-egy sejtet vagy sejtrészletet reprezentált, az adatokat átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk.

5.10. *In vitro* és *in vivo* szekréciómérés

Az izolált hasnyálmirigy duktuszokat fedőlemezre tapasztottuk ki, majd HEPES- vagy HCO_3^- -oldattal perfundáltuk 37°C-on. Az intraluminális térfogat változásait Olympus IX73 inverz mikroszkópon követtük. *In vivo* mérésekhez az egerek CM5480-at vagy vivőanyagot kaptak, majd szekretint adtunk. 30 percen keresztül gyűjtöttük a pankréásznedvet és a szekréciós rátát testtömeghez normalizáltuk.

5.11. dSTORM szuperrezolúciós mikroszkópia

Az immunfluoreszcens jelölést követően a mintákat glükóz-oxidázt és katalázt tartalmazó „blinking” pufferbe helyeztük, majd a képeket Nanoimager S (Oxford Nanoimaging) mikroszkóppal készítettük. A kolokalizáló klasztereket két fehérje 300 nm-en belüli klasztereiként definiáltuk, és ezen ko-klaszterek arányát, illetve méretét kvantifikáltuk.

5.12. FLIM-FRET mérések

A fehérje-fehérje kölcsönhatások nanométeres vizsgálatához FLIM-FRET-et alkalmaztunk. Donor (GFP/YFP) és akceptor (mCherry) jelölt fehérjekonstrukciókat használtunk. A donor élettartamát akceptor jelenlétében, majd az akceptor kiégetése után mértük. A FRET-hatékonyságot az átlagos donor-élettartam változása alapján számítottuk ki.

5.13. Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formájában adtuk meg. A normalitást Shapiro–Wilk teszttel vizsgáltuk. Normál eloszlás esetén párosítatlan t-próbát vagy egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) Tukey-féle többszörös összehasonlításos teszttel, nem normális eloszlás esetén Mann–Whitney- vagy Kruskal–Wallis-tesztet alkalmaztunk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Az elemzéseket GraphPad Prism szoftverrel végeztük.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Az ORAI1 által létrejövő extracelluláris Ca^{2+} beáramlás konstitutívan aktív primer, polarizált epitél sejtekben

RNS szekvenálással és PCR vizsgálatokkal igazoltuk az ORAI1–3, STIM1/2 és több regulátor fehérje expresszióját egér és humán hasnyálmirigy duktális organoidokban. Immunfestés alapján az ORAI1 főként a duktális sejtek apikális membránján lokalizálódott. Egér hasnyálmirigy duktális fragmentumokban a szelektív ORAI1-gátló CM5480 csökkentette a bazális intracelluláris Ca^{2+} -szintet extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében, ER Ca^{2+} -raktárak kiürítése nélkül. Az extracelluláris Ca^{2+} eltávolítása szintén csökkentette a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, amelyet ezt követően a CM5480 már alig befolyásolt, alátámasztva, hogy az ORAI1 jelentősen hozzájárul a nyugalmi Ca^{2+} -belépéshez. Karbakol által kiváltott Ca^{2+} -jel esetén a CM5480 a platófázis alatt jelentősen csökkentette a jel amplitúdóját, ami arra utal, hogy az ORAI1 hozzájárul a tartós Ca^{2+} -emelkedés fenntartásához is. D1ER-rel végzett ER Ca^{2+} mérések igazolták, hogy bazális körülmények között az ER-raktárak telítettek, így a megfigyelt jelenség nem SOCE-eredetű. Az Orai1 vagy Stim1 géncsendesítését követően a bazális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkent, és a CM5480-ra adott válasz megszűnt, miközben az extracelluláris Ca^{2+} eltávolítása továbbra is csökkentette a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t. Hasonló, CM5480-érzékeny bazális Ca^{2+} -belépést detektáltunk egér tüdő és máj organoidokban, valamint humán hasnyálmirigy organoidokban is. Eredményeink azt mutatják, hogy az ORAI1 konstitutív, raktárfüggetlen Ca^{2+} -belépést közvetít több szövet primer szekréciós epitél sejteiben, és ez jelentősen hozzájárul a bazális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fenntartásához.

6.2. Az SPCA2 fenntartja az ORAI1 konstitutív aktivitását primer epitél sejtekben

Az egér és humán hasnyálmirigy organoidok teljes transzkriptom elemzése több ORAI1-interakciós partnert tárt fel, köztük az SPCA1-et, SPCA2-t és a SEPTIN7-et. Közülük az SPCA2 bizonyult a SICE szabályozás szempontjából legígéretesebbnek. siSPCA2 kezelést követően egér hasnyálmirigy duktális fragmentumokban csökkent a bazális $[\text{Ca}^{2+}]_i$, és

jelentősen mérséklődött a CM5480-érzékeny Ca^{2+} -belépés. Ezzel szemben siSPCA1 vagy siSEPT7 kezelés nem okozott szignifikáns változást, ami az SPCA2 specifikus szerepét támasztja alá. HeLa sejtekben, ahol ORAI1-et és SPCA2-t overexpresszáltattunk, konfokális mikroszkópiával az SPCA2 retikuláris, ER-szerű mintázatot mutatott, míg az ORAI1 pontszerű eloszlást a plazmamembránban. dSTORM felvételeken az SPCA2 és ORAI1 klaszterek részleges ko-lokalizációja volt megfigyelhető nyugalmi állapotban is, amely CPA-kezelés hatására átrendeződött, jelezve az ER–PM kontakthelyek dinamikus szabályozását. FLIM-FRET mérések igazolták a térbeli közelséget az SPCA2 és ORAI1 között stimuláció nélkül is, amelyet a STIM1 jelenléte tovább fokozott. CPA-kezelés azonban nem növelte tovább a SPCA2–ORAI1 FRET-hatékonyságot, ami a raktárfüggetlen mechanizmust erősíti. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az SPCA2 adaptor fehérjeként működve, pumpaaktivitásától függetlenül képes ORAI1-mediált SICE-t generálni epiteliális sejtekben.

6.3. Az SPCA2 fokozza a STIM1 és az ORAI1 közötti kölcsönhatást

Az SPCA2 STIM1–ORAI1 kölcsönhatásra gyakorolt hatását HeLa sejtekben vizsgáltuk, amelyben STIM1-et, ORAI1-et és SPCA2-t overexpresszáltattunk. ER Ca^{2+} -raktárak kiürítése nélkül a STIM1 mérsékelt puncta képződést és limitált ko-lokalizációt mutatott az ORAI1-gyel. Az SPCA2 ko-expressziója ugyanakkor jelentősen fokozta a STIM1–ORAI1 ko-klaszterek számát és méretét nyugalmi körülmények között is. dSTORM klaszteranalízis alapján az SPCA2 jelenléte megnövelte a STIM1–ORAI1 ko-klaszterek számát és átlagos kiterjedését, CPA-kezelés hatására pedig a klasztereződés tovább fokozódott. FLIM-FRET kísérletek (STIM1-YFP és ORAI1-mCherry) megerősítették, hogy az SPCA2 jelenléte növeli a STIM1–ORAI1 FRET-hatékonyságát, ami szorosabb protein–protein interakciót jelez. Mivel a konstitutív Ca^{2+} -belépés és a megnövekedett STIM1–ORAI1 klasztereződés oka lehet az ER Ca^{2+} raktárak kiürülése az SPCA2-t expresszáló sejtekben, megmértük az ER Ca^{2+} tartalmat D1ER-rel transzfektált HeLa sejtekben 10 μM CPA kezelést követően. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy az SPCA2 nincs hatással az ER Ca^{2+} tartalmára. Sejtfelszíni biotinilálás és Western blot kísérletek során kimutattuk, hogy az SPCA2 sem a teljes, sem a sejtfelszíni ORAI1 mennyiségét nem növelte számottevően, így fő szerepe nem a trafficking, hanem a funkcionális klaszterképzés támogatása. Ko-immunprecipitáció során HA taggal jelölt ORAI1 fehérjék kihúzása során STIM1-et és SPCA2-t is detektáltunk, ami a három fehérje közös komplexét bizonyítja. Összességében az adatok egy olyan modellt támasztanak alá, amelyben az SPCA2 először az ORAI1 klasztereződését segíti elő, ez stabilizálja a STIM1-et az ER–PM junctionokban, és így lehetővé teszi a konstitutív SICE kialakulását.

6.4. Az ORAI1-en keresztül létrejövő SICE szabályozza a CFTR aktivitását és a folyadékszekréciót a hasnyálmirigy duktális epitél sejtekben

A CFTR epiteliális szekrécióban betöltött központi szerepére tekintettel vizsgáltuk, hogy az SPCA2–STIM1–ORAI1-függő SICE hogyan befolyásolja a CFTR-funkciót. Egér hasnyálmirigy organoidok immunfestése az ORAI1 és CFTR apikális ko-lokalizációját mutatta. A CFTR-mediált Cl^- szekréciót izolált duktális fragmentumokban MQAE-vel követtük. $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -ot tartalmazó pufferből a Cl^- eltávolítása növelte az MQAE-fluoreszcenciát, ami Cl^- -kiáramlást jelez, ezt a CFTR specifikus gátlója, a CFTRinh-172 megszüntette. ORAI1 gátlása CM5480-el vagy a sejten belüli Ca^{2+} lekötése BAPTA-AM-mel szignifikánsan csökkentette a bazális Cl^- effluxot. Hasonlóan, siOrai1 vagy siStim1 kezelés jelentős mértékben mérsékelte a CFTR-függő Cl^- áramlást nyugalmi körülmények között. Ezzel szemben a forskolinnal kiváltott CFTR-mediált Cl^- effluxot az ORAI1 gátlása nem befolyásolta érdemben, ami arra utal, hogy a stimulált szekréció SICE-független. siSPCA2 kezelés szintén csökkentette a CFTR-aktivitást, míg siSPCA1 vagy siSEPT7 nem okozott változást, összhangban a Ca^{2+} mérésekkel. Bazális HCO_3^- szekréció és a duktuszok hízásának mérése $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ oldatban történt, mely CM5480 hatására romlott, ami az ORAI1 szerepét erősíti mind a Cl^- , mind a HCO_3^- transzport, valamint a bazális folyadékszekréció fenntartásában. *In vivo* kísérletekben a CM5480-kezelt egerek szekretin-stimulált pancreasnedv-szekréciója szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest, ami a SICE fiziológiás jelentőségét támasztja alá a szekrécióban. Eredményeink alapján az SPCA2/STIM1/ORAI1-függő SICE kulcsfontosságú szereplője a bazális CFTR-aktivitásnak és a folyadékszekréciónak a hasnyálmirigy duktális epitél sejteiben.

6.5. A SICE az ORAI1-en keresztül más szekréciós epitél sejtekben is szabályozza a CFTR aktivitást

Annak vizsgálatára, hogy a leírt szabályozó mechanizmus általános jelenség-e különböző epiteliális szövetekben, kísérleteinket elvégeztük egér tüdő és máj organoidokon, valamint humán hasnyálmirigy organoidokon is. Mindegyik modellben a CFTR–ORAI1 apikális ko-lokalizációt figyeltünk meg. Nyugalmi állapotban a CM5480 a CFTR-függő Cl^- kiáramlását jelentősen csökkentette. Tüdő organoidokban az ORAI1-gátlás a bazális CFTR-függő Cl^- áramlást szinte teljes mértékben megszüntette. Ez arra utal, hogy az ORAI1-mediált SICE általános mechanizmus, amely a bazális CFTR-aktivitást többféle szekréciós epitéliumban meghatározza.

6.6. A SICE az ORAI1-en keresztül Ca^{2+} -függő adenil-ciklázok révén szabályozza a CFTR aktivitást

A SICE és CFTR közti kapcsolat további feltárása érdekében az AC-ok expresszióját és lokalizációját vizsgáltuk. Hasnyálmirigy organoidok RNS szekvenálása során több AC (Adcy1, 3, 6, 8, 9) expresszióját mutattuk ki. Mivel egyes AC-ok Ca^{2+} -aktiváltak (AC1, AC3, AC8), míg mások Ca^{2+} -gátoltak (AC5, AC6), alkalmasak lehetnek a Ca^{2+} /cAMP „cross-talk” közvetítésére. HeLa sejtekben CFTR és egyes AC-ok ko-expressziója mellett dSTORM mikroszkópia során azt találtuk, hogy a CFTR erőteljes nanodomén szintű ko-lokalizációt mutat AC1-gyel, AC3-mal és AC8-cal, míg AC6-tal gyengébb átfedés figyelhető meg. Ezek az AC-ok ORAI1-gyel is ko-lokalizálódtak, és háromszínű dSTORM felvételeken igazolható volt, hogy CFTR, ORAI1 és AC1/3/8 ugyanazon plazmamembrán nanodoménekben helyezkednek el. Humán apical-out hasnyálmirigy organoidokban az AC1, AC3 vagy AC8 siRNS-sel történő géncsendesítése csökkentette a bazális CFTR-aktivitást, melyek közül az AC8 csendesítése okozta a legkifejezettebb hatást. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a Ca^{2+} -aktivált AC-ok, különösen az AC8, kulcsfontosságúak a SICE downstream komponenseként a bazális CFTR-funkció fenntartásában. PKA-gátló szerek (PKI (5–24), KT5720) alkalmazása jelentősen csökkentette a bazális CFTR-függő Cl^- kiáramlást, megerősítve, hogy a PKA-függő foszforiláció nélkülözhetetlen ebben a szabályozási útvonalban. Összességében az adatok egy olyan modellt támasztanak alá, amelyben az ORAI1-mediált SICE Ca^{2+} -érzékeny AC-okat (különösen AC8-at) aktivál az apikális nanodoménekben, lokális cAMP- és PKA-aktivitást generálva, amely a bazális CFTR aktivitást fenntartja.

7. DISZKUSSZIÓ

Vizsgálataink során egy eddig kevésbé ismert szabályozó mechanizmust azonosítottunk, amely a bazális CFTR aktivitást polarizált szekréciós epitél sejtekben raktárfüggetlen Ca^{2+} beáramláson keresztül tartja fenn. Ez a SICE egy SPCA2–STIM1–ORAI1 komplex közvetítésével jön létre az apikális plazmamembrán nanodoménjeiben. Eredményeink szerint az ORAI1 nyugalmi körülmények között is konstitutívan aktív, jelentősen hozzájárul a bazális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fenntartásához, és ez az aktivitás SPCA2- és STIM1-függő, ugyanakkor független az ER Ca^{2+} -raktárak kiürülésétől. Az SPCA2 fontos szervezőelemként működik, ugyanis közvetlenül kötődik az ORAI1-hez, elősegíti annak klasztereződését, és fokozza a STIM1–ORAI1 komplexképződést ER-depléciónélkül is. Az SPCA2 hatása nem igényli saját Ca^{2+} -pumpa aktivitását, és nem jár az ER Ca^{2+} tartalmának megváltozásával, ami scaffold szerepére utal. Szövet-specifikus expressziója magyarázhatja, hogy a SICE kifejezetten duktális epitél

sejtekben hangsúlyos, míg acinus sejtekben nem. Az SPCA2–STIM1–ORAI1-függő SICE olyan apikális plazmamembrán nanodoménben szerveződik, ahol a CFTR és Ca^{2+} -aktivált AC-ok (AC1, AC3, AC8) is jelen vannak. E nanodoménben a konstans Ca^{2+} -belépés aktiválja az AC-okat, ezen belül főként az AC8-at, ami lokális cAMP-termelést és PKA-aktivációt eredményez. Ez biztosítja a bazális CFTR-aktivitást és folyadékszekréciót. Farmakológiai vagy genetikai úton gátolva az ORAI1-et, STIM1-et, SPCA2-t vagy AC-okat, a bazális CFTR-működés és szekréció nagymértékben csökken, miközben a forskolin által kiváltott, stimulált CFTR-aktivitás lényegében nem változik. Ez arra utal, hogy a SICE a bazális szekréció szabályozásában meghatározó. Eredményeink közvetlen mechanisztikus magyarázatot adnak korábbi megfigyelésekre, amelyek szerint a bazális CFTR-áramok Ca^{2+} -belépéstől és a membránhoz kötött AC-ok aktivitásától függenek. Szuperrezolúciós mikroszkópia, FLIM-FRET, funkcionális mérések és organoid modellek kombinációjával sikerült azonosítani és jellemezni egy kompakt jelátviteli egységet, amelyben Ca^{2+} -beáramlás, cAMP-szintézis és CFTR-csatorna nyitása/zárása integráltan valósul meg természetes környezetben. Fiziológiai szempontból a bazális CFTR-aktivitás elengedhetetlen a lumen hidratáltságának fenntartásához és a mucociliaris clearance biztosításához a légutakban, az enzimek kimosásához a hasnyálmirigy duktusából, valamint az epe és egyéb szekréciók összetételének szabályozásához a hepatobiliáris rendszerben. Az SPCA2–STIM1–ORAI1–AC–CFTR nanodomén olyan mechanizmust kínál, amely lehetővé teszi a sejtek számára a stabil ion- és folyadékszekréció fenntartását. Ez a mechanizmus különösen fontos lehet nyugalmi, nem stimulált állapotokban, amikor a neurohormonális hajtóerő minimális, de egy alap szekréciós szintet fenn kell tartani. Eredményeink arra is rámutattak, hogy míg a forskolin globálisan aktiválja a cAMP/PKA utat, megkerülve a SICE szükségességét, addig a bazális CFTR-aktivitás a lipid raft-szerű doménekben elhelyezkedő Ca^{2+} -érzékeny AC-ok által generált, lokális cAMP-mikrodoménektől függ. Ez a kompartmentalizáció hozzájárulhat a transzportfolyamatok finoman hangolt, környezetfüggő szabályozásához. ORAI1 és SPCA2 diszregulációját írták le különböző tumorokban, a CFTR hiánya pedig a tumorok kialakulásának rizikófaktorát növelte cisztás fibrózisban. A kísérleteink során azonosított jelátviteli egység ezen fehérjéket közös struktúrába szervezi, így befolyásolhatja mind az epiteliális homeosztázist, mind az onkogén folyamatokat. Az ORAI1/SPCA2 kölcsönhatás szabályozásának mélyebb megértése új terápiás támadáspontokat tárhat fel CFTR-hoz kapcsolódó betegségekben, gyulladásos kórképekben és rosszindulatú daganatokban. Végezetül, munkánk során bemutattuk a 3D organoidok jelentőségét. A polaritást, szoros kapcsolatokat és az eredeti szöveti tulajdonságokat megőrző humán hasnyálmirigy organoidok

megbízható platformot biztosítottak az intracelluláris Ca^{2+} -szint és CFTR-szabályozás vizsgálatához. A nagy felbontású képalkotás, a célzott génmanipulációk és a funkcionális szekréciós mérések kombinációja kulcsszerepet játszott a SICE–CFTR kapcsolat feltárásában.

Összességében egy olyan modellt vázoltunk fel, amely szerint az SPCA2 által vezérelt, STIM1-függő ORAI1-mediált SICE apikális nanodoménekben biztosít folyamatos Ca^{2+} -jelet. Ez a jel Ca^{2+} -aktivált AC-okat és PKA-t aktivál, így fenntartva az alap CFTR-függő ion- és folyadékszékreciót, függetlenül az ER Ca^{2+} -raktárak kimerülésétől és a hormonális stimulációtól.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A CFTR Cl^- csatorna alapvető szerepet játszik a transzepiteliális ion- és folyadékszékrecióban olyan szervekben, mint a hasnyálmirigy, a máj és a tüdő. Míg a stimulált szekreció során fennálló CFTR-szabályozás viszonylag jól ismert, az alap CFTR-aktivitás fenntartásának mechanizmusai kevésbé tisztázottak. A dolgozat egy új szabályozási útvonalat azonosít, amelyben az apikális SPCA2–STIM1–ORAI1 komplex által közvetített, raktárfüggetlen Ca^{2+} -belépés (SICE) fenntartja az alap CFTR-működést szekreciós epitél sejtekben. Igazolható, hogy az ORAI1-mediált Ca^{2+} -belépés konstitutívan aktív primer, polarizált epitél sejtekben (hasnyálmirigy, tüdő, máj), és jelentősen hozzájárul a bazális intracelluláris Ca^{2+} -szinthez. Ez az aktivitás nem igényli az ER Ca^{2+} -raktárak kiürülését, viszont STIM1- és SPCA2-függő. Az SPCA2 az ORAI1-hez kapcsolódva elősegíti annak klasztereződését és a STIM1-gyel való kölcsönhatását egy jelátviteli nanodomént létrehozva az apikális plazmamembránban. Ebben a nanodoménben az ORAI1-en keresztül zajló Ca^{2+} -belépés Ca^{2+} -érzékeny adenil-ciklázokat (különösen AC8-at) aktivál, lokális cAMP-termelést és PKA-aktivációt hozva létre. Ennek eredményeként fennmarad a bazális CFTR-függő Cl^- és HCO_3^- -szekreció. Az ORAI1, STIM1, SPCA2 és az AC-ok farmakológiai vagy genetikai gátlása jelentősen csökkenti a bazális CFTR-aktivitást és a folyadékszékreciót, miközben a forskolin által kiváltott CFTR-aktiváció változatlan marad. Így a SICE szelektíven a bazális, nem pedig a stimulált CFTR-funkciót kontrollálja. Szuperrezolúciós dSTORM és FLIM-FRET mérések közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az SPCA2, STIM1, ORAI1, az AC-ok és a CFTR szorosan szervezett apikális nanodoménekben helyezkednek el. A polaritást megőrző humán hasnyálmirigy organoidok kulcsfontosságú szerepet játszottak e mechanizmusok fiziológiai környezetben történő igazolásában. A dolgozat összességében egy korábban nem ismert mechanizmust tár fel, amely révén az epiteliális szövetek külső stimulusoktól függetlenül fenntartják az alap

szekrétciót. Az SPCA2–STIM1–ORAI1–AC–CFTR nanodomén olyan jelátviteli csomópontot képvisel, amely integrálja a Ca^{2+} - és cAMP-jelátvitelt a homeosztázis fenntartása érdekében, és új terápiás célpontokat kínálhat CFTR-diszfunkcióval járó betegségekben.

9. AZ ÚJ MEGFIGYELÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kimutatható, hogy polarizált szekrétciós epitél sejtekben a bazális CFTR-aktivitás és a nyugalmi folyadékszekrétció fenntartásáért nem klasszikus neurohormonális stimulusok, hanem egy konstitutív, raktárfüggetlen Ca^{2+} -beáramlás felel.

2. Az SPCA2 központi regulátorként azonosítható, amely ER Ca^{2+} -raktárak kiürülése nélkül aktiválja a STIM1–ORAI1 komplexet. Ez az SPCA2-függő SICE folyamatos Ca^{2+} -forrást biztosít a bazális epiteliális ion- és folyadékszekrétció fenntartásához.

3. A STIM1 vagy ORAI1 farmakológiai vagy genetikai gátlása csökkenti a bazális CFTR-aktivitást és a nyugalmi folyadékszekrétciót, miközben a forskolin-indukált válaszok változatlanok maradnak, így egyértelműen elkülönül a bazális és a stimulált szekrétció szabályozása.

4. Az eredmények egy olyan modellt támasztanak alá, amelyben az SPCA2 által folyamatosan fenntartott ORAI1-mediált Ca^{2+} -belépés Ca^{2+} -aktivált AC-ok (különösen AC8) segítségével lokális cAMP- és PKA-aktivitást generál, ezáltal biztosítva a bazális CFTR-funkciót. Ez a mechanizmus független az ER Ca^{2+} -raktárak kimerülésétől és a neurohormonális stimulációtól, és egy önálló szabályozási réteget képvisel az epiteliális homeosztázis fenntartásában.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tudományos munka sohasem magányos tevékenység, és e doktori munka sem jöhetett volna létre azok támogatása nélkül, akik az évek során segítettek, bátorítottak és inspiráltak. Elsősorban témavezetőmnek, **Dr. Maléth Józsefnek** szeretnék köszönetet mondani a folyamatos szakmai iránymutatásért, biztatásért és türelméért. Az ő támogatása nemcsak a dolgozat megszületéséhez járult hozzá, hanem a kutatói pályához való hozzáállásomat is alapvetően formálta. Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Lengyel Csabának**, a Belgyógyászati Klinika jelenlegi vezetőjének, aki lehetőséget adott rá, hogy az intézetében dolgozhassak.

Külön szeretném megköszönni **Varga Árpádnak**, aki hét éven keresztül volt mentorom. Már BSc tanulmányaimtól kezdődően végigkísérte a fejlődésemet, rengeteget tanultam tőle szakmailag és emberileg egyaránt. Hálás vagyok nemcsak a tudományos támogatásáért, hanem a barátságáért is, amely az elmúlt éveket még értékesebbé tette számomra. Köszönettel tartozom mindazoknak, akikkel együtt jártam végig ezt az utat: **Madácsy Tamara, Horváth Zsófia, Molnár Tünde, Szabó Viktória, Jójárt Boldizsár, Susánszki Petra, Papp Noémi**. Nélkületek ez a projekt nem jöhetett volna létre, hálás vagyok a segítségért, a bátorításért és a közös élményekért. Köszönet illeti valamennyi kollégámat is, akik az évek során tanítottak, segítettek és támogattak: **Pallagi Petra, Kúthy-Sutus Enikő, Tim Crul, Tél Bálint, Ingrid Hegnes Sendstad, Görög Marietta, Dudás Krisztina, Molnár Melinda, Sáriné Konczos Zsuzsanna, Zsirmik Anita, Magyarné Pálfi Edit, Fűr Gabriella**. Barátaimnak is szeretném megköszönni, hogy mellettem álltak, türelmük, támogatásuk és belém vetett hitük nagy erőt adott. Végül, de nem utolsósorban a családomnak tartozom a legmélyebb hálával. Különösen nagymamámnak, **Kukityné Gyapjas Etelkának**, akinek szeretete, támogatása és áldozatai nélkül nem jutottam volna el idáig. Köszönettel tartozom édesanyámnak, **Kukity Katalinnak** is a folyamatos biztatásért és hitéért. Bízom benne, hogy édesapám, **Botka Tibor** büszke lenne erre az rám és az elért eredményeimre. Az általuk közvetített értékek és támaszuk végigkísért ezen a nem mindig egyszerű úton és biztatásuk erőt adott a továbbhaladáshoz.