

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

3494.

TAMÁS SZIMONETTA XÉNIA

Celluláris és molekuláris élettan
című program

Programvezető: Dr. Hunyady László, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Enyedi Balázs, habilitált egyetemi docens

Az LTB₄ szöveti eloszlásának vizsgálata új genetikailag kódolt bioszenzorokkal

Doktori értekezés

Tamás Szimonetta Xénia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Enyedi Balázs, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Kereszturi Éva, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Lipinszki Zoltán, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Tagok: Dr. Kövesdi Dorottya, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Ruisanchez Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2026

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	8
1.1. A neutrofil granulocita kemotaxis és effektor működés	8
1.2. az LTB ₄ szintézise	12
1.3. Az LTB ₄ receptorai: a BLT1 és a BLT2	14
1.4. A BLT receptorok internalizációja és az LTB ₄ lebontása	17
1.5. Genetikailag kódolt fluoreszcens bioszenzorok	18
1.5.1. A fluoreszcens bioszenzorok érzékelő alegysége	19
1.5.2. A fluoreszcens jelző alegységek fajtái	21
1.6. A zebraahal mint modellorganizmus	25
2. Célkitűzések	28
3. Módszerek	29
3.1. Plazmid konstrukciók létrehozása	29
3.2. LTB ₄ szenzor prototípusok tesztelése	31
3.3. A GEM-LTB ₄ -et stabilan expresszáló HEK293A sejtvonal létrehozása . .	32
3.4. A GEM-LTB ₄ karakterizálása HEK293A sejtekben	32
3.5. Egér neutrofilek izolálása és az fMLP hatására felszabaduló endogén LTB ₄ mérése	34
3.6. Transzgenikus zebraahal vonalak létrehozása	35
3.7. Exogén LTB ₄ gradiens vizualizációja zebrahalakban	36
3.8. Endogén LTB ₄ felszabadulás mérése zebrahalakban	37
3.9. Az exogén LTB ₄ és a GEM-LTB ₄ expresszió leukocita migrációra gyako- rolt hatásának vizsgálata	37
3.10. Mikroszkópos mérések kvantifikálása és értékelése	38
4. Eredmények	41
4.1. A GEM-LTB ₄ fejlesztése	41
4.2. A GEM-LTB ₄ karakterizálása HEK293A sejtekben	45
4.3. Egér neutrofil granulocitákból felszabaduló LTB ₄ vizualizációja	49
4.4. Exogén LTB ₄ gradiens mérése <i>in vivo</i> zebrahalakban	52

4.5. Kalciumionoför által kiváltott endogén LTB ₄ detektálása zebraalakban .	55
4.6. A GEM-LTB ₄ expresszió leukocita migrációra gyakorolt hatása	57
5. Megbeszélés	59
6. Következtetések	62
7. Összefoglalás	63
8. Summary	64
9. Irodalomjegyzék	65
10. Saját publikációk jegyzéke	86
11. Köszönetnyilvánítás	87

Rövidítések jegyzéke

12(S)HETE 12(S)-hidroxi-eikozatetraénsav

20-COOH-LTB₄ 20-karboxi-leukotrién B₄

20-OH-LTB₄ 20-hidroxi-leukotrién B₄

5(S)HETE 5(S)-hidroxi-eikozatetraénsav

5-LOX 5-lipoxigenáz

5-oxo-ETE 5-oxo-eikozatetraénsav

AA arachidonsav

ALDH aldehyd-dehidrogenáz

BLT1 leukotrién B₄ receptor 1

BLT2 leukotrién B₄ receptor 2

C5a komplement komponens 5a

CNBD ciklikus nukleotid kötő domének

cpEGFP cirkulárisan permutált enhanced zöld fluoreszcens fehérje

cpFP cirkulárisan permutált fluoreszcens fehérjék

cPLA2 citoszolikus foszfolipáz A2

CXCL8 CXC-kemokin ligand 8

CXCR1 CXC-kemokin 1 receptor

CXCR2 CXC-kemokin 2 receptor

CYP4F3A citokróm P450 4F3A

DAG diacyl-glicerol

EC extracelluláris médium

EGFP enhanced zöld fluoreszcens fehérje

ELISA enzimhez kötött immunszorbens assay

fMLP N-formilmetionin-leucin-fenilalanin

FAP fluorogén aktiváló fehérje

FAST fluoreszcens aktiváló és abszorpcióeltoló tag

FLAP 5-lipoxigenáz aktiváló fehérje

FRET Fröster-féle energia transzfer

GEM GPCR-based Extracellular Mapping/G-fehérje kapcsolt receptor alapú Extracelluláris Feltérképezés

GFP zöld fluoreszcens fehérje

GPCR G-fehérje-kapcsolt receptor

GRK G-protein receptor kinázok

IC intracelluláris médium

ICAM-1 intracelluláris sejtadhéziós molekula 1

Ig κ immunglobulin kappa lánc

IP3 inozitol-trifoszfát

iRFP infravörös fluoreszcens fehérjék

JAM-A junkcionális adhéziós molekula 1

LFA-1 limfocita funkció-asszociált antigén 1

LTA4H leukotrién A4-hidroláz

LTA₄ leukotrién A₄

LTB₄ leukotrién B₄

LXA₄ lipoxin A₄

MAC-1 makrofág-1 antigén

MLCK miozin könnyűlánc kináz

NET neutrofil extracelluláris csapda

PAMP patogén-asszociált molekuláris mintázat

PBP periplazmikus kötő fehérje

PCR polimeráz-láncreakció

PECAM-1 vérlemezke-endotél sejtadhéziós molekula 1

PGE₂ prosztaglandin E₂

PI3K foszfoinozítid-3-kináz

PIP₂ foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

PIP₃ foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát

PKC protein kináz C

PLC β foszfolipáz C β

PPAR α peroxisoma proliferátor aktivátor receptor alfa

PSGL1 P szelektin glikoprotein ligand 1

PTU 1-fenil-2-tiokarbamid

ROCK Rho-asszociált protein kináz

SBP szolubilis kötő fehérje

sLeX szialil-Lewis-X

SLP önjelölő fehérje

VCAM-1 vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1

VLA4 késői aktivációs antigén-4

VSD feszültség-érzékelő domének

1. Bevezetés

1.1. A neutrofil granulocita kemotaxis és effektor működés

A kemotaxis olyan irányított sejtmozgás, melynek irányát és sebességét különböző kémiai ágensek extracelluláris eloszlása határozza meg¹. A doktori értekezésem fő témáját adó leukocita kemotaxist először Theodor Leber írta le 1888-ban, Wilhelm Pfeffer prokariótákon alapuló munkáinak figyelembevételével. Leber nyulakon végzett kísérleteiben megfigyelte, hogy szaruhártya irritációt követően a leukociták különböző távolságokból és irányokból egyenes vonalban haladnak a gyulladásban lévő terület felé. Ezen kísérlet alapján született a hipotézis, miszerint a szövetsérülés következtében felszabaduló diffúzibilis anyagok irányítják a fehérvérsejtek mozgását². Az első kemoattraktáns molekulát több évtizeddel később azonosították; az N-formilmetionin-leucin-fenilalanint (fMLP) 1976-ban, majd az első citokint, a CXC-kemokin ligand 8 -at (CXCL8) 1987-ben^{3,4}. A kemotaxis fontossága napjainkban már ismert; számtalan élettani és fejlődési folyamatban tölt be elengedhetetlen szerepet, a limfociták aktivációjától és mozgásától egészen az embriogenezisen át; patológiás esetekben a tumor metasztázisok kialakulásáig⁵⁻⁷.

A sérülés helyén megjelenő kemoattraktánsok hatására a fehérvérsejtek közül elsőként a neutrofil granulociták jelennek meg a gyulladás helyszínén⁸. Elsődleges kemoattraktánsokként funkcionálnak a baktériumokból és a sérült szövetekből felszabaduló formilpeptidek, például az fMLP, vagy a komplement kaskád részét képező komplement komponens 5a (C5a)⁴. Az elsődleges kemoattraktánsok jelenlétére a környező szövetek és rezidens immunsejtek másodlagos kemoattraktánsokat és gyulladásos citokineket termelnek. Ezek részt vesznek a közeli endotél sejtek aktivációjában, elindítva a neutrofil granulociták extravazációját⁴.

A gyulladás hatására az endotél sejtek felszínén adhéziós molekulák, szelektinek jelennek meg. A Weidel-Palade testekben tárolt P-szelektinek a citokin stimulust követő pár percen belül kihelyeződnek az endotél felszínére, miután gyenge kölcsönhatásba lépnek a neutrofil granulociták citoplazmatikus membránjában található P szelektin glikoprotein ligand 1 (PSGL1) fehérjével. A két fehérje közötti kölcsönhatás révén a neutrofil granulociták mozgása lelassul, majd gördülni (rolling) kezdenek az endotélium felszínén⁹. Az endotél sejtekben elkezdődő E-szelektin expresszió és kihelyeződés, a neutrofil granulociták

citákon található szialil-Lewis-X (sLeX) tetraszachariddal kapcsolódva tovább erősíti a folyamatot (slow rolling)¹⁰. Gördülés közben a neutrofilek kapcsolatba lépnek az endotél felszínén rögzülő proinflammatorikus citokinekkel (például az interleukin-8-cal) melyek a még szorosabb endotél-neutrofil kapcsolat kialakítása mellett, részt vesznek az immunsejtek aktivációjában is.

Következő lépésként megtörténik a neutrofil granulociták letapadása¹¹. Az adhéziót követően a sejtek a gyulladásos citokinek grádiensét követve mozognak az érfalon. Ezzel egy időben a neutrofilek felszínén megjelennek a limfocita funkció-asszociált antigén 1 (LFA-1) és késői aktivációs antigén-4 (VLA4) integrinek, melyek az endotél eredetű intracelluláris sejtadhéziós molekula 1 (ICAM-1) és a vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1 (VCAM-1) fehérjékkel szoros kapcsolatot létrehozva megállítják a gördülést¹². A folyamat ezen szakaszában a neutrofilek makrofág-1 antigén (MAC-1) és ICAM-1 függő módon az érfalon kúszva (crawling) keresik meg az extravazációhoz legalkalmasabb helyet. Ezt követően a sejtek polarizálódnak, és általában két endotél sejt között (paracellulárisan), de olykor az endotél sejten keresztül (transzcellulárisan) megtörténik az érfalon való átjutás, a diapedézis. Ezt a folyamatot a VLA4, ICAM-1, VCAM-1, JAM-A és PECAM-1 integrinek és a CD99 fehérjék koordinálják^{13,14}.

Az intersticiális térben a neutrofil granulociták kemotaxis segítségével, G-fehérje kapcsolt kemoattraktáns receptoraik aktivációjával jutnak el a gyulladás helyszínéhez¹⁵.

A neutrofil granulocitákat a szövetbe történő belépését követően a másodlagos kemoattraktánsok koncentráció grádiensei irányítják a gyulladás közelébe, ezt követően a sejtek az elsődleges kemoattraktánsok grádienseit követve jutnak el a gyulladás pontos helyére⁴. A neutrofilek eközben pozitív visszacsatolás révén további fehérvérsejteket toborozva amplifikálják a gyulladás folyamatát. A másodlagos hírvivők feltehetően egymást követő hullámokban szabadulnak fel, közülük elsőként a leukotrién B₄ (LTB₄)^{15,16}, amely a neutrofil granulociták egy speciális migrációs formáját a neutrofil rajzást (swarming) is előidézi¹⁷. A neutrofil rajzás egy önszerveződő folyamat, mely során a neutrofilek által termelt LTB₄ serkenti a neutrofil granulociták felhalmozódását, valamint fokozza a sejt klaszterek kialakulását a gyulladás helyszínén.¹⁷

A sérülés környezetében lévő kórokozók jelenlétét a neutrofil granulociták közvetlen módon a mintázatfelismerő receptoraik, közvetett módon pedig az Fc γ -és komplement-

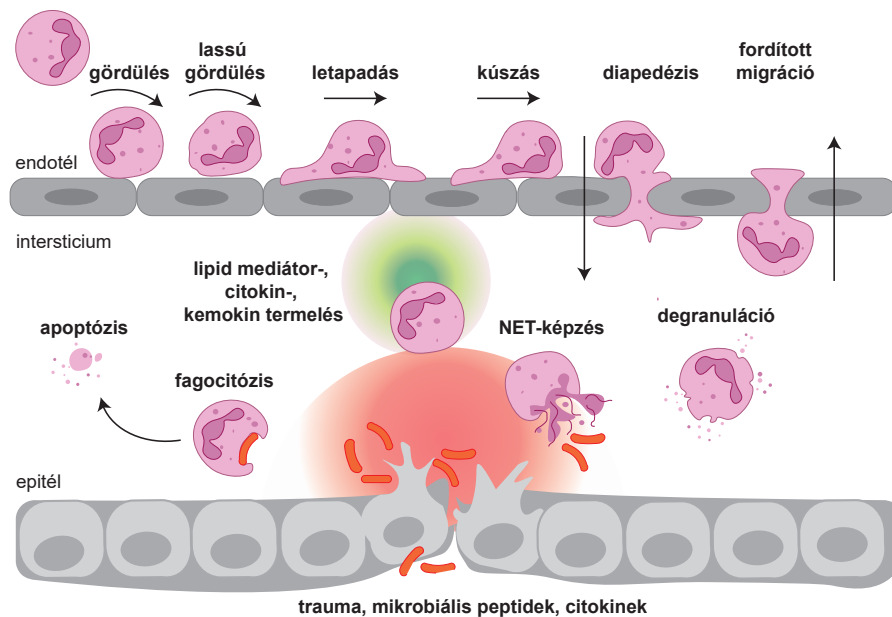
receptorokon keresztül ismerik fel. A mintázatfelismerő receptorok, mint például a toll-like receptorok, NOD-like receptorok és lektin receptorok, patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) ismernek fel. PAMP szignálok lehetnek például bizonyos baktériumokra jellemző szénhidrátok, peptidoglikánok, lipoproteinek, a dupla szálú RNS molekulák de a flagellin is. Az $\text{Fc}\gamma$ -és komplement-receptorokon keresztül a neutrofilek a szervezet által antitestekkel, vagy komplementfragmentumokkal opsonizált patogéneket tudják azonosítani¹⁸.

A gyulladás helyén felismert kórokozókkal szemben a neutrofil granulociták három ismert módon lépnek fel: fagocitózissal, degranulációval és a neutrofil extracelluláris csapda (NET) képzés folyamatával¹⁹ (1. ábra).

A neutrofilekben a fagocitotikus receptorok, mint például az $\text{Fc}\gamma$ receptorok aktivációja indítja el a fagocitózis folyamatát. A sejtekben a citoplazma bizonyos fehérjei (például aktin mikrofilamentumok) átrendeződnek és kialakul a fagocitotikus serleg. A patogéneket a neutrofilek állábakkal veszik körül, majd a plazmamembrán lefűződését követően kialakul a fagoszóma¹⁸. A fagoszómához különböző granulumok fúzionálnak, melynek következtében a NADPH-oxidáz-dependens folyamatok és antibakteriális fehérjék (katepszinek, defenzinek, laktoferrinek, lizozimek) hatására a bekebelezett patogén eliminálódik. A szekunder (specifikus) granulumok a fagoszómán kívül az extracelluláris térbe is ürülnek, a bennük lévő antibakteriális hatású laktoferrinek, lizozimek és B12-t kötő fehérjék részt vesznek a kórokozók degradációjában, míg a proteolitikus zselatináz és kollagenáz szekréciója segíti a neutrofilek mozgását az extracelluláris mátrixban²⁰. Amennyiben a kórokozó mérete túl nagy, a gyulladás környezetében a neutrofilekben megindulhat a NET képződés²¹. A NETózis során a kondenzált kromatinállomány fellazul, DNS, antimikrobiális fehérjék, proteázok és különböző enzimek (többek között a reaktív oxigén gyökök termeléséért felelős myeloperoxidáz) kerülnek a külvilágba, melyek együtt egy extracelluláris hálózatot hoznak létre²². A NET fizikailag akadályozza a baktériumok és gombák mozgását, valamint részt vesz különböző virulencia faktorok degradációjában és a patogének elpusztításában^{23,24}.

A gyulladás megszűnése során a neutrofil granulociták többsége apoptotikus sejthalálon megy keresztül, míg a sejtek kis populációja fordított, más néven reverz migrációba (reverse migration) kezd, és visszatér a vérkeringésbe^{23,25,26}. A makrofágok által termelt

gyulladáscsökkentő lipid mediátor prosztaglandin E2 (PGE2) hatására a neutrofil granulociták enzimaktivitása megváltozik. Az LTB₄ termelés csökken, míg a lipoxin A4 (LXA₄) mennyisége fokozódik, ezzel nő a fordított migráció bekövetkezésének esélye²⁷. Ezen felül a jelenség kialakulását magyarázhatja a kemoattraktánsok G-fehérje függő receptorainak deszenzitizációja. Erre példa a CXCR1 és CXCR2 receptorok sejtfelszíni eloszlásának megváltozása a gyulladás különböző szakaszaiban. A vérkeringésben jelenlévő érett neutrofil granulociták sejtfelszínén kezdetben mindkét receptor megtalálható. A sérülés kialakulását követően a CXCL8 gradiens főként a CXCR1 receptoron keresztül fejti ki kemotaktikus hatását, serkenti a neutrofilekből álló klaszterek képződését a gyulladás helyén. A ligandkötés hatására a CXCR1 receptor internalizálódik, így a neutrofilek felszínén a CXCR2 receptor aránya megnő. A megváltozott receptor eloszlás révén a gyulladás későbbi szakaszában, a CXCL8 a CXCR2 receptorhoz kötődve növeli a sejtek mobilizációs képességét; serkenti a gyulladás feloldását és a neutrofil granulociták reverz migrációját²⁸.



1. ábra. A neutrofil granulociták migrációja és kórokozókkal szembeni fellépése.

A neutrofil granulociták az elsődleges kemoattraktánsok hatására az érfalon keresztül a gyulladás helyére vándorolnak. A sérüléshez érkező sejtek másodlagos kemoattraktánsokat termelnek, ezzel tovább fokozva a neutrofilek vándorlását. A gyulladás helyén található mikroorganizmusok ellen fagocitózissal, NET-képződéssel vagy degranulációval lépnek fel a neutrofilek. A gyulladás feloldása során a neutrofil granulociták vagy apoptotizálnak, vagy reverz migráció révén visszatérnek a vérkeringésbe. Az ábra a ⁽¹²⁾ közlemény alapján készült.

Bár a neutrofil granulociták migrációs tulajdonságairól számos ismeret áll a rendelkezésünkre, a neutrofil rajzás és a reverz migráció jelenségeinek jelentősége és mechanizmusai még napjainkban is tisztázatlanok.

1.2. az LTB₄ szintézise

A szöveteket ért trauma, különböző mikrobiális peptidok (például az fMLP), allergének, citokinek és egyes növekedési faktorok jelenléte aktiválja a sejtek *de novo* LTB₄ szintézisét^{29,30}. A sejtfelszíni receptorok ligandkötése, a kalciumion citoplazmatikus és sejtmagi koncentrációjának megemelkedése, valamint a sejtek duzzadása, így a sejtmembránok

megnyúlása együttesen váltja ki az LTB_4 bioszintézisét^{31,32}.

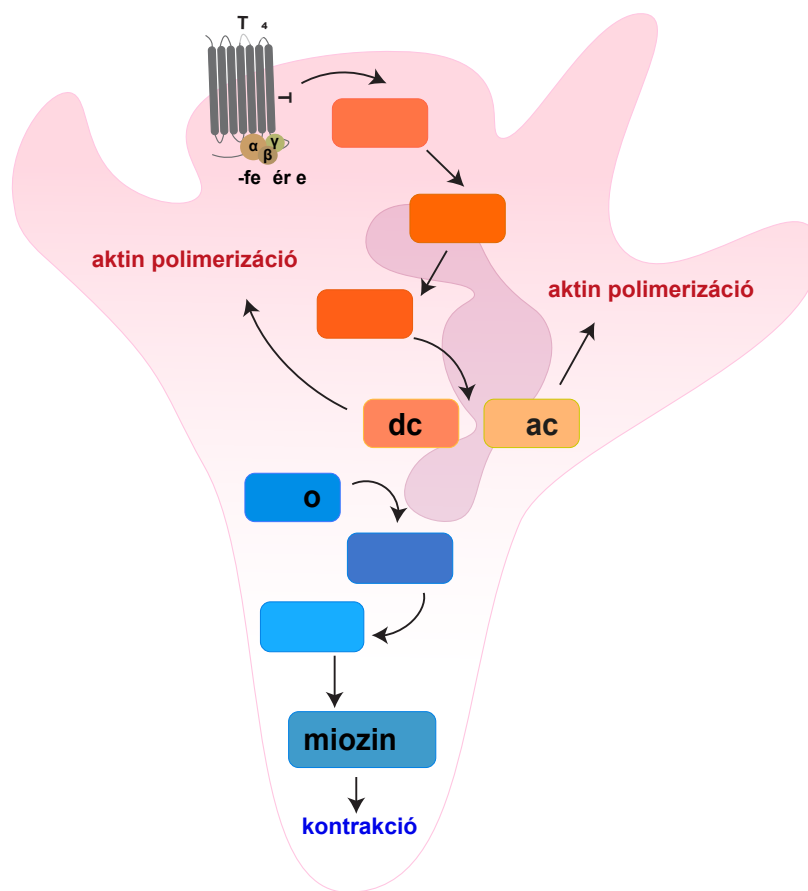
A kemoattraktáns prekursorát az arachidonsavat (AA) a citoszolikus foszfolipáz A2 (cPLA2) hasítja le a sejtmembrán foszfolipidjeiről, a citoplazmatikus-és magmembránhoz transzlokálódva³¹. Ezután az 5-lipoxigenáz (5-LOX) enzim helyeződik ki a magmembránhoz, és a 5-lipoxigenáz aktiváló fehérje (FLAP) segítségével az AA-at leukotrién A4-gyé (LTA_4) alakítja³³.

A cPLA2 és az 5-LOX enzimek szerkezete hasonló. Mindkét enzim két fehérje doménből tevődik össze. A cPLA2 C2-es és az 5-LOX C2-like doménjei a kalciumion megkötéséért felelősek, míg a fehérjék katalitikus régiói az enzimaktivitást végzik.^{34,35} Az enzimek membránhoz történő transzlokációját a kalciumion C2 és C2-szerű doménhez való kötődése által kiváltott konformációváltozás, valamint a sérült szövetek ozmotikus tulajdonságainak változása miatt megduzzadó sejtekben bekövetkező citoplazmatikus és magmembránok megnyúlása együttesen teszik lehetővé³². Az LTB_4 bioszintézisében a FLAP, mint horgony fehérje a magmembránban tartja az 5-LOX-ot. Ezzel egy időben megköti az AA-t, ezáltal térben közel hozza egymáshoz az enzimet és annak szubsztrátját, így gyorsítja az LTA_4 termelődését. A folyamat utolsó lépéseként a leukotrién A4-hidroláz (LTA_4H) az LTA_4 hidrolízis katalizálásával LTB_4 -et állít elő³⁰ (2. ábra).

családjába tartozik, aminosav-szekvenciájuk azonban csak 45,2%-nyi egyezést mutat^{42,43}. A BLT1 és BLT2 szöveti eloszlása, specificitása és LTB₄ iránti affinitása nagyban eltér egymástól. A BLT1 az LTB₄ nagy affinitású ($K_d \approx 0,1-2$ nM), ligand specifikus receptora, amely elsődlegesen fehérvérsejtekben, kis mértékben szöveti strukturális sejtekben (például fibroblasztokban) fejeződik ki. Ezzel ellentétben a BLT2 ligand iránti specificitása és affinitása alacsonyabb ($K_d \approx 23$ nM), az LTB₄-en kívül több eikozanoid is aktiválja, expressziós mintázata pedig sokkal általánosabb⁴⁰⁻⁴⁴.

Az LTB₄ kötése során a BLT1 elsődlegesen Gi és Gq mediált jelátviteli útvonalakat indít el. A Gi aktiváció az intracelluláris cAMP szint csökkenését, míg a Gq a kalciumion szint citoplazmatikus megnövekedését eredményezi. A kifejtett hatások több protein kináz aktivációját idézik elő, melyek széleskörű szöveti és celluláris változásokat hoznak létre²⁹.

A neutrofil granulocitákban létrejövő BLT1 jelpálya elindítja és szabályozza a sejtmigrációhoz szükséges folyamatokat. A BLT1 aktivációja során a kapcsolódott G-fehérje β és γ alegysége aktiválja a foszfolipáz C β (PLC β) fehérjét, amely a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) hasításával inozitol-trifoszfátot (IP₃) és diacil-glicerolt (DAG) hoz létre. A másodlagos hírvivők hatására megnő a citoplazmatikus kalcium koncentráció és aktiválódik a PKC^{45,46}. Ezzel párhuzamosan aktiválódik a Ras fehérje is, ami a foszfoinozítid-3-kináz (PI3K) enzim közvetítésével foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát (PIP₃) képződéshez vezet⁴⁷. A két folyamat együttesen segíti elő a kis G-fehérjék aktivációját, ezzel a sejtek polarizációját és a sejtmigráció létrejöttét. A neutrofil granulociták kemotaktikus gradiens felé néző elülső részén (leading edge) elhelyezkedő Rac1 és Cdc42 fehérjék aktivációja az Arp2/3 fehérjekomplexen keresztül szabályozza az aktinpolimerizációt, létrehozva a sejtek pszeudopódiumait⁴. Ezzel szemben a sejt hátulsó részén (uropod) a migrációhoz szükséges kontrakciót a RhoA, Rho-asszociált protein kináz (ROCK), miozin könnyűlanc kináz (MLCK) és a miozin II fehérjék révén a miozin könnyűlanc foszforilációja hozza létre^{48,49}. Ez a finom tér-időbeli szabályozás biztosítja az elülső és hátulsó sejtrégiók összehangolt működését. A tartós kemotaxisához szükséges sejtpolarizációt az LTB₄ autokrin és parakrin termelődése együttesen tartja fent⁴⁶ (3. ábra).



3. ábra. A BLT1 jelpálya szerepe a neutrofil granulocita migrációban.

A BLT1 aktiválódása a sejt elülső részén (leading edge) a Ras és PI3K útvonalon keresztül PIP3 felhalmozódáshoz, majd a Rac1 és Cdc42 aktiválása aktinpolimerizációhoz vezet, ami kialakítja a pseudopódiumokat. Ezzel egy időben a sejt hátulsó részén (uropod) a RhoA/Rock útvonal az MLCK aktivációja által, majd a miozin II foszforilációja révén kontrakcióhoz vezet. A neutrofil granulociták ezen polarizációja hozza létre a sejtek LTB_4 gradiens felé irányuló migrációját. Az ábra a ⁽⁴⁶⁾ közlemény alapján készült.

A BLT1 további funkciói között szerepel a gyulladás kialakulásához vezető molekuláris kaszkádok elindítása, a fagocitózisban fontos kinázok (Syk, PKC és ERK1/2) foszforilációja. Az LTB_4 -BLT1 jelpálya ezen felül hatással van az eozinofil granulociták, hízósejt progenitorok, dendritikus sejtek, T- és B-limfociták és simaizom sejtek migrációs mintázataira, valamint egyes immunsejtek (neutrofil granulociták, makrofágok) aktivációjára és proliferációs folyamataira^{29,50,51}.

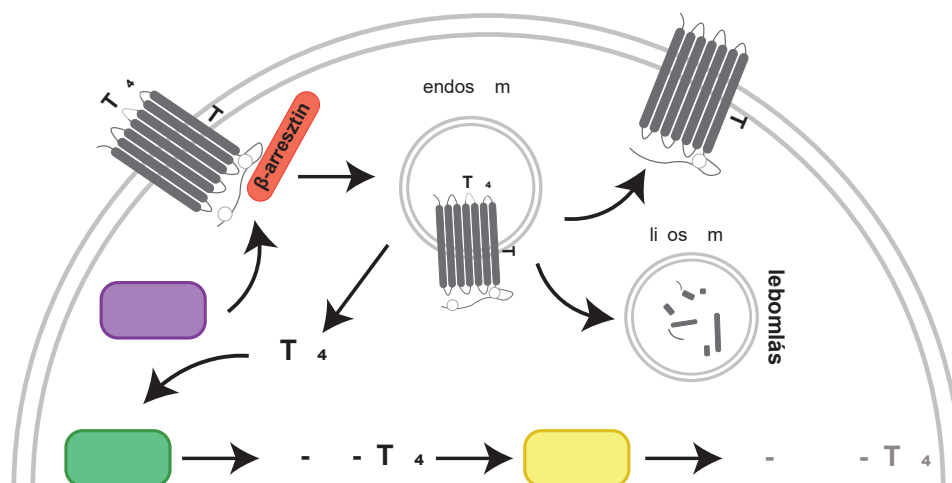
A BLT2 élettani szerepe kevésbé ismert, feltételezések szerint funkcióját elsődlegesen az epitél sejtek barrier szerepének szabályozásában fejt ki^{52–54}.

1.4. A BLT receptorok internalizációja és az LTB₄ lebontása

Az LTB₄ mennyiségének felhalmozódását és a jelátviteli útvonalak túlzott aktivációját több szabályozó mechanizmus kontrollálja. Az LTB₄ BLT1 receptorhoz való kötődését követően, a tartós aktiváció elkerülése érdekében a G-protein receptor kinázok (GRK), elsősorban a GRK2, GRK5 és GRK6, foszforilálják a receptor harmadik intracelluláris hurokrégióját, valamint a C-terminális farokrégióban található szerin- és treonin aminosavakat⁵⁵. Az intracelluláris hurok foszforilációja a receptor deszenzitizációját idézi elő, míg a C-terminális szakasz foszforilációja elősegíti a β -arresztin által mediált internalizációt^{46,55–57}.

Az internalizáció során az LTB₄-BLT1 komplex először a korai endoszómába kerül, ahol a savas pH-jú közeg elősegíti a ligand receptorról való disszociációját. Ezt követően a receptor vagy visszakerül a sejtfelszínre, vagy lebomlik a sejtek lizoszómáiban^{46,58}.

Eközben a citoplazmában megkezdődik a receptorról disszociált LTB₄ metabolizmusa. A neutrofilek és makrofágok citoplazmájában található, a citokróm P450 fehérjecsaldba tartozó CYP4F3A enzim katalizálja az LTB₄ ω -oxidációját, amelynek eredményeként keletkezik a 20-hidroxi-leukotrién B₄ (20-OH-LTB₄)^{59,60}. Bár a 20-OH-LTB₄ biológiai aktivitása alacsonyabb, mint az LTB₄-é, képes kötődni a BLT1 receptorhoz és aktiválni annak jelátviteli útvonalát⁶¹. A 20-OH-LTB₄ inaktiválása további oxidációs lépésekkel történik. Az aldehid-dehidrogenáz enzim működése révén a metabolizmus inaktív végterméke a 20-karboxi-leukotrién B₄ (20-COOH-LTB₄), amely konjugációt követően választódik ki a szervezetből⁶² (4. ábra).



4. ábra. A BLT1 receptor internalizációja és az LTB₄ metabolizmusa.

Az aktiválódott BLT1 az LTB₄-gyel β -arrestin függő módon internalizálódik és a korai endoszómába kerül. Az endoszómában a savas pH hatására a receptor és ligandja szétválik. A BLT1 vagy visszakerül a plazmamembránba, vagy ubiquitinációt követően lebomlik a sejt lizoszómáiban. Az LTB₄-ből a CYP4F3A és az aldehyd-dehidrogenáz (ALDH) enzimek katalizálta folyamatok során először a biológiailag aktív 20-OH-LTB₄, majd az inaktív 20-COOH-LTB₄ keletkezik, amely konjugációt követően kiürül a szervezetből. Az összefoglaló ábra a ^(46,58,62) publikációk felhasználásával készült.

Erős gyulladásos válasz esetén, a fokozott receptor aktiváció megnöveli a leukociták intracelluláris LTB₄ koncentrációját. A sejtekbe bejutó LTB₄ a peroxisoma proliferátor aktivátor receptor alfa (PPAR α) transzkripciós faktor aktivációja révén fokozza az LTB₄ metabolizmusban résztvevő enzimek expresszióját. Ez a negatív visszacsatolási hurok megakadályozza az LTB₄ túlzott felhalmozódását és mérsékli a gyulladásos válasz terjedését és intenzitását⁶³.

1.5. Genetikailag kódolt fluoreszcens bioszenzorok

A zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) és a biolumineszcens aequorint először 1962-ben Shimoura és munkatársai izolálták az *Aequorea victoria* medúzából⁶⁴. A következő mérföldkővet az *Aequorea victoria* GFP-jének klónozása, majd jelző molekulaként való első felhasználása jelentette 1992-ben, valamint 1994-ben^{65,66}. Ezt követően számos munkacso-

port kezdett foglalkozni a fluoreszcens fehérjék fizikai és kémiai tulajdonságaival. Ennek köszönhetően a következő években különböző gerjesztési és emissziós spektrummal rendelkező fluoreszcens fehérjék széles skáláját fedezték fel. Mára a fluoreszcens mikroszkópok folyamatos fejlődése révén a fluoreszcens bioszenzorok alkalmazása az alap kutatás szerves részévé vált. A fluoreszcens fehérjéken alapuló módszereket rendszeresen használják többek között nukleinsavak, sejtorganellumok és szövetek jelölésére, fehérjék sejten belüli lokalizációjának és interakcióinak vizsgálatára, valamint az egyes ionok és ligandok koncentrációváltozásainak meghatározására⁶⁷.

A genetikailag kódolt fluoreszcens bioszenzorok két részből állnak; tartalmaznak egy a vizsgált ligandot érzékelő egységet (sensing unit) és egy jellemzően fluoreszcens fehérjéből álló jelző egységet (reporter unit). A szenzorok működésének alapját az érzékelő egység és az érzékelt vegyület közötti kapcsolat kialakulása képezi. Ez az érzékelt anyag lehet egy ion, egy enzim szubsztrátja, de akár egy GPCR receptor ligandja is. A kötődést követően az érzékelő egység szerkezetében bekövetkező változás konformációváltozást idéz elő a fluoreszcens jelző egységben. Ez a detektálható változás legtöbbször a fluorofórok intenzitásában, excitációs vagy emissziós spektrumuk eltolódásában nyilvánul meg. Egyedi esetekben az érzékelő egység változása a jelző fluorofór lebomlását, vagy transzlokációját is előidézheti^{68,69}.

1.5.1. A fluoreszcens bioszenzorok érzékelő alegysége

A bioszenzorok érzékelő alegységét természetes és szintetikus fehérjék alkothatják⁶⁸. Napjainkban a szenzorfejlesztésben alkalmazott fehérjék között több tartozik a bakteriális eredetű periplazmikus kötő fehérje (PBP), szolubilis kötő fehérje (SBP) (5.a ábra) és G-fehérje-kapcsolt receptor (GPCR) (5.b ábra) proteincsaládokba. Ezen fehérjék előnyös tulajdonsága, hogy ligandkötés során, mindben erőteljes konformációváltozás megy végbe⁷⁰⁻⁷². A PBP és SBP fehérjén alapuló szenzorok, mint a glutamát érzékelő iGluSnFR vagy a glicin specifikus GlyFS, szolubilis mivoltuk révén különböző sejtkompartmentekben is kifejezhetőek. Ezzel ellentétben a GPCR alapú szenzorok, mint például a dopamin specifikus dLight, vagy az általunk fejlesztett GEM-LTB₄ a sejtek plazmamembránjához kötött formában találhatók meg⁷³⁻⁷⁶. Bár lokalizációjuk kötött, a GPCR-ek szenzorfejlesztésben való alkalmazása több előnyt is rejt magában. A fehérjecsalád a transzmemb-

rán fehérjék egyik nagy családjaként neurotranszmittereket, különböző hormonokat és kemokineket kötő receptorokat is tartalmaz. A széles ligandkötési spektrum mellett, a GPCR alapú bioszenzorokban lévő konformációváltozásra fluoreszcencia intenzitás növekedéssel reagáló cirkulárisan permutált fluoreszcens fehérjék (cpFP) alkalmazásával érzékeny, egyetlen fluoreszcens fehérjén alapuló, jó detektálhatósággal rendelkező bioszenzorok fejleszthetőek^{71,76}. A feszültség-érzékelő domének (VSD) (5.c ábra) és a ciklikus nukleotid kötő domének (CNBD) (5.d ábra) szintén alkalmasak szenzorfejlesztésre^{77,78}. Az elmúlt években több különböző fajból származó CNBD alapú cAMP szenzor került fejlesztésre, melyek közül a legújabb egy FRET-alapú cAMP szenzor, a cAMPFIRE⁷⁸.

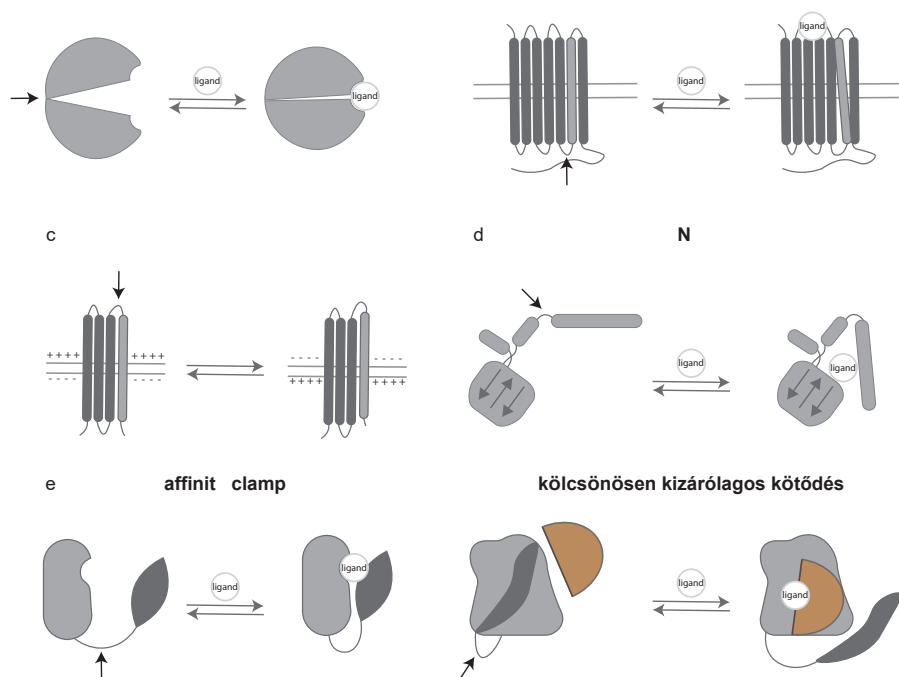
A teljes fehérjék és domének mellett, például a hő és feszültség-szenzitív rövidebb peptidek, a donor és az akceptor fluorofórok összekapcsolása révén, egyaránt alkalmazhatóak FRET-alapú szenzorok létrehozására. Kis peptideket tartalmaznak a proteázok vizsgálatára használt bioszenzorok is, mint például az apoptotikus kaszpázok enzimaktivitás mérésére fejlesztett FRET-alapon működő fluoreszcens szubsztrátok^{79–81}.

A szenzorok érzékelő egységének másik csoportját a szintetikus fehérjék képezik, melyek legtöbbször a természetben fellelhető fehérjedoménokból tevődnek össze⁶⁸. A szintetikus fehérjék egyik típusa az úgynevezett affinity clamp szenzorok, ezek két doménből állnak, melyek stimulust követően reverzibilisen, fogó szerűen kapcsolódnak egymáshoz (5.e ábra). Az affinity clamp szenzorok jellegzetes képviselői a GCaMP kalcium szenzorok, amik a calmodulin fehérjéből és a miozin könnyű lánc-kináz calmodulin kötő részéből vagy a calmodulin kináz II-ből állnak. A GCaMP-ek legfrissebb változata a GCaMP8, amely szenzitivitása és kötési kinetikája révén, ezredmásodperces időtartományban tudja jelezni a kalcium koncentráció változását⁸².

Az affinity clamp elvén alapuló bioszenzorok, a kalcium koncentrációk detektálása mellett, enzimek kináz vagy foszfatáz aktivitásának mérésére is alkalmasak. Ebben az esetben a szenzorok egy enzimre specifikus szubsztrátot és a foszforilált aminosavat kötni tudó PAABD doménből állnak, amik foszforilációra kapcsolódnak egymáshoz. A legtöbb enzimaktivitást vizsgáló bioszenzor FRET alapon működik, de mára egyetlen fluoreszcens fehérjén alapuló szenzorok is megjelentek, például az ExRai-AKAR2, amit a protein kináz A aktivitásának mérésére hoztak létre^{83–85}.

Alternatív módszer a kompetitív kötődésen alapuló szenzor egységek alkalmazása,

ahol a vizsgált ligand egy a szenzorhoz kötődő másik kötő partnerrel áll versenyben (5.f ábra). A pszeudoligand lehet természetes, mint a RasAR szenzor esetén, vagy mesterséges, mint amit a CoA-Snifit vagy a LOCKR rendszerekben használnak^{86,87}.



5. ábra. A genetikailag kódolt bioszenzorok érzékelő egységei.

a) A szolubilis periplazmikus kötő fehérje (PBP) működésének sematikus ábrája. **b)** A G-fehérje-kapcsolt receptor (GPCR) működési elve. **c)** A feszültség-érzékelő domének (VSD) a membránpotenciál megváltozására konformációváltozáson mennek keresztül. **d)** A ciklikus nukleotid kötő domének (CNBD) a ciklikus nukleotidok, mint például a cAMP kötésére képesek. A szintetikus érzékelő egységek közül az **e)** affinity clamp esetén a két domén fogószerűen zárja közre ligandját a kötődés során, míg a **f)** kölcsönösen kizárólagos kötődés alapját az egymással kompetitíven kötődő fehérjék közötti verseny képezi. Az ábrákon a fekete nyíl a jelző egység lehetséges beillesztési helyét jelzi. Az ábra a ⁽⁶⁸⁾ közlemény alapján készült.

1.5.2. A fluoreszcens jelző alegységek fajtái

A jelző egységek közül szintén két csoportot különböztethetünk meg. A fluoreszcens fehérjéken és a szintetikus fluorofórokon alapuló bioszenzorokat⁶⁸. A fluoreszcens fehérjék

két különböző módon jöhetnek létre, a fehérje vagy tartalmaz egy érett kromofór régiót, vagy a fluoreszcenciát egy kötődő kofaktor hozhatja létre.

A fluoreszcenciát adó kromofór, mint a GFP esetében is, poszttranszlációs úton egy autokatalitikus folyamat során keletkezik, oxigén függő módon⁸⁸ (6.a ábra). A folyamat három részből áll, egy ciklikus gyűrű kialakulásából, annak dehidratációjából, majd három aminosav oxidációjából.⁸⁹ Az érett kromofórral rendelkező fehérjéket tartalmazó bioszenzorok közül a zöld-sárga tartományba esők között találjuk a legnagyobb alap intenzitással bírót. Ilyen például, az mNeonGreen fehérjét tartalmazó NEMO kalcium szenzor⁹⁰. A fényerő mellett a szenzorok alkalmazhatóságát a bennük lévő fluoreszcens fehérjék fotostabilitása és érési ideje is meghatározza. A fehérje fotostabilitása adja meg, hogy a gerjesztő fény hatására mikor következik be a fotobleaching, azaz a fluoreszcencia képességének irreverzibilis elvesztése. A kedvező fotostabilitás elengedhetetlen a hosszú ideig tartó képalkotási kísérletekben. A kromofór érési ideje szintén a fehérje fontos paramétere. A GFP kromofór érése több órát vehet igénybe, ami a gyorsan zajló folyamatok, mint például azonnali génexpressziók vizsgálata, vagy a protein degradáción alapuló mérések esetében hátrányt jelent. A GFP mutációjával létrehozott enhanced zöld fluoreszcens fehérje (EGFP) és annak cirkulárisan permutált verziója minden paraméterben jobban teljesít elődjénél⁸⁹.

Napjainkban ezen fluorofór tulajdonságok optimalizálása tovább folytatódik, fotostabilitás terén érdemes megemlíteni az mGold fehérjéket, míg az érési idő javulását az Achilles néven elnevezett fluoreszcens fehérje esetében figyelhetjük meg^{91,92}. A vörös tartományban működő fluorofór fehérjék, különösen az infravörös tartomány elérése nagy előrelépést jelent a mélyszöveti képalkotás területén.

Bár az érett kromofórral rendelkező fehérjék között találunk a vörös tartományban fluoreszkáló darabokat, mint például az mCherry vagy az mKate2, a 700 nm hullámhosszhoz közeli infravörös tartomány eléréséhez már biliverdin alapú fluoreszcens fehérjéket vagy hibrid technikákat kell alkalmaznunk^{93,94}.

A fluoreszcens fehérje fluoreszcenciája származhat egy endogén celluláris kofaktor, mint a már említett biliverdin kötődéséből is⁹⁵ (6.b ábra). Ebben az esetben a fehérje érése nem oxigénfüggő módon megy végbe, viszont a fluoreszcencia kialakulásához a kofaktor jelenléte elengedhetetlen. Előnye még, hogy méretében kisebb a tradicionális fluoresz-

cens fehérjéknél, valamint a már említett biliverdin kofaktorról működő fehérjék képesek a távoli vörös, és az infravörös tartomány közelében fluoreszkálni^{96,97}. Ezek az infravörös fluoreszcens fehérjék (iRFP) már több bioszenzorban megjelentek⁹³. Alkalmazzák őket FRET donor és akceptor molekulaként, mint például a mRFP670-et és mRFP720-et a kalcium szenzor iGECI, vagy a Rac1 GTPáz, kináz NIR Rac1 bioszenzorok esetén^{98,99}. Az iRFP-k használata, bár sok előnnyel bír, az endogén biliverdintől való függés bizonyos esetekben korlátozó tényező lehet. Olyan mérési körülmények között, ahol a kofaktor limitáltan vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, mint a különböző sejtkultúrák vagy a *Drosophila* esetében, a biliverdin rendszerhez adása vagy a kofaktor képződését elősegítő hem-oxidáz koexpressziója javasolt⁹³.

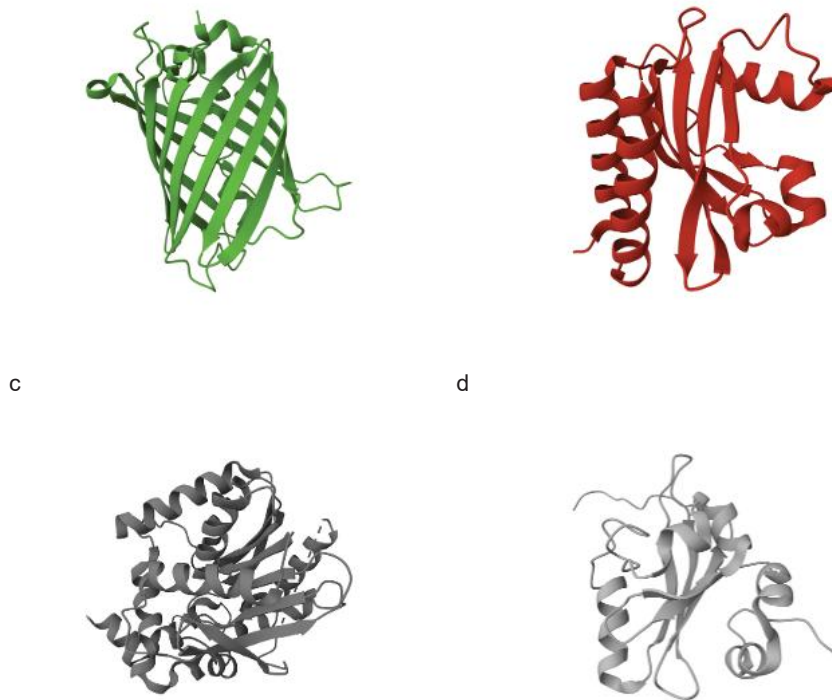
Az infravörös tartomány elérése hibrid rendszereken alapuló bioszenzorok alkalmazásával szintén lehetséges. Ezekben a bioszenzorokban a mért jel, a természetes biológiai folyamatok megzavarása nélkül, bioortogonális konjugáció révén szintetikus fluorofórok közvetítésével jön létre¹⁰⁰. A bioszenzorokban leggyakrabban használt kovalens kötésen alapuló rendszer egy kis méretű fehérje domént, úgynevezett önjelölő fehérje (SLP) taget tartalmaz, amely specifikus kovalens kötést hoz létre kémiai ligandjával, kialakítva a mért fluoreszcens jelet. Az SLP tagek közé tartozik a benzilguanint kötő SNAP tag, vagy a klóralkánnal kölcsönható HaloTag^{101,102} (6.c ábra). Az SLP tag alapján működő bioszenzorok, az endogén fluorofórokhoz hasonlóan, mind Fröster-féle energia transzfer (FRET) akceptor és donor párként, mind pedig egyetlen fluorofóron alapuló rendszerként alkalmazhatóak⁶⁸. SLP tag alkalmazásával működnek például a HaloTag cirkuláris permutációjával és a *Janelia* Fluor 635 szintetikus ligand alkalmazásával létrejött a távoli vörös tartományban működő HaloCaMP kalcium és a feszültségérzékelő HASAP és HArcLight bioszenzorok⁹⁴.

A kovalens kötésen alapuló rendszerekben a ligand és az SLP tag között kialakuló kötés irreverzibilis, ez azonban a nem kovalens rendszerekben nem áll fent. A nem kovalens kötésen alapuló bioszenzorokban a szintetikus fluorofórok folyamatosan cserélődhetnek, ezzel növelve a szenzorok fotostabilitását. A leggyakrabban használt nem kovalens hibrid rendszer a fluorogén aktiváló fehérje (FAP) alapú fluoreszcens aktiváló és abszorpcióeltoló tag (FAST)¹⁰³ (5.d ábra). Ez a 14 kDa méretű fehérje hidroxibenzilidén rodaninokat köt meg, amelyek csak akkor válnak fluoreszcenssé, miután a FAST fehérjéhez kötődtek. A

HaloTag-hez hasonlóan a FAST cirkulárisan permutált változatával készült már kalcium szenzor, de ezen a rendszeren alapuló bioszenzorok alkalmasak a tranziens fehérje-fehérje kölcsönhatások és a sejtciklus vizsgálatára is^{104–106}. A hibrid bioszenzorok alkalmazása több előnnyel is jár: intenzitásuk és fotostabilitásuk képes meghaladni az endogén szenzorokét, nincs érési idejük, valamint az egyes bennük megjelenő fluorofórok a távoli vörös tartományban működnek. A hibrid rendszerek hátrányát az exogén módon adagolt fluoreszcens ligandok képezik, melyek penetrációs és diffúziós képességei limitálhatják az alkalmazható modellorganizmusok számát, ezen felül a nem kötött formában jelenlévő ligand és az aspecifikus kötődés ronthatja a jel-zaj arányt⁶⁸.

érett kromofórral rendelkező

kofaktor függő FP



6. ábra. A genetikailag kódolt bioszenzorok jelző egységei.

a) Érett kromofórral rendelkező fluoreszcens fehérjék, mint például az EGFP. Az EGFP kristályszerkezete (PDB ID:6YLQ) **b)** A biliverdin kofaktor függő közel infravörös fluoreszcens protein miRFP670nano szalagmodellje (PDB ID: 6MGH) **c)** A szintetikus önjelölő fehérje (SLP) HaloTag7 szerkezeti rajza (PDB ID:8B6N). A HaloTag7 kovalensen kötődik a klóralkán alapú fluoreszcens ligandjaihoz. **d)** A fluorogén aktiváló fehérje (FAP) és szintetikus ligandja közötti nem kovalens kötés hozza létre a mért fluoreszcens jelet. A FAP kristályszerkezete (PDB ID:7AVA). Az ábra a ⁽⁶⁸⁾ közlemény alapján készült

1.6. A zebraahal mint modellorganizmus

A zebradániókat (*Danio rerio*) mint a genetikai kutatásokhoz használható gerinces állatmodellt Streisinger György munkássága tette ismertté az 1970-80-as években¹⁰⁷. A 2000-es évek elején a humán és a zebraahal referencia genomok meghatározása, azok 70 %-os megegyezése révén a zebradániók tudományos alkalmazási területei egyre szerteágazóbbak lettek^{108,109}. Napjainkban ezen kisméretű édesvízi halak, az egyedfejlődésen át a tu-

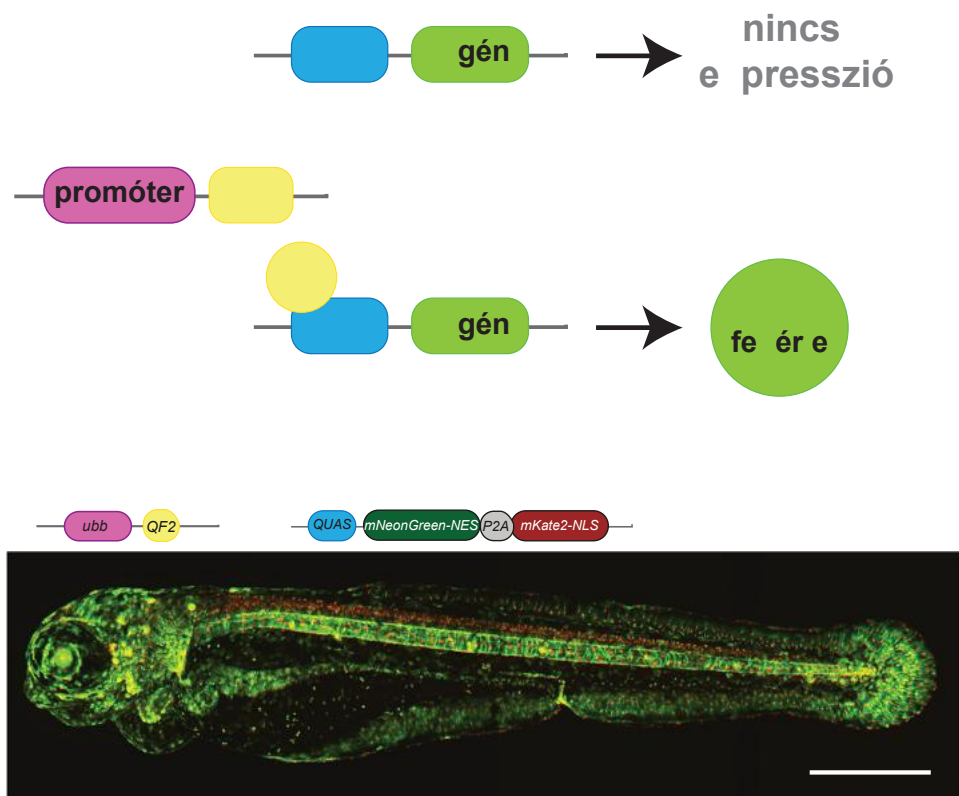
morbiológián és toxicitási vizsgálatokon keresztül, egészen a veleszületett immunrendszer tanulmányozásáig elfogadott modellorganizmusként jelennek meg^{110–112}.

A zebrahalak népszerűsége számos előnyös tulajdonságuknak köszönhető. Egy zebra-hal pár egyetlen ivatáskor több száz megtermékenyített ikrát képes világra hozni, melyek a modern technológia révén egysejtes állapotban könnyen génmódosíthatóak. Lárvaik transzparenssek, így mikroszkópiára alkalmasak, valamint veleszületett immunrendszerük három-négy napos korukra kialakul. A zebrahalak generációs ideje szintén kedvező; körülbelül három hónap alatt érik el az ivarérett kort, és állatházi körülmények között másfél-két éves korukig megőrzik termékenységüket.

Az első fluoreszcensen jelölt proteineket expresszáló zebrahalakat 1997-ben hozta létre a Lin kutatócsoport. A *GATA-1* vörösvértest specifikus promóterrel meghajtott zöld fluoreszcens fehérjét egysejtes állapotban a zebrahal embriók genomjába injektálták. Később az így létrehozott egyedek keresztezése útján tovább örökítették a bejuttatott gént az F1 és F2 generációkra¹¹³. Az első GFP-t expresszáló neutrofilekat hordozó vonalra 2006-ig, míg a fluoreszcensen jelölt makrofágokat tartalmazó egyedekre 2010-ig kellett várni^{114,115}.

A Tol2kit rekombinációs rendszer kifejlesztése stabilabbá tette a transzgenezis folyamatát. A mikroinjektálást követően több egyedben, erősebb fluoreszcencia intenzitással jelentek meg a bevitt fehérjék, az F0 generációra jellemző mozaikos kifejeződési mintázat mértéke szintén lecsökkent¹¹⁶. A Tol2kit rendszer lehetőséget biztosít, már nemcsak a sejt-specifikus fluoreszcens jelölésre, de nagyobb fluoreszcens tag-gel ellátott fehérjék és különböző bioszenzorok, mint a kalciumindikátor GCaMP erőteljesebb expressziójára³². A transzkripciós faktor és promóter párokon alapuló GAL4-UAS és QF2-QUAS rendszerek zebrahalakra adaptálása lehetővé tette a GPCR alapú bioszenzorok, mint a GRAB, dLight, és az általunk fejlesztett GEM bioszenzorok sejtspecifikus alkalmazását^{75,76,117} (7.a és b ábra).

Egyes fehérjék hiányának vizsgálata szintén lehetséges. A teljes egyedben a vizsgált protein mRNS-ének blokkolása szintetikus, úgynevezett morpholino nukleotid szekvenciákkal, míg a szövetspecifikus génkiütés a CRISPR-Cas9 rendszer alkalmazásával valósítható meg^{118,119}.



7. ábra. A QF2-QUAS rendszer működési elve.

a) A QUAS promóter régió a kifejezni kívánt gén előtt helyezkedik el. A génexpresszióhoz a QF2 transzkripciós faktor jelenléte elengedhetetlen, a fehérje hiányában nem történik meg a génátíródás. A QF2 szekvencia előtti promóter régió segítségével a QF2 fehérje és így a kifejezni kívánt fehérje sejtspecifikusan fejezhető ki a modellorganizmusokban. Az ábra a ⁽¹²⁰⁾ közlemény alapján készült. **b)** A QF2-QUAS rendszer működése három napos zebrahal lárvában. Az ubiquitin promóterrel meghajtott QF2 expresszió révén a lárv minden szövetében megjelennek az mNeonGreen zöld és mKate2 piros fluoreszcens fehérjék¹²¹, skála=100 μ m.

2. Célkitűzések

Az LTB_4 egy leukociták által termelt lipid mediátor, mely kemoattraktáns hatása révén gyulladásos folyamatokban, elsődlegesen a neutrofil granulociták kemotaxisának irányításában tölt be kiemelkedő szerepet. Bár az LTB_4 jelátviteli útvonalait és hatásmechanizmusait részletesen feltárták, a steril szöveti sebzést követő szerepe, valamint az aktivált neutrofil granulociták által termelt LTB_4 felszabadulásának, koncentrációjának dinamikus változása és a mediátor szöveti eloszlása kevéssé ismert: nem tisztázott, hogy fehérvérsejtekből felszabadulva milyen messze diffundál és milyen távoli sejtekre hat.

Ezek alapján kutatásunk céljai a következők voltak:

- Egy LTB_4 detektálására alkalmas fluoreszcens bioszenzor létrehozása és karakterizálása, mely specifikusan és nagy érzékenységgel jelzi a mediátor molekula jelenlétét.
- Az izolált egér neutrofilekből fMLP hatására felszabaduló LTB_4 valós idejű kimutatása a bioszenzort expresszáló stabil sejtvonal alkalmazásával.
- Az LTB_4 bioszenzort transzgenikusan kifejező zebrahal egyedekben az exogén LTB_4 diffúziós gradiensének detektálása, valamint a neutrofilekből sérülést követően felszabaduló endogén LTB_4 vizualizációja.

3. Módszerek

3.1. Plazmid konstrukciók létrehozása

Az LTB₄ szenzor prototípusok alapját képező, LTB₄-re nagy affinitással és specifitással rendelkező BLT1 fehérjét kódoló szekvenciát perifériás vérből származó humán mononukleáris sejtek cDNS-éből sokszoroztuk fel polimeráz-láncreakció (PCR) alkalmazásával, majd illesztettük be a pEGFP-N1 (Clontech) plazmid XhoI és HindIII restrikciós enzim hasítási helyei közé.

A BLT1 N-terminális fúzióját zöld fluoreszcens fehérjével úgy valósítottuk meg, hogy először a BLT1-et a pmScarlet-N1 vektorba klónoztuk. Ezután az így kapott plazmidban a piros fluoreszcens mScarlet fehérjét az AgeI és BsrGI restrikciós enzimek segítségével a zöld fluoreszcens fehérjére cseréltük.

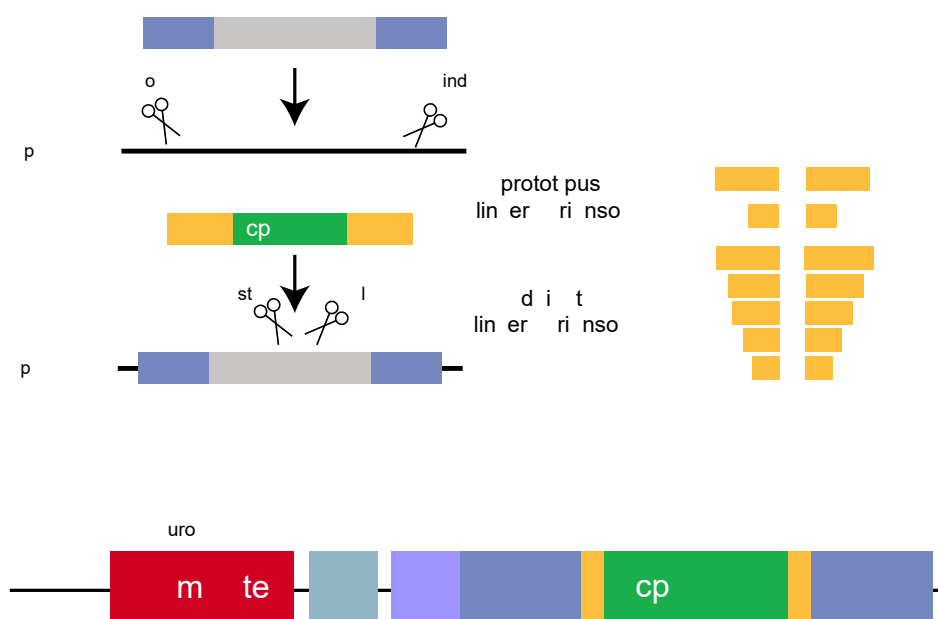
A szenzorvariánsok létrehozása során különböző aminosav összetételű és hosszúságú linker régiók használatával illesztettük be a konformációváltozásra érzékeny cpEGFP-t a BLT1 harmadik intracelluláris hurokrégiójának közepén található arginin (212R) és fenilalanin (213F) aminosavak közé. Ehhez a folyamathoz a beillesztésre kijelölt hely N és C-terminális végein silent mutációkkal kialakított egyedi PstI és SalI restrikciós enzim hasítási helyeket használtuk. Az első prototípusok esetében a hosszú LSSLE, valamint a rövid GG aminosavakból álló linker régiókat és azok különböző kombinációit alkalmaztuk, majd a későbbi variánsok esetén a cpEGFP-t N-terminális oldalról LSSLI, míg C-terminális oldalról NHDQL aminosavakat tartalmazó kapcsolórégiókkal, és ezen linkerek rövidebb, akár egyetlen aminosavra lecsökkentett hosszúságú, változatainak permutációival vettük közre (8.a ábra).

A GEM-LTB₄ mutáns verziójában a BLT1 fehérje 156. argininjának alaninra való cseréjével gátoltuk az LTB₄ szenzorhoz való kötődését¹²².

Mind a GEM-LTB₄, mind annak mutáns verziójának esetében a fehérje plazmamembránba való lokalizációjának növelésére a szenzorok N-terminális végét egér immunglobulin kappa lánc (Igκ) lokalizációs szekvenciájával (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD) fuzionáltuk¹¹⁷.

A stabil sejtvonalak létrehozásához alkalmazott végleges plazmidkonstrukciók kiegészültek egy membrán-targetált normalizációs szignállal. Ezt a funkciót az Lck fehérjéből

származó, plazmamembrán-lokalizációt meghatározó MGCVCSSNPENNNN szekvenciával ellátott mKate2 piros fluoreszcens fehérje látta el. A normalizációs szignál és a szenzorok 1:1 arányú koexpresszióját a két fehérje az eukarióta genomba való beépülést lehetővé tevő pSB-CMV-MCS-Puro vektorban ugyanazon promóter mögött való elhelyezkedése, valamint a fehérjék közé behelyezett P2A virális, úgynevezett ribosome-skipping szekvencia biztosította¹²³ (8.b ábra).



8. ábra. Az LTB_4 szenzor prototípusok létrehozása. **a)** A szenzor prototípusok létrehozása során először a humán $BLT1$ receptort az $XhoI$ - $HindIII$ enzimek használatával behelyeztük a $pEGFP-N1$ plazmid vektorba. A következő lépésben a $BLT1$ receptor harmadig intracelluláris hurokéjába illesztettük a $cpEGFP$ -t, amihez különböző hosszúságú linker régiókat alkalmaztunk. A használt N és C-terminális linker régiók az ábra jobb oldalán láthatók. **b)** A stabil sejtvonalak létrehozásához használt plazmidkonstrukció sematikus ábrája. Az összefoglaló ábra a ⁽⁷⁶⁾ közlemény alapján készült.

A sejtvonalak megalkotásakor a SB100x Sleeping Beauty transzpozáz enzimet, és a Sleeping Beauty transzpozon vektor IR/DR szekvenciái közé beillesztett CMV promótert, az általunk kifejezni kívánt szenzorfehérjét és a szelekciós markerként szolgáló puromicin-rezisztenciát kódoló génszakaszt tartalmazó plazmidokat használtuk fel.

A GEM-LTB₄ jelátviteli tulajdonságainak vizsgálata során használt pEGFP-N1 NES-jRGECO1a az Addgene-től származott (CAT#:1052161563), míg a pEYFP-N1 β -arrestin-2-mScarlet plazmid Dr. Turu Gábor ajándéka volt.

A zebrahal transzgenezishez alkalmazott plazmidok a Tol2kit rendszer¹¹⁶ alkalmazásával, gateway klónozással készültek el. A rekombinációs klónozás során három belépő (entry) vektort építettünk be a lambda fágból származó *att* rekombinációs szekvenciák mentén a pDestTol2 célvektorba, melyek közül a p5E a kívánt promótert, a pME a kifejezni kívánt fehérjét, míg a p3E a transzkripció stabilitásának biztosítása érdekében egy poli-A szignált tartalmazott. A használt pDestTol2 plazmidok mindegyike, a transzgenikus egyedek azonosításának segítésére, tartalmaztak egy *cmlc2* szívspecifikus promóter által meghajtott fluoreszcens szelekciós marker szekvenciát.

A GEM-LTB₄ és mutáns verziójának megfelelő intenzitású expresszióját a QF2-QUAS rendszer¹²⁰ használata tette lehetővé. Az alkalmazott rendszer két komponensből áll, egy szövetspecifikus promóterből, ami a QF2 transzkripciós aktivátor átírását serkenti, valamint a kifejezendő fehérje előtt megtalálható QUAS enhancer régióból, ami a QF2 DNS-kötő helye (7.a ábra).

3.2. LT_{B4} szenzor prototípusok tesztelése

A kísérletekben használt humán embrionális vese sejtvonal 293A altípusát (HEK293A) a ThermoFisher (CAT#:R70507) cégtől rendeltük. A sejteket 10 % -os FBS-sel, 50 U/ml penicillinnel és 50 μ g/ml streptomycinnel kiegészített magas glükóz tartalmú DMEM médiumban tartottuk fent, 37°C-os hőmérséklet és 5 % -os szén-dioxid koncentráció mellett.

A szenzorvariánsok tesztelése során, a HEK293A sejteket 30.000 sejt/well koncentrációban poli-D-lizinnel kezelt μ -slide 8-well platere (Ibidi) tapasztottuk le és a fent leírt, komplett DMEM médiumban inkubáltuk őket 16-24 órán keresztül. Az inkubációt követően, a sejtekbe a különböző szenzor konstrukciókat kódoló plazmidokat lipofectamine 2000 (ThermoFisher) liposzóma-formáló reagens segítségével juttattuk be. A gyártó által ajánlott protokollnak megfelelően a transzfekciót szérummentes DMEM-ben végeztük. Szélesztő felületre vetítve minden 2,5 cm²-re 1 μ l lipofectamine 2000 reagenst és 500 ng plazmidot alkalmaztunk, amit 6 óra után komplettált médiumra cseréltünk.

A mikroszkópos méréseket 16-24 órával a transzfekciót követően végeztük el, melyek

megkezdése előtt a sejteken a komplett médiumot extracelluláris médiumra (EC) cseréltük (3,1 mM KCl, 133,2 mM NaCl, 0,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgSO₄, 5 mM Na-HEPES, 2 mM NaHCO₃, 1,2 mM CaCl₂, 2,5 mM glükóz). Az EC médium puffer összetétele úgy lett kialakítva, hogy a HEK293A sejtek életben maradjanak szobahőmérsékleten és csökkentett szén-dioxid koncentrációban, miközben a mérések során nem befolyásolja a fluoreszcens jelek észlelését, köszönhetően a puffer transzparens mivoltának.

A mikroszkópos mérések alatt, a két perces alapvonal felvételét követően 100 nM LTB₄-gyel stimuláltuk a különböző szenzorvariánsokat expresszáló HEK293A sejteket és további két percig monitoroztuk a ligand hatására bekövetkező fluoreszcencia intenzitásváltozásokat.

3.3. A GEM-LTB₄-et stabilan expresszáló HEK293A sejtvonal létrehozása

A karakterizálás során használt, GEM-LTB₄-et, vagy annak mutáns verzióját a membránba targetált mKate2 fluoreszcens proteinnel 1:1 arányban stabilan koexpresszáló HEK293A sejteket a Sleeping Beauty transzpozáz rendszer használatával hoztuk létre¹²⁴. A plazmidok kotranszfekcióját követő 48 órás inkubáció során a transzpozáz enzim a kifejezni kívánt fehérjék kódoló régióit, valamint az antibiotikum-rezisztenciáért felelős gént több kópiában, véletlenszerűen integrálta a sejtek genomjába. Az inkubációs idő leteltével a sejtek szelekcióját két héten keresztül 2 µg/ml puromicinnel (Sigma-Aldrich, CAT#:P8833-25MG; CAS:58-58-2) kiegészített komplett médiummal végeztük. A továbbiakban a kívánt fehérjéket nagy mennyiségben expresszáló sejteket BD FACSAria™ III áramlási citométerrel válogattuk ki, 488 és 561 nm-es excitációs, valamint 530/30 és 670/30-as emissziós hullámhossz beállítások mellett.

3.4. A GEM-LTB₄ karakterizálása HEK293A sejtekben

A BLT1 és a GEM-LTB₄ jelátviteli útvonalainak összehasonlítása a HEK293A sejtekben megjelenő kalcium szignalizáció, valamint a receptor aktivitást követő β-arrestin-2 mediált internalizáció megfigyelésével történt.

A BLT1-EGFP-t és a GEM-LTB₄-et, a piros fluoreszcens kalcium indikátor jRGE-

CO1a-val vagy az N-terminálisan mScarlet piros fluoreszcens fehérjével jelölt β -arrestin-2 fehérjével kotranszfektáltuk HEK293A sejtekbe. A mikroszkópos mérések során a három perces alapvonal felvétele után a sejteket 100 nM LTB₄-gyel kezeltük. Az ezt követő percekben a jRGECO1a citoplazmatikus kalciumszintemelkedésre bekövetkező fluoreszcencia intenzitásváltozásait, vagy a β -arrestin-2 a citoplazmából a plazmamembrán felé irányuló transzlokációját követtük nyomon. A kalcium assay során a kalcium szenzor jRGECO1a maximális válaszképességét a mérés utolsó perceiben alkalmazott 10 μ M koncentrációjú kalciumionofórként funkcionáló ionomycin (Cayman Chemical, CAT#:10004974; CAS:56092-81-0) stimulussal határoztuk meg.

A szenzor specificitásvizsgálata közben, a GEM-LTB₄-et stabilan kifejező sejteken 3 perces alapvonal felvétele után a sejteket az LTB₄-hez molekulaszervezetileg hasonló arachidonsav származékokkal stimuláltuk 100 nM-os végkoncentrációban 3 percen keresztül¹²⁵. A kísérletben felhasznált eikozanoidok a következők voltak: arachidonsav (AA) (Cayman Chemicals, CAT#:90010; CAS:506-32-1), 5-oxo-eikozatetraénsav (5-oxo-ETE) (Cayman Chemicals, CAT#:34250; CAS:106154-18-1), 5(S)-hidrox-eikozatetraénsav (5(S)HETE) (Cayman Chemicals, CAT#: 34230; CAS:70608-72-9), 12(S)-hidrox-eikozatetraénsav (12(S)HETE) (Cayman Chemicals, CAT#:34570; CAS:54397-83-0) és a 20-hidrox-eikozatrién B₄ (20-OH-LTB₄) (Cayman Chemicals, CAT#:20190; CAS:79516-82-8).

A dózis-hatás görbe felvétele során a GEM-LTB₄-et vagy annak mutáns verzióját kifejező sejteket egy-két perces alapvonal felvétele után egyszeri 1-10-100 pM, 1-5-10-25-50-100-250 és 500 nM, valamint 1 μ M végkoncentrációban kezeltük LTB₄-gyel, majd további 2 percig monitoroztuk a szenzorokban bekövetkező intenzitásváltozás mértékét. A szekvenciális LTB₄ adagolás során az alapvonal felvétele után 3 perces időközönként 1-10 majd 100 nM végkoncentrációra növeltük a stimulus mértékét. A szenzorválasz gátlhatóságának tesztelésére a 100 nM-os LTB₄ stimulust követő 2. percben 1 μ M mennyiségben CP-105,696 (Sigma-Aldrich, CAT#:PZ0363; CAS:158081-99-3) vagy BIIL 260-hidroklorid (Sigma-Aldrich, CAT#:SML2286; CAS:204974-93-6) BLT1 kompetitív antagonistákkal kezeltük a szenzort expresszáló sejteket^{38,126}.

Az LTB₄ GEM-LTB₄-hez való kötődésének és a szenzor ismételt aktiválhatóságának vizsgálata során, az alapvonal felvétele után egy általunk tervezett perfúziós rendszeren

keresztül, 2 percig 100 nM mennyiségben áramoltattunk LTB₄-et a stabilan expresszáló HEK293A sejtvonalra, mely stimulust egy két perces EC1 médium perfúzióval szüntettünk meg. Amint a szenzorintenzitás újra elérte a mérés elején felvett alapvonal értékét, újbóli 100 nM-os LTB₄ stimulusnak vetettük alá a sejteket. Az egyszeri 100 nM-os ligand stimuláció szenzor fluoreszcenciára gyakorolt hosszabb távú hatását, percenkénti mintavétellel egy hatvan percen keresztül tartó mérésben vizsgáltuk.

A különböző pH értékkel rendelkező oldatok a szenzor fluoreszcenciájára és aktiválhatóságára gyakorolt hatásának tanulmányozását, a plazmamembrán átjárhatóságának elősegítéséért, 5 µg/ml nigericinnel és 5 µM monensinnel kiegészített intracelluláris médiumban (IC) (125 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,2 mM K-EGTA) végeztük. A GEM-LTB₄-et stabilan expresszáló sejteken a mikroszkópos mérés kezdete előtt 10 perccel a komplett DMEM médiumot 7,4-es pH-jú IC-re cseréltük. A mikroszkópos mérés során a két perces alapvonal felvétele után különböző pH értékű IC médiumot áramoltattunk át a sejteken és további 2 percen keresztül monitoroztuk a szenzorban bekövetkező fluoreszcencia intenzitásváltozást. A perfúzióhoz használt pH értékek és annak elérésére alkalmazott puffer vegyületek a következők voltak: pH 6,2-6,6 esetén MES, pH 7,0 esetén MOPS, pH 7,4-7,8 esetén HEPES míg pH 8,2-8,6 esetén TRIS reagenst használtunk. Ahhoz, hogy meghatározzuk a környezet pH értékének a szenzor LTB₄ stimulusra adott válaszában hatását, a szenzor sejteket expresszáló sejteket 10 percen keresztül inkubáltuk a fent már említett pH értékeken, majd egyszeri 100 nM-os LTB₄ kezelésnek vetettük alá.

3.5. Egér neutrofilek izolálása és az fMLP hatására felszabaduló endogén LTB₄ mérése

Az endogén LTB₄ mérést célzó *ex vivo* kísérleteinkhez 6-12 hetes, vad típusú egér csontvelőből származó neutrofil granulocitákat használtunk. Az izolálást 20mM HEPES-t (Sigma-Aldrich, CAT#:H0887, CAS:7365-45-9) és fenolvöröst (Capricorn Scientific, CAT#:HBSS-2A) tartalmazó, kalcium- és magnézium mentes Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) oldattal végeztük. Az eljárás első lépéseként a femurból és a tibiából ki-mostuk a csontvelőt, majd 5 percen keresztül, 500 g-vel centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a sejt pelletet 5ml 0,2%-os NaCl oldatban vettük fel, mely 40 másodperces

inkubációs idő mellett lizálta a vörösvértesteket. A folyamatot az inkubációs idő letelte után 1,6%-os NaCl oldattal állítottuk le. A sejtörmelékek és az izolálás során megmaradt csontdarabkák eltávolítása érdekében 70 μm -es szűrőt használva tisztítottuk meg a mintát. A neutrofil granulociták egyéb fehérvérsejtektől való elkülönítése 62,5%-os Percoll (Sigma-Aldrich, CAT#:GE170891-02) gradiens centrifugálással (30 percig, 1300 x g-vel) történt¹²⁷. A szeparáció befejeztével az immunsejteket EC médiumban vettük fel.

Az aktivált neutrofilekből felszabaduló endogén LTB_4 szignálok detektálásához a GEM- LTB_4 -et stabilan expresszáló HEK293A sejtvonalunkat használtuk. A mérések 35 percig tartottak, melyekben a két perces szenzor alapvonal felvételt követően, a neutrofileket $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ -es sűrűségben helyeztük a szenzort expresszáló sejtvonal tetejére, majd azonnal aktiváltuk egy egyszeri 2 μM N-formilmethionin-leucin-fenilalanin (fMLP) (Sigma-Aldrich, CAT#:F3506, CAS:59880-97-6) stimulussal. Pozitív kontrollként, a szenzor fehérjék megfelelő működésének ellenőrzésére, a 30. percben 100 nM LTB_4 -et adtunk a sejtekhez. Negatív kontrollként a kísérletet a GEM- LTB_4 mutáns változatát kifejező alsó sejtréteggel szintén elvégeztük.

A neutrofil granulociták által fMLP hatására termelt LTB_4 mennyiségét, LTB_4 specifikus enzimhez kötött immunszorbens assay (ELISA) eljárással (Thermo Fisher Scientific, CAT#:EHLTB4), a sejtek felülúszójából határoztuk meg. A mérés során a neutrofilek mennyisége, valamint az fMLP stimulus koncentrációja és az azzal való inkubációs idő megegyezett a fentebb leírt kísérletben foglaltakkal.

3.6. Transzgenikus zebrahal vonalak létrehozása

Az általunk használt transzgenikus zebrahalvonalak létrehozását, valamint a zebrahal lárvákon végzett állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága és a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal engedélyezte (Engedélyszám: PE/EA/1027-7/2019).

A különböző genetikailag módosított vonalainkat vad típusú (AB), és pigmenthiányos mutációt hordozó Casper¹²⁸ típusú zebrahalak keresztezéséből származó ikrákon hoztuk létre. A transzgenikus egyedek megalkotása során 25-25 pg pDestTol2 vázzal rendelkező plazmid és Tol2 transzpozáz mRNS 100 mM-os kálium-kloridban oldott keverékét, 2,3 nl térfogatban mikroinjektáltuk az egysejtes állapotban lévő megtermékenyített embriók

citoplazmájába¹¹⁶. Az injektálási folyamaton átesett ikrákat E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, és 0,33 mM MgSO₄) médiumban neveltük 28 °C-os hőmérsékleten. Azok a lárvák, amelyek szívében 4 napos korukra mozaikosan megjelent az EGFP vagy az RFP fluoreszcens szelekciós szignál, felnevesztésre kerültek.

Az ivarérettséget elért egyedek utódainak fehérje expressziós mintázatának tesztelése után, a legerősebb jelet mutató founder (F0) egyedekből Casper típusú zebrahalakkal való keresztezés útján létrehoztuk a kísérletekben használt F1 generációkat. A felnőtt zebrahalakat 7,4 pH-val és 500 μ S elektromos vezetőképességgel rendelkező, a zebrahalak tartására alkalmas állványrendszer segítségével folyamatosan tisztán tartott vízben, 28 °C-os hőmérsékleten, valamint 14/10 órás fény-sötét ciklus mellett tartottuk¹²⁹.

A mikroszkópiára szánt zebrahal lárvákat 24 órával a megtermékenyítést követően 1% 1-fenil-2-tiokarbamidot (PTU) (Sigma-Aldrich, CAT#:P7629-10G , CAS:103-85-5) tartalmazó E3 oldatba helyeztük át. A PTU jelenléte gátolta a lárvák melanogenezisét, megakadályozva az erősen autofluoreszcens pigmentek képződését¹³⁰. A kísérletekben felhasznált 3-4 napos zebrahal lárvákat a QF2 fehérjét expresszáló Tg(*krt4*:QF2, Tg(*krtt1c19e*:QF2), Tg(*itgalla-cFos*:QF2)) és a QUAS promótert tartalmazó Tg(QUAS:PM-mKate2-P2A-GEM-LTB₄), Tg(QUAS:PM-mKate2-P2A-GEM-LTB₄-mut), Tg(QUAS:GEM-LTB₄) F1 egyedek közös, vagy az adott F1, esetleg F2 generációból származó testvér egyedek egymással való ivatásából származó Tg(*mpx*:GFP)¹¹⁴) utódaik alkották.

3.7. Exogén LTB₄ grádiens vizualizációja zebrahalakban

Az exogén LTB₄ kimutatására a GEM-LTB₄ bioszenzort epiteliálisan, valamint mezenchimálisan expresszáló zebrahal lárvákat alkalmaztunk. A kísérlet előtt a lárvákat, a megfelelő érzéstelenítés biztosítása érdekében, 0,2 mg/ml mennyiségben trikaint (Sigma-Aldrich, CAT#:10521; CAS:886-86-2) tartalmazó¹³¹ izotóniás E3 (145 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, és 0,33 mM MgSO₄) oldatba tettük. Az izotóniás E3 alkalmazása gátolta a korai leukocita migrációt¹³² és késleltette a sebzáródást¹³³, ezzel biztosítva az exogén LTB₄ szövetekbe jutását. A mérésekben az LTB₄ szöveti penetrációjának vizsgálata során az intakt, vagy közvetlenül a mikroszkópia megkezdése előtt farokúszó amputáción átesett lárvákat izotóniás E3 alapú 1%-os alacsony olvadáspontú agaróz gélbe ágyaztuk.

Az 5 perces alapvonal felvétele után 1 μ M koncentrációjú LTB₄-et csepegtettünk a kísérleti állatra, majd további 40 percig monitoroztuk az LTB₄ szöveti eloszlásának alakulását. A GEM-LTB₄ specificitását bizonyítandó a kísérletet a szenzor mutáns variánsát expresszáló halakon is elvégeztük.

3.8. Endogén LTB₄ felszabadulás mérése zebrahalakban

A leukocitákból felszabaduló endogén LTB₄ mérése során, először a 4 napos lárvák hasi úszóján ejtettünk bemetszést. Ezt követően, hogy minél több immunsejtet gyűjthessünk a seb környezetébe, 90 percre 20 μ M végkoncentrációjú arachidonsavval kiegészített izotóniás E3 oldatba^{132,134} helyeztük a kísérleti állatokat. Az inkubációs idő leteltével a lárvákat izotóniás E3 alapú 1%-os alacsony olvadáspontú agaróz gélbe ágyasztuk. A mikroszkópos felvételek készítésének megkezdése után 3 perccel hipotóniás E3-ban oldott A23187 (Sigma-Aldrich, CAT#:C7522-5mg; CAS: 52665-69-7) kalcium-ionofór stimulust alkalmaztunk. A kontroll kísérletek során vagy az LTB₄ termelést gátoltuk a mérést megelőző 40 perces 20 μ M zileutonnal (Sigma-Aldrich, CAT#:1724656; CAS:111406-87-2) történő inkubációval, vagy az állatokat a GEM-LTB₄mut-ot expresszáló lárvákkal helyettesítettük.

3.9. Az exogén LTB₄ és a GEM-LTB₄ expresszió leukocita migrációra gyakorolt hatásának vizsgálata

A neutrofil migrációt nyomon követő mérések elején izotóniás E3 oldatban amputáltuk a lárvák farokúszóját, majd izotóniás E3 alapú 1%-os alacsony olvadáspontú agaróz gélbe ágyasztuk őket. A mérések kezdete után 5 perccel 1 μ M izotóniás E3-ban oldott LTB₄-et pipettáztunk a lárvákra, majd 1 perces felbontásban, 55 percen keresztül monitoroztuk a leukociták sebszélhez vándorlását.

A GEM-LTB₄ expresszió leukocita migrációra gyakorolt hatását intakt farokúszójú zebrahalakon végeztük. A 4 napos vad típusú, GEM-LTB₄-et vagy annak mutáns változatát kifejező lárvákat 0-10-30 és 100 nM LTB₄ koncentrációjú E3 oldattal kezeltük. A migráló leukociták darabszámát a stimulust követő 60 percig követtük nyomon.

Azt, hogy a steril sebzés által indukált leukocita vándorlás hogyan változik a GEM-

LTB₄ jelenlétében, szintén hipotóniás körülmények között vizsgáltuk. A farokúszó amputációt követően 60 percig követtük a leukociták sebszélhez vándorlását és meghatároztuk a migrációt leíró paramétereket a vad típusú és a GEM-LTB₄-et epitheliális sejtekben kifejező egyedekben.

3.10. Mikroszkópos mérések kvantifikálása és értékelése

Méréseinket 488 nm-en és 561 nm-en működő lézerekkel ellátott Yokogawa CSU-W1 spinning disk szkennelrel kiegészített, invertált Nikon Eclipse Ti2 mikroszkóppal végeztük. A zöld és piros fluoreszcens jeleket 525/50 nm és 600/30 nm emissziós filterek használatával rögzítettük. Méréseinkhez 40x ApoLambda/NA1.15 és 20x ApoLambda/NA0.85 víz-immersiós objektíveket használtunk. A képeket a NIS Elements AR 5.4 szoftver segítségével rögzítettük.

A képek feldolgozását és kiértékelését Python programnyelven megírt analízis pipeline-okkal végeztük. Az analízis első lépéseként a felvételek háttér intenzitását automatikusan levontuk az SMO szoftver segítségével¹³⁵, az esetleges elmozdulásokat pedig pyStackReg¹³⁶ használatával regisztráltuk. A GEM-LTB₄-et és GEM-LTB₄mut-ot kifejező sejtvonalakon végzett kísérleteink során a plazmamembrán szegmentációját az mKate2 fluoreszcens fehérje emissziós tartományában kapott jel alapján végeztük a Cellpose szoftver használatával¹³⁷, majd a sejtek mozgását egy Löffler és munkatársai által fejlesztett program¹³⁸ segítségével követtük. Ezen maszkok alkalmazásával egyedi sejtek szintjén elemeztük azok piros és zöld spektrumú fluoreszcencia intenzitásváltozásait, amihez a Python pandas könyvtárát használtuk. Mivel az alkalmazott plazmid konstrukciók révén a szenzor és a piros mKate2 fehérje expressziós mintázata megegyezik, a piros fluoreszcens jelet a kiértékelés során normalizációs szignálként alkalmaztuk és a kiértékelésekben az $F_{\text{szenzor}}/F_{\text{mKate2}}$ értékkel végeztük el a számításainkat. Az intracelluláris pH szenzorra gyakorolt hatásának kiértékelése során egyedül a GEM-LTB₄ adott időpontban mért fluoreszcens értékeit használtuk fel.

Az így kapott adatokat $\Delta F/F_0$ értéként mutatjuk be ábráinkon, amit az $(F_t - F_0)/F_0$ egyenlet segítségével kaptunk, melyben az F_t az adott t időpillanatban mért, az F_0 értéket pedig az alapvonal felvételekor mért intenzitások átlaga adja. A citoplazma kalcium koncentrációjának meghatározásához a $(F_t - F_0)/(F_{\text{max}} - F_0)$ képletet használ-

tuk, ahol az $F_{\max}$ érték megegyezik a kalciumionofór ionomycin stimulus után mért legmagasabb fluoreszcencia intenzitás mértékével.

A GEM-LTB₄ variánsok és az LTB₄ stimulusra bekövetkező β -arrestin2 plazmamembránban való elhelyezkedését az $F_{\text{plazmamembran}}/F_{\text{citoplazma}}$ vagy az $F_{\text{plazmamembran}}/F_{\text{sejt}}$ hányadosok adták meg. A fluoreszcencia értékek meghatározása során a sejtekről az ImageJ/Fiji program használatával egyedi maszkokat generáltunk, majd az így kapott maszkokból egy, a plazmamembránt körülvevő gyűrű alakú kijelölést hoztunk létre. Ez adta meg a plazmamembrán, míg a belső régió a citoplazma fluoreszcencia értékeit.

A dózis-hatás görbe felvétele során az EC50 érték meghatározása a négyparaméteres logisztikus növekedési függvény alkalmazásával történt.

Az egér neutrofil granulociták által termelt lokális LTB₄ felszabadulás kimutatásához a diplip.org könyvtárat használtuk, amivel a mért GEM-LTB₄ fluoreszcencia intenzitás távolságát a felszabadulás középpontjától mért távolság függvényében fejeztük ki.

In vivo kísérletek esetében a mérések feldolgozásakor, a fentiekhez hasonlóan a piros mKate2 csatorna alapján, a háttér intenzitás kivonása után egy, az expresszálo sejteket jelző maszkot hoztunk létre. A sebszél vonalának megadása után a „mahotas” könyvtár¹³⁹ segítségével a szenzorokat expresszálo epitél sejtekben mért intenzitást a sebszéltől mért távolság függvényében fejeztük ki. Ezután a fentieknek megfelelően kiszámítottuk az arányt $F_{\text{szenzor}}/F_{\text{mKate2}}$ és az eredményeket $\Delta F/F_0$ -ként hőtésképen ábráztuk. A mezenchimális sejtekben az mKate2 fehérje hiánya miatt, egyedül a GEM-LTB₄ szignál $\Delta F/F_0$ értékeit alkalmaztuk. A neutrofilek és a leukociták migrációs tulajdonságainak kiértékelését az ImageJ/Fiji MTrackJ plugin használatával végeztük el¹⁴⁰. A sejteket minden időpontban, a GFP-t expresszálo neutrofilek esetén a zöld, míg a leukocitákat a „bright field” csatornán követtük nyomon és adtuk meg a pozíciójukat manuálisan minden egyes mérési időpontra. A sejtek sebszéltől vett relatív távolságának meghatározásához az amputált zebra hal farokúszóra egy maszkot illesztettünk minden időpontra. Ehhez a maszkhoz viszonyítva adtuk meg a sejtek mozgását jellemző sebesség (v), a megtett út hosszátlagát (l), a mozgás direkcionalitását (Dw) és annak lineáris mivoltát (Dp) leíró paramétereket¹⁴¹.

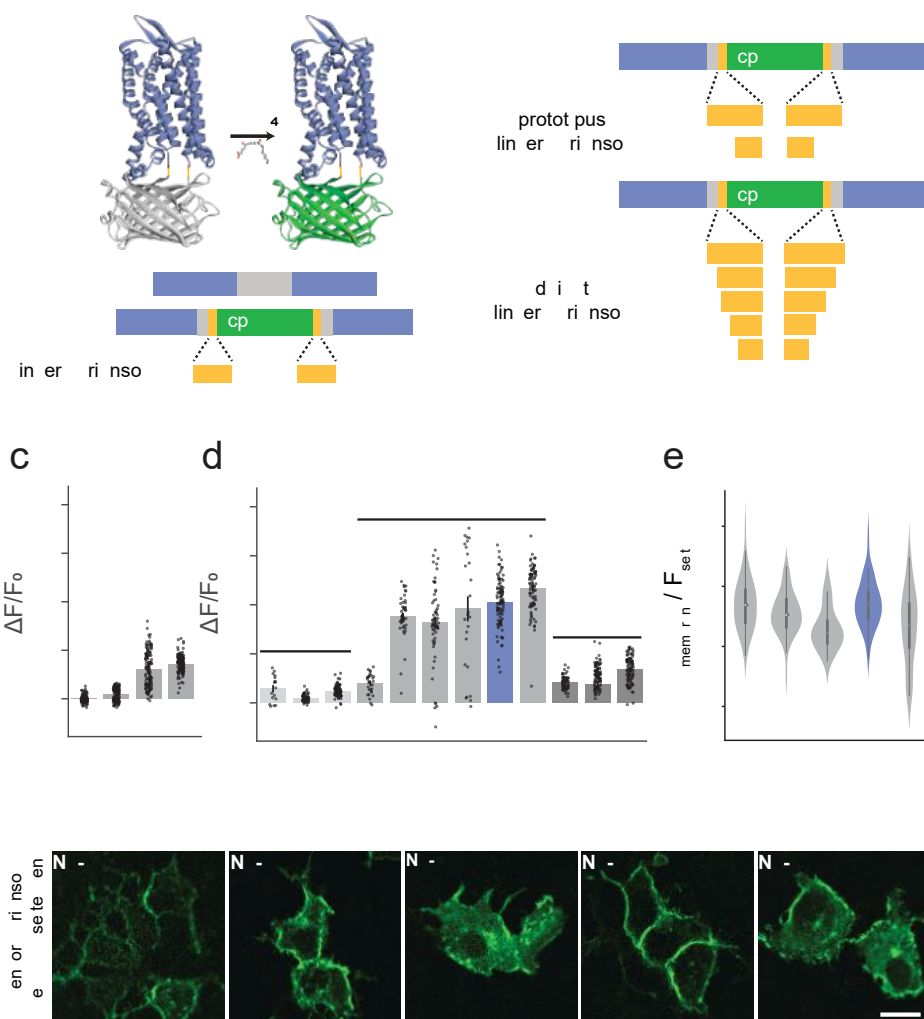
Az analízis során azokat a sejteket zártuk ki, melyekben a szenzor alapintenzitása olyan alacsony volt, hogy nem érte el az általunk meghatározott küszöbértéket. Minden

kísérletet legalább három mérést tartalmazó elemszámmal végeztünk el, ezt a számot minden ábrán feltüntettük. A feldolgozott adatokat a „seaborn” könyvtárral készített grafikonokon, a mérési képekből készült montázsokat az ImageJ/Fiji programmal készített ábrákon tüntettük fel^{140,142}. A szignifikanciaszintek meghatározásához kétmintás párosítatlan Welch korrekciós Student t-próbát és egyoldali Fisher, valamint Dunnett korrekciós ANOVA varianciaanalízist végeztünk a Python „Pingouin” könyvtárának használatával¹⁴³.

4. Eredmények

4.1. A GEM-LTB₄ fejlesztése

Az LTB₄ detektálására fejlesztett bioszenzor prototípusok alapját az LTB₄ magas affinitású hét transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérje kapcsolt receptora, a BLT1 alkotta³⁸. A receptor harmadik intracelluláris hurokrégiójában található 212. arginin és 213. fenilalanin aminosavjai közé illesztettük be a konformációváltozásra érzékeny cirkulárisan permutált zöld fluoreszcens fehérjét (cpEGFP) (9.a ábra). Ahhoz, hogy a ligand kötődés megfelelő konformációváltozást, és ezáltal fluoreszcencia intenzitásváltozást tudjon kiváltani a cpEGFP-ben, úgynevezett "linker", azaz pár aminosavból álló kapcsolórégiókkal illesztettük be a fluoreszcens fehérjét a BLT1 receptorba. Az első prototípusok esetén egy rövid GG aminosav és egy-egy hosszabb, a cpEGFP N- és C-terminális oldalán különböző LSSLE és LPDQL aminosav összetételű linker variánst alkalmaztunk (9.b ábra). A HEK293A sejteken végzett tesztek során az így kapott szenzorok közül az N-terminálison használt hosszú és a C-terminálishoz kapcsolt rövid linker szekvenciák együttes használata eredményezte az LTB₄ stimulusra bekövetkező legnagyobb fluoreszcencia intenzitásváltozást ($\Delta F/F_0 = 35,9 \pm 2,5\%$, átlag $\pm$ standard hiba) (9.c ábra). A szenzor fejlesztés következő szakaszában a linker régiók aminosav szekvenciáját (N-terminális oldalon: LSSLI míg C-terminális oldalon NHDQL) a hasonló elven működő „dLight1” dopamin szenzorok alapján terveztük meg⁷⁵. Először ezen összekötő szakaszok 3-5 aminosavból álló hossz permutációit teszteltük, összesen 9 különböző szenzorvariáns létrehozásával. A mérési eredmények alapján az N-terminális oldal négy (SSLI) aminosavból álló linkere határozta meg leginkább a ligand jelenlétére adott intenzitásváltozás mértékét. A fixen megtartott N-terminális linker mellett a C-terminálison a már említett 3-5 aminosav hosszúságú linkerekkel együtt, az összekötő régió teljes hiányát, valamint az 1-2 aminosav hosszú összekötő szakaszok alkalmazását is teszteltük. Az eredményeink alapján a C-terminális hosszának növekedése pozitív korrelációt mutat az intenzitásbeli változás mértékével (9.d ábra). A végleges szenzor kiválasztása során a $\Delta F/F_0$ érték mellett az adott prototípus plazmamembrán-lokalizációjának mértékét is figyelembe vettük, amit a variánsok HEK293A sejtekbe való transzfektálása után a plazmamembránban és a teljes sejtben mért fluoreszcencia intenzitás érték hányadosaként határoztunk meg (9.e és f ábra).



9. ábra. Genetikailag kódolt LTB_4 bioszenzor fejlesztése.

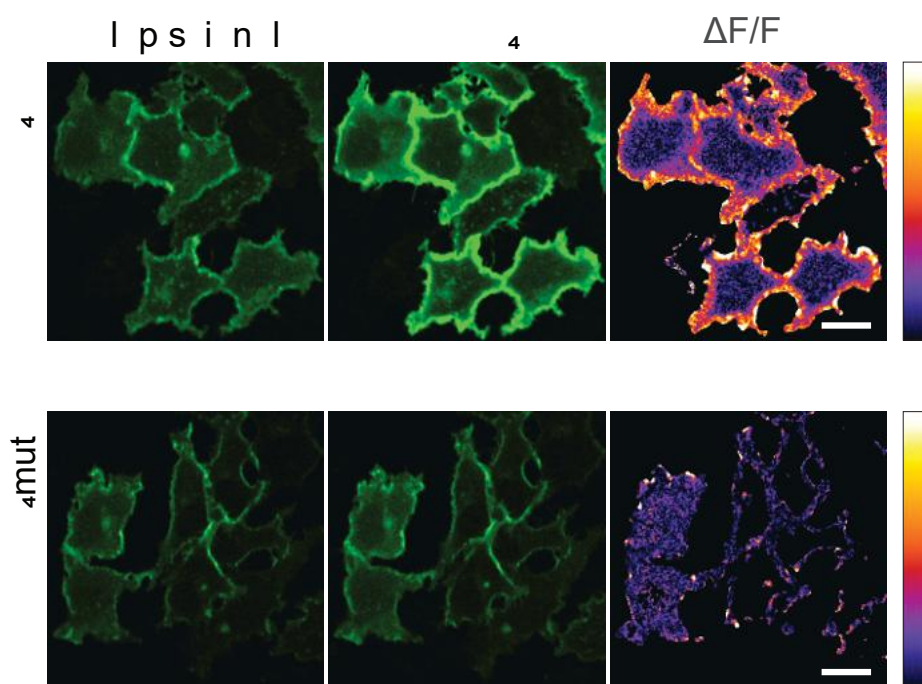
a) A szenzor sematikus ábrája. A $BLT1$ receptor harmadik intracelluláris hurokrégiójába illesztett cpEGFP fluoreszcencia intenzitása ligandkötés hatására megváltozik. **b)** A szenzor fejlesztése során használt N és C-terminális linker variánsok sematikus aminosav sorrendje. **c)** Az első linker prototípusokat tartalmazó szenzorok LTB_4 stimulusra adott válaszainak $\Delta F/F_0$ értékei (átlag $\pm$ SEM, $n=106, 134, 135$ és 139 sejt). **d)** "dLight" linker variánsokat tartalmazó szenzorok $\Delta F/F_0$ értékei (átlag $\pm$ SEM, $n=17, 61, 90, 30, 47, 62, 26, 97, 86, 62, 105$ és 98 sejt). **e)** A legmagasabb $\Delta F/F_0$ értékeket mutató variánsok membrán lokalizációt kifejező $F_{membrán}/F_{sejt}$ értékei (átlag $\pm$ SEM, $n=54, 51, 23, 57$ és 55). **f)** Reprezentatív konfokális mikroszkóp képek a szenzorvariánsok HEK293A sejtekben mutatott membrán-lokalizációs mintázatairól, skála= $25 \mu m$ ⁷⁶.

Ezen két feltétel alapján a cpEGFP-t közrefogó N-terminális oldali LSSL és C-

terminális oldali NHDQ aminosav összetételű linkerek bizonyultak a legideálisabbnak ($\Delta F/F_0 = 103 \pm 1\%$, átlag $\pm$ standard hiba).

A plazmamembránba való kihelyeződés további javításáért a kiválasztott szenzor N-terminális végéhez fuzionáltuk az egerekből származó Ig κ lokalizációs szekvenciát (M-ETDTLLLWVLLLWVPGSTGD)¹¹⁷. Az így kapott végleges szenzort GEM-LTB₄-nek (GPCR-based Extracellular Mapping/G-fehérje kapcsolt receptor alapú Extracelluláris Feltérképezés) neveztük el (10.a ábra).

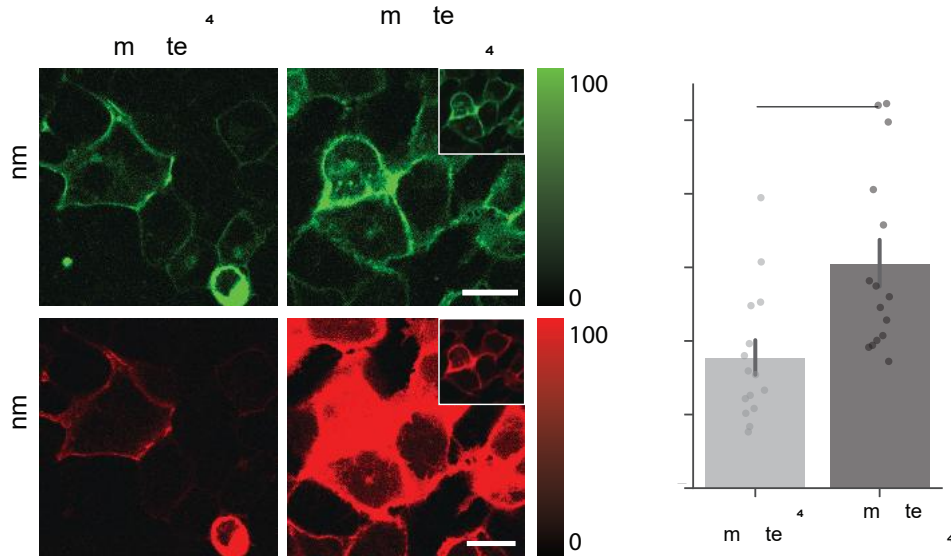
Kontroll kísérleteinkhez a szenzor 156. argininjének alaninra való cserélésével, létrehoztuk a GEM-LTB₄ mutáns, LT_{B4} kötésre nem képes változatát¹²². Ez a szenzorvariáns, bár a lokalizáció és a fluoreszcens alapszignál tekintetében a GEM-LTB₄-hez hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, a ligand jelenlétében nem mutat intenzitásváltozást (10.b ábra).



10. ábra. A GEM-LTB₄ és mutáns változata HEK293A sejtekben. **a)** Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek a végleges GEM-LTB₄ és **b)** annak R156A pontmutációt tartalmazó, ligandkötésre nem képes változatának 100 nM LT_{B4} stimulusra adott intenzitásváltozásairól, skála=25 μm ⁷⁶.

Normalizációs szignál gyanánt, az általunk létrehozott stabil HEK293A sejtvonalt, valamint a transzgenikus halvonalainkban, a szenzorral egy plazmamembrán lokalizációs

szignállal ellátott piros fluoreszcens mKate2 fehérjét koexpresszáltattunk. A fluoreszcens proteinek 1:1 arányú kifejeződését a két fehérje szekvenciája közé behelyezett virális, saját peptidláncát bontani képes P2A peptid biztosította¹²³. Ez a konstrukció a GEM-LTB₄-mKate2 direkt fúziós fehérjével ellentétben nem csökkentette a szenzor alap fluoreszcenciáját (független mintás t-próba, $p = 0,003$) (11.a és b ábra).



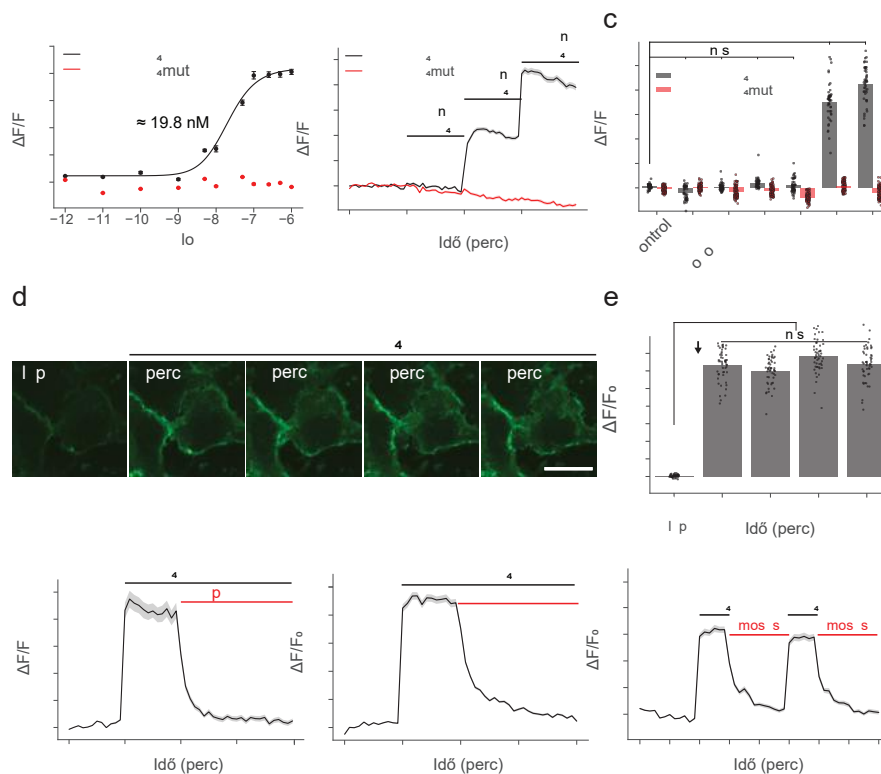
11. ábra. **Normalizációs szignállal ellátott GEM-LTB₄ bioszenzorok kifejeződésének összehasonlítása HEK293A sejtekben.** a) *Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek a GEM-LTB₄-direkt C-terminális mKate2 és N-terminális P2A-mKate2 fúziós változatainak expressziós mintázatairól HEK293A sejtekben, skála=25 μm.* b) *A GEM-LTB₄ fluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása (átlag ± SEM, n=15-15 sejt, párosítatlan t-próba $p=0,003$)⁷⁶.*

4.2. A GEM-LTB₄ karakterizálása HEK293A sejtekben

A végleges szenzorvariáns tulajdonságait a GEM-LTB₄-et stabilan kifejező HEK293A sejtvonalonban vizsgáltuk.

A szenzor szenzitivitását az 1 pM és 1 μM közötti LT_B₄ koncentrációtartományban vizsgáltuk. A mérések alapján a szenzor az 5 és 100 nM közötti LT_B₄ stimulusra folyamatosan növekvő fluoreszcencia intenzitásváltozással reagál, míg a maximális hatás felét kiváltó dózis (EC₅₀) érték közelítőleg 19,8 nM-nak felelt meg (12.a és b ábra). Az egyszeri 100 nM-os LT_B₄ stimulus hatására kialakuló szenzorválasz 45 percen keresztül változatlan mértékben fennmaradt a sejtekben. A ligand hatása azonban az LT_B₄ sejtekről való lemosása révén, valamint a BLT1 specifikus CP-105,696 és BIIL 260-hidroklorid inhibitorok jelenlétében reverzibilisen visszafordítható (12.d-h ábra).

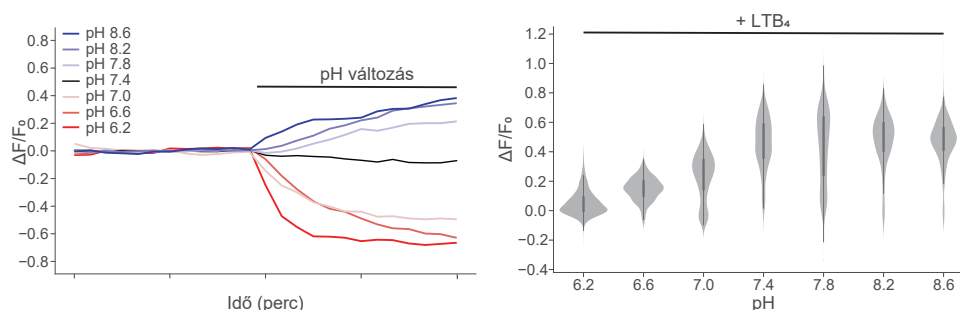
A GEM-LTB₄ specificitásvizsgálatához több, az arachidonsav kaszkádban megtalálható, az LT_B₄-hez szerkezetileg hasonló eikozanoidot alkalmaztunk. A felhasznált ligandok közül az LT_B₄ kivételével, annak metabolitja a 20-OH-LTB₄ tudott jelentős intenzitásbeli változást indukálni (egyszempontos varianciaanalízis, $p=0,000$). Az általuk kapott ligandkötési mintázat teljes mértékben megegyezett a szenzor alapjául szolgáló BLT1 receptoréval⁴⁰ (12.c ábra).



12. ábra. A GEM-LTB₄ karakterizálása HEK293A sejtekben.

a) A GEM-LTB₄ és annak mutáns változatának LTB₄ stimulusra adott dózis-hatás görbéje. A szenzor EC₅₀ értéke, a négyparaméteres logisztikus növekedési függvény alkalmazásával 19,8 nM-nak adódik (átlag ± SEM, n=66-218 sejt, 3 különböző mérésből). **b)** A GEM-LTB₄ és GEM-LTB₄mut szekvenciálisan növekedő LTB₄ dózisokra adott átlagos $\Delta F/F_0$ válaszai (átlag ± SEM, n=113 és 181, sejt 3 különböző mérésből). **c)** A GEM-LTB₄ és GEM-LTB₄mut különböző eikozanoid stimulusokra adott válaszreakciói (átlag ± SEM, n=45-88 sejt, 3 különböző mérésből, varianciaanalízis F=761,3, p=0,00). **d)** Reprezentatív mikroszkópos felvételek a HEK293A sejtekben kifejeződő GEM-LTB₄ 100 nM LTB₄ stimulusra adott válaszreakciójáról, a stimulust követő 0-15-30 és 45. percben (skála= 25 μ m). **e)** A GEM-LTB₄ 100 nM LTB₄ stimulusra adott $\Delta F/F_0$ értékei a ligand hozzáadást követő 0-15-30 és 45. percben (n=49 sejt, varianciaanalízis F értéke 679,72, p=0,00). **f)** 100 nM LTB₄ stimulust követő 1 μ M BLT1 inhibitor CP-105,696 vagy **g)** BILL-260 kezelésre adott GEM-LTB₄ válasz reakció (átlag ± SEM, n=85-85 sejt, 3 különböző kísérletből). **h)** A GEM-LTB₄ $\Delta F/F_0$ értékeinek változása periodikusan váltakozó 100 nM mennyiségű LTB₄ stimulust, majd EC1 médiummal történő mosást követően (átlag ± SEM, n=344 sejt, 3 különböző kísérletből)⁷⁶.

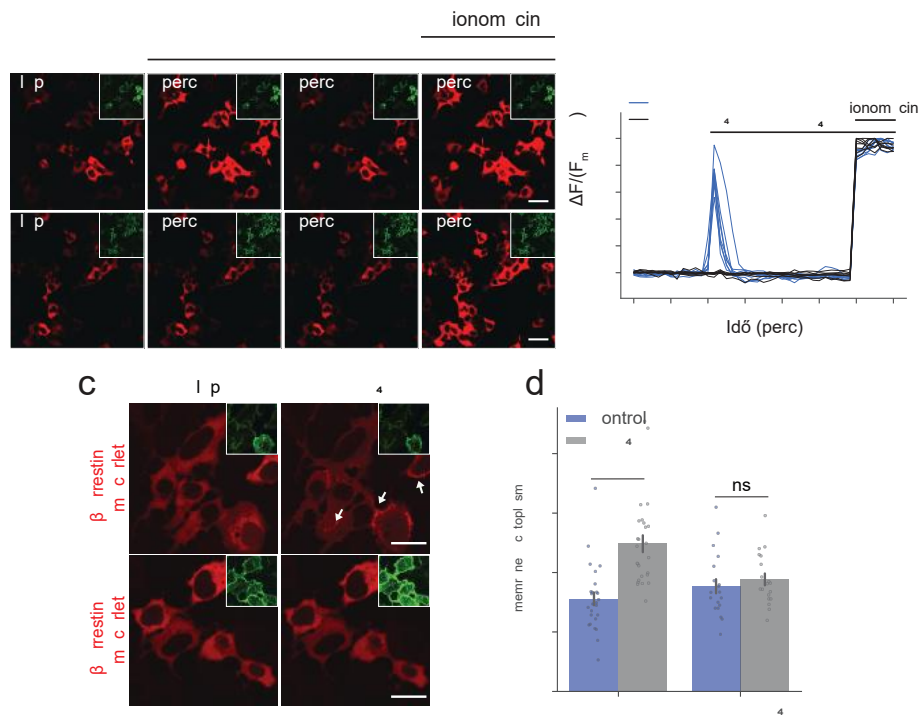
A szenzorban található cpEGFP intracelluláris pH érzékenységet a 6,2 és 8,6 közötti pH tartományban vizsgáltuk. Az adott pH-ra beállított intracelluláris puffer nigericin és monensin tartalma enyhén roncsolta a sejtek membránját, így teremtve meg a szenzor körül vizsgálni kívánt pH értéket. A savas pH tartomány az alapszignál csökkenését váltja ki, melynek a vizsgálatok során a maximális értéke -66% volt a normál értéként kezelt 7,4-es pH-n mértékhez képest, míg a lúgosabb közeg akár 38%-os növekedést is előidézhett a szenzor fluoreszcenciában (13.a ábra). Bár az alapszignál nagy mértékben változhat az aktuális pH értékek függvényében GEM-LTB₄ LTB₄-re adott válaszkészsége megmaradt (13.b ábra).



13. ábra. A különböző pH értékű környezet szenzor működésére gyakorolt hatása

a) A GEM-LTB₄ alap $\Delta F/F_0$ intenzitásváltozása a diagramon megjelölt pH értékű, nigericint és monensint tartalmazó intracelluláris oldatok szenzor expresszálo sejtekre való áramoltatása közben (átlag $\pm$ SEM, $n=226-596$ sejt, 3 különböző kísérletből). **b)** 100 nM LT B₄ stimulusra bekövetkező szenzor fluoreszcencia intenzitásváltozások különböző pH értékű, nigericint és monensint tartalmazó intracelluláris médiumokban (átlag $\pm$ SEM, $n=529-1256$ sejt, 3 különböző kísérletből)⁷⁶.

Végezetül megvizsgáltuk a GEM-LTB₄ BLT1 jelátviteli pályáira gyakorolt hatásait. Míg a BLT1 receptort expresszálo HEK293A sejtekben a ligandkötés hatására a G-fehérje receptorhoz kapcsolódása következtében nő a citoplazma kalciumszintje, addig ez a jelenség a szenzort expresszálo sejtekben nem figyelhető meg (14.a és b ábra). Hasonlóképpen, a GEM-LTB₄ esetében a G-fehérje aktivációt követő β -arrestin-2 vezérelt receptor internalizáció sem következik be. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GEM-LTB₄ nem befolyásolja a BLT1 endogén jelátviteli útvonalait (14.c és d ábra).



14. ábra. A GEM-LTB₄ nem aktiválja a BLT1 jelátviteli útvonalait.

a) Reprezentatív ábra a kalcium indikátor jRGECO1a fehérje fluoreszcencia intenzitásának változásairól 100 nM LTB₄ stimulust, majd a kontroll gyanánt alkalmazott 1 μ M ionomycin kezelést követően, HEK293A sejtekben. A felső sor ábráin a kalcium szenzort a sejtek a BLT1-EGFP-vel, míg az alsó sorban a GEM-LTB₄-el közösen fejezik ki, skála= 25 μ m. **b)** A jRGECO1a $\Delta F/(F_{max} - F_0)$ értékeinek időbeli változása LTB₄, valamint ionomycin hatására GEM-LTB₄-et vagy BLT1-EGFP-t expresszáló individuális sejtekben (átlag $\pm$ SEM, n=7 és 8 sejt, 3 különböző kísérletből). **c)** Reprezentatív ábra a BLT1-EGFP (felső sor) és a GEM-LTB₄ (alsó sor) által ligandkötés hatására létrejövő β -arrestin-2-mScarlet membrán transzlokációról HEK293A sejtekben, skála=25 μ m. **d)** A β -arrestin-2-mScarlet intenzitás értékeinek membránban és a citoplazmában mért hányadosai a 100 nM LTB₄ stimulus előtt és azt követően, BLT1-EGFP-t és GEM-LTB₄-et koexpresszáló sejtekben (átlag $\pm$ SEM, n=26 és 19 sejt, a kétoldali T próba p=0,000 és 0,058)⁷⁶.

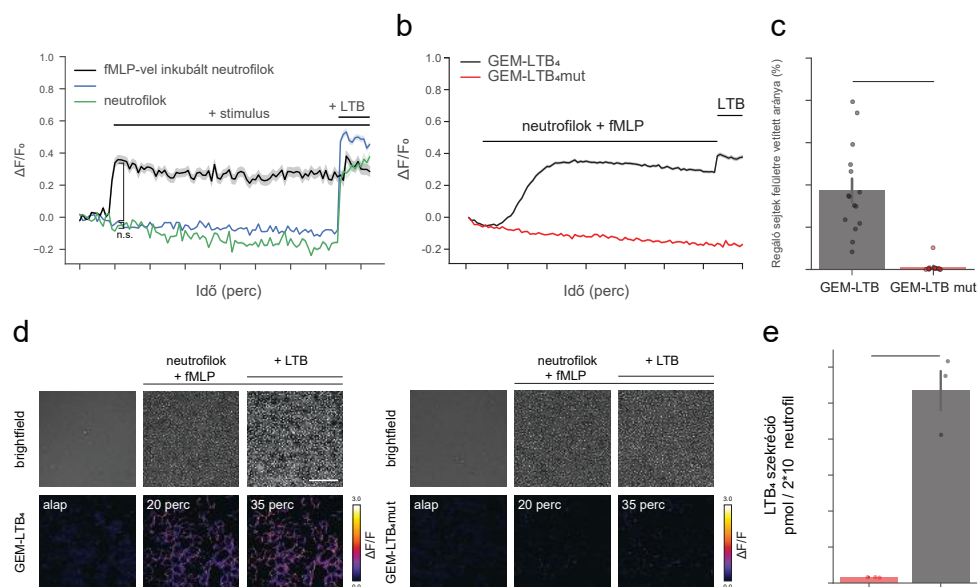
4.3. Egér neutrofil granulocitákból felszabaduló LTB₄ vizualizációja

A GEM-LTB₄ exogén LTB₄-re adott válaszainak feltérképezése után, célunk a neutrofil granulocitákból felszabaduló endogén LTB₄ detektálása lett.

Izolált egér neutrofileket 2 μ M fMLP-vel stimuláltuk, majd a GEM-LTB₄-et kifejező HEK293A sejtekre ülepítettük. A neutrofil granulociták sejtekhez adását követően a bioszenzor azonnali fluoreszcencia intenzitásnövekedését detektáltuk, ami jelezte a neutrofil granulocitákból felszabaduló LTB₄ jelenlétét. A kontrollként alkalmazott kezeletlen neutrofil granulociták és az fMLP önmagában nem váltottak ki hasonló reakciót (15.a ábra).

A valós időben történő LTB₄ felszabadulás vizsgálatához, az izolált egér neutrofil granulocitákat először nagy sűrűségben a GEM-LTB₄-et expresszáló sejtrétegre szélesztettük, majd a sejtek leülepedése után adtuk hozzá az fMLP-t a rendszerhez. A stimulust követő 5. perc környékén a nagy mennyiségű neutrofil granulocitákat tartalmazó régiókból kiindulva regisztráltuk a GEM-LTB₄ fluoreszcencia intenzitásnövekedését, mely változás átlag mértéke elérte a $38 \pm 5,4\%$ -ot (átlag $\pm$ SEM). A kontrollként alkalmazott GEM-LTB₄ mut sejtekkel végzett kísérletekben ez a hatás nem következett be (15.b-d ábra).

Az eredményeink alátámasztására ELISA méréssel meghatároztuk a megegyező kísérleti körülmények között stimulált neutrofilek LTB₄ termelésének mennyiségét, ami a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően a $267,25 \pm 31,28$ pmol-os tartományba esett⁴ (15.e ábra).

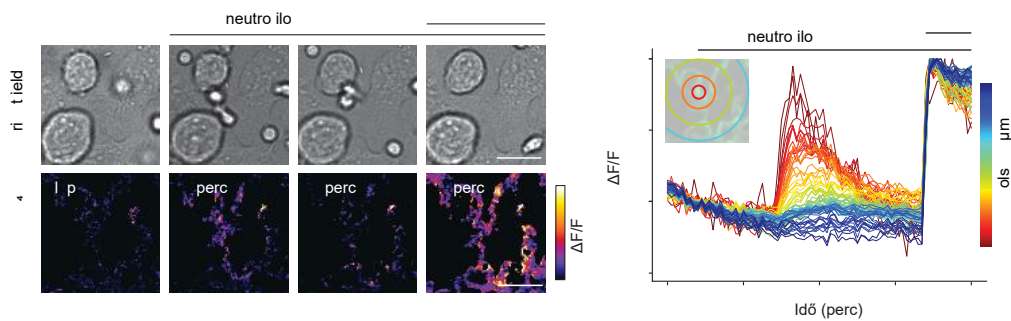


15. ábra. fMLP hatására egér neutrofilekből felszabaduló LTB_4 kimutatása

a) A bioszenzort expresszáló HEK293A sejtekben mért intenzitásváltozás fMLP inkubált egér neutrofilek hozzáadása után (fekete), fMLP stimulust követően (kék) és egér neutrofilek egyedüli sejtekhez adása során (zöld). A stimulus hozzáadása a 4. percben, míg a pozitív kontrollként szolgáló 100 nM-os LTB_4 kezelés a 28. percben történt (átlag $\pm$ SEM, $n=42$, 44 és 38 sejt, a Fischer LSD korrigált egyutas varianciaanalízis eredménye a stimulust követő percben, $F=222.9$ és $p=2.6 \cdot 10^{-41}$) **b)** GEM- LTB_4 és annak mutáns változatát expresszáló HEK293A sejtekben mért fluoreszcencia intenzitásváltozások a sejtekre szélesztett $2 \cdot 10^6$ neutrofil granulociták fMLP kiváltott aktivációját követően. Pozitív kontrollként a mérés 35. percében 100 nM LTB_4 került a sejtekre (átlag $\pm$ SEM, $n=600$ és 465 sejt). **c)** A GEM- LTB_4 és GEM- LTB_4 mut sejtekkel befedett 1 cm^2 felületen legalább 50 %-os intenzitásváltozást mutató területek százalékos aránya az egér neutrofil granulociták $2 \mu\text{M}$ fMLP stimulusát követően (átlag $\pm$ SEM, $n=15$ -15 mérési pont, 3 különböző kísérletből, a kétoldali T próba P értéke 0,001159). **d)** Reprezentatív ábra a **b)** és **d)** mérés szenzort, és annak mutáns változatát expresszáló HEK293A sejtekről, a neutrofilek és az fMLP stimulus előtt, a stimulust követő 20. percben és a 35. percben, ahol a kontrollként alkalmazott 100 nM-os LTB_4 hozzáadásra került (skála= $100 \mu\text{m}$). **e)** ELISA méréssel meghatározott egér neutrofilek által termelt LTB_4 koncentrációk 28 perccel egy $2 \mu\text{M}$ -os fMLP kezelést követően (átlag $\pm$ SEM, $n=3$ -3 kísérlet, párosítatlan t-próba, $p=0,0012$)⁷⁶.

Az egyedi sejtekből felszabaduló LTB_4 mérését célzó kísérleteinkben olyan mérési területeket vizsgáltunk, ahol a neutrofil granulociták az fMLP stimulust követően elszórtan, alacsony számban helyezkedtek el a HEK293A sejtek felületén. Az LTB_4 detektálására fejlesztett szenzorunk megfelelően bizonyult az fMLP hatására aktiválódott, lekerekedett alakot felvevő, egyetlen neutrofil granulocitából kiinduló LTB_4 grádiens vizualizációjára. Az LTB_4 jelenlétét megerősíti azon megfigyelésünk, hogy ezen mérésekben az aktiválódott neutrofil granulociták környezetében lévő társaik, az általunk vizualizált kemotaktáns grádiens felé a migrációhoz szükséges pszeudopódiumokat képezték (16.a és b ábra).

A fenti eredmények alátámasztják, hogy a GEM- LTB_4 kellően érzékeny ahhoz, hogy *ex vivo* körülmények között kimutassa a neutrofil granulocitákból felszabaduló LTB_4 jelenlétét.



16. ábra. Egyedi neutrofilekből felszabaduló LTB_4 hullám tér és időbeli detektálása.

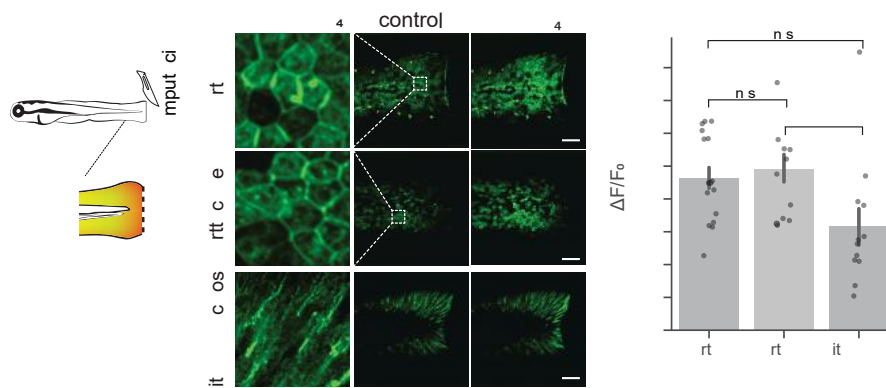
a) A GEM- LTB_4 -et kifejező HEK293A sejtek és a rájuk szélesztett egér neutrofil granulociták brightfield felvételei és a HEK293A sejtek $\Delta F/F_0$ értékeit reprezentáló felvételek a mérés kezdetén, a neutrofilek és a $2 \mu\text{M}$ -os fMLP stimulus hozzáadását követő 10., 17., valamint a 20. percben bekövetkezett 100 nM -os LTB_4 stimulust követően. A fehér csillag a **b)** ábrán bemutatott kiértékelés középpontjában lévő neutrofilt jelöli (skála= $20 \mu\text{m}$).

b) Reprezentatív grafikon egy LTB_4 hullám kialakulása során mért $\Delta F/F_0$ értékek változásáról az x tengelyen feltüntetett időben és a grafikon színeivel jelölt, a brightfield képen bemutatott középponttól vett távolság függvényében⁷⁶.

4.4. Exogén LTB₄ grádiens mérése *in vivo* zebrahalakban

Az LTB₄ grádiens *in vivo* kimutatását GEM-LTB₄ transzgenikus zebrahal vonalakon végeztük.

A szenzort felületi és bazális hámrétegben, valamint a mezenchimális sejtekben fejeztük ki. A felhámban való expresszióhoz a kreatinin 4 fehérje átíródását *krt4*, a bazális sejtekben való specifikus kifejeződéshez a keratin 19 termelődését szabályozó *krt1c19e* a mezenchimális sejtekben való specifikus megjelenés eléréséhez pedig a laborunk által fejlesztett fúziós *itgalla-cFos* promótert alkalmaztuk. Az általunk kifejlesztett promóter a zebrahal integrin alfa-11 kifejeződését elősegítő *itgalla* és az egér c-Fos fehérje expresszió mértékét befolyásoló *cFos* promóter régiók összekapcsolásával jött létre, ami zebrahalakban a QF2-QUAS rendszerrel együtt alkalmazva egy szövetspecifikus, és az exogén LTB₄ kimutatására alkalmas erősségű expressziót eredményezett [121]. A GEM-LTB₄ mindhárom promóterrel kifejezve a HEK293A sejtekben megfigyelvekel megegyező plazmamembrán-lokalizációt mutatott, valamint a szöveti térbe bejutó 1 μ M koncentrációjú LTB₄ stimulusra szintén hasonló mértékű intenzitásváltozással reagált (17.a és b ábra).

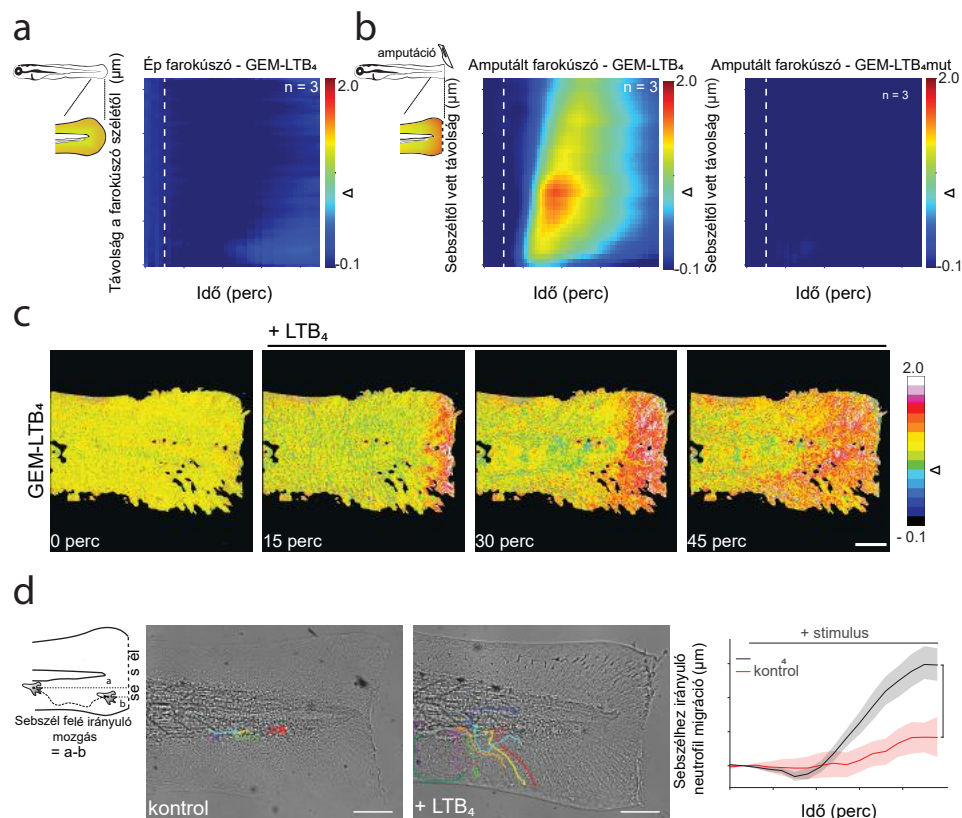


17. ábra. A GEM-LTB₄ kifejeződése zebrahalakban.

a) A kísérleti felállás sematikus ábrája⁷⁶. Reprezentatív fluoreszcens felvételek a GEM-LTB₄ kifejeződéséről és a farokúszó amputációt követő 1 μ M LTB₄ stimulusra adott intenzitásváltozásáról Tg(krt4::GEM-LTB₄) (felső), Tg(krtt1c19e::GEM-LTB₄) (középső) és Tg(itg11a-cFos::GEM-LTB₄) (alsó) zebrahal lárvákban (skála=100 μ m). **b)** A különböző promóterekkel kifejezett bioszenzor LTB₄ stimulusra adott $\Delta F/F_0$ értékei (átlag $\pm$ SEM, n=16,12 és 15 3 különböző lárvából vett sejt, varianciaanalízis F=4,11, p=0,024. A Tukey-teszt itg11a-cFos és krtt1c19e promóterekre kapott p=0,032).

Az exogén LTB₄ penetrációját és szöveti eloszlását a felületi hámrétegben kifejezett GEM-LTB₄ segítségével határoztuk meg. Az ép és amputált farokúszójú zebrahal lárvákat izotóniás E3 oldatba helyeztük, ami késleltette a sebzáródást, valamint az amputáció következtében kialakuló leukocita migrációt^{132,133}. Az intakt farokúszóval rendelkező halakban kifejezett GEM-LTB₄-ben nem alakult ki az LTB₄ stimulust követően fluoreszcencia intenzitásbeli változás, míg az amputált egyedekben egy legalább 200 μ m mélységbe betérjedő LTB₄ grádienszt detektáltunk. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az intakt hámszövet barriert képezve lassítja az exogén módon adagolt ligand szövetekbe jutását. A szenzorral mért intenzitásbeli változások specificitását a GEM-LTB₄ mutáns verziójával végzett kísérleteink igazolták. Ebben az esetben nem következett be szignifikáns változás az alap fluoreszcencia értékekhez képest (18.a-c ábra).

Mindezekon felül, az általunk kimutatott LTB₄ grádiens időbeli kialakulása összeegyeztethető volt a fent ismertettel megegyező módon kezelt Tg(mpx:GFP) lárvákban megfigyelt, az exogén LTB₄ jelenlétében megjelenő sebszélhez irányuló neutrofil granulocita migráció időbeli lefolyásával 18.d ábra).



18. ábra. **Exogén LTB_4 vizualizálása és a kezelésre adott leukocita migrációs válasz zebrahalakban**

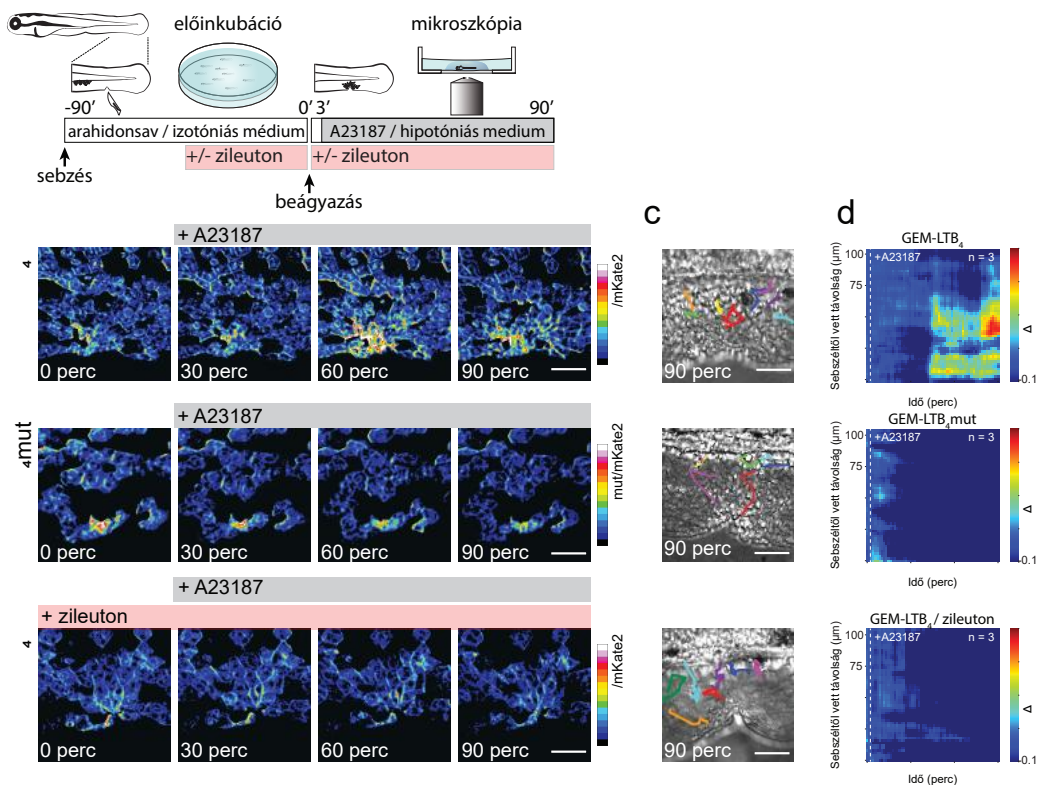
a) Az ép farokúszó sematikus ábrája. Átlagolt $\Delta F/F_0$ értékeket az idő és a farokúszó végétől vett távolság függvényében ábrázoló hő térkép $1 \mu M$ LTB_4 oldatba helyezett ép farokúszóval rendelkező $Tg(krt4::GEM-LTB_4)$ lárvákról. **b)** Az amputált farokúszó sematikus ábrája. Átlagolt hő térkép amputált farokúszójú $Tg(krt4::GEM-LTB_4)$ és $Tg(krt4::GEM-LTB_4mut)$ lárvákról exogén LTB_4 jelenlétében. A hő térképeken az LTB_4 stimulus kezdetét szaggatott vonal jelzi. **c)** Reprezentatív $\Delta F/F_0$ ábra az amputált zebrahal farokúszó epitheliális sejtjeiben kifejezett $GEM-LTB_4$ intenzitásváltozásairól LTB_4 stimulus előtt és után (skála= $100 \mu m$). **d)** $Tg(mpx::GFP)$ zebrahalakban a farokúszó amputációt követő 50 percben mért össz neutrofil mozgás nyomvonala, LTB_4 hiányában és jelenlétében (skála= $100 \mu m$) (bal). A neutrofilek által megtett sebszélhez irányuló távolságok átlaga a kontroll és LTB_4 stimuluson átesett lárvákban (átlag $\pm$ SEM, $n=25$ és 38 sejt, 5 és 4 különálló mérésből, a mérés végén elvégzett kétoldali T próba $p=0.000$)⁷⁶.

4.5. Kalciumionofór által kiváltott endogén LTB₄ detektálása zebra- halakban

Bár a zebrahalakon végzett steril sebzés önmagában elegendő feltétele a leukocita LTB₄ termelés, és ezáltal a neutrofil granulocita klaszter képződés és rajzás elindításához, irodalmi adatokból tudjuk, hogy ezen folyamatok nem minden sérülést követően mennek végbe¹⁴⁴.

Ezért, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a szenzorunk alkalmas az endogén LTB₄ felszabadulás *in vivo* kimutatására, egy megbízható LTB₄ termelést biztosító kísérleti felállást kellett kidolgoznunk. A kísérletekben használt négy napos zebrahal lárvákban a *krttlc19e* promóter használatával a GEM-LTB₄-et a neutrofil granulocitákhoz térben legközelebb elhelyezkedő bazális sejtekben fejeztük ki. Az általunk alkalmazott kísérleti protokoll első lépéseként izotóniás E3 oldatban ejtettünk sebzést a lárvák hasi farokúszóján. Az izotóniás E3 oldat az ozmotikus koncentráció megváltozásának hiányában gátolta a sebzáródást, ezzel biztosítva a neutrofilek stimulációjára használt A23187 kalciumionofór szövetekbe jutását^{133,144}. Az izotóniás oldat nemcsak a sebzáródást, de a neutrofilek sebszélhez vándorlását is gátolta. Azért, hogy a szövetbe bediffundáló A23187 a neutrofilek aktiválásához szükséges koncentrációban érje a sejteket, ezt a hatást a médiumhoz nagy koncentrációban hozzáadott arachidonsavval ellensúlyoztuk. Az AA önmagában nem serkenti a leukocita migrációt, azonban előanyaga olyan a sérülés hatására megjelenő kemoattraktánsoknak, amik hatással vannak a neutrofil granulociták vándorlására¹³². Az A23187 stimulust követően az előzőleg a sebszélhez vonzott neutrofil granulocitákban az ionofór hatására megemelkedő kalciumion szint révén az 5-LOX enzim a magmembránba transzlokálódik és aktiválódik, ezáltal megkezdődik a sejtekben az endogén LTB₄ termelődése¹⁴⁴ (19.a ábra).

A GEM-LTB₄ expresszáló lárvákban az A23187 stimulust követő 90 percen belül detektálhatóvá vált, egy a sebszél és a leukociták közvetlen közelében megjelenő LTB₄ gradiens. Az LTB₄-re adott specifikus szenzorválaszt jelzi, hogy a 5-LOX inhibitor zileutonnal előinkubált és a GEM-LTB₄ mutáns változatát kifejező lárvákkal végzett kísérletekben nem jelentkezett fluoreszcencia intenzitásváltozás (19.b és c ábra).

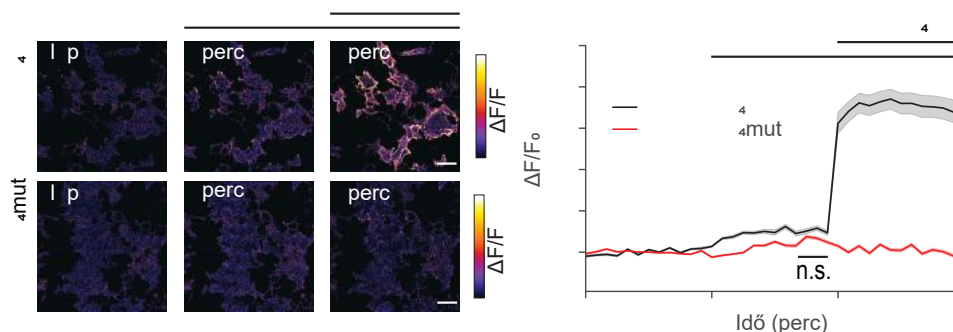


19. ábra. Zebrahalakban mért endogén LTB_4 felszabadulás.

a) A kísérleti felállás sematikus ábrája. A mikroszkópos mérés megkezdése előtt a zebrahal lárvák hasi farokúszó sebzésen estek át, majd 90 percig $20 \mu M$ arachidonsavval, a kontroll mérésekben ráadásként $20 \mu M$ mennyiségben az 5-lipoxigenáz inhibitor zileutonnal kiegészített izotóniás E3 oldatban inkubálódtak. Az inkubációs idő lejártá után a lárvák hipotóniás E3 agarózba kerültek, valamint a mérés megkezdése utáni 3. percben $100 \mu M$ A23187 kalciumionofórral lettek stimulálva. b) Reprezentatív a bazális hámsejtekben mért $F_{GEM-LTB_4} / F_{mKate2}$ arány változását időben követő ábrák $Tg(krtt1c19e : QF2 \times QUAS : GEM-LTB_4)$ (felső és alsó ábrák), valamint $Tg(krtt1c19e : QF2 \times QUAS : GEM-LTB_4mut)$ (középső) zebrahal lárvákban (skála = $50 \mu M$). c) Brightfield felvételek a b) ábrákon látható egyedek sebszéleihez összegyűlt leukocitákról. A színes vonalak, a sejtek által a mérés 90 perce alatt megtett utakat jelölik (skála = $50 \mu M$). d) Átlagolt hő térképek a $GEM-LTB_4$ és a $GEM-LTB_4mut$ intenzitásváltozásáról a távolság és az idő függvényében. ($n=3-3-3$ zebrahal larva)⁷⁶.

Ezen felül előzetesen a szenzort stabilan expresszáló HEK293A sejtvonalban kimutattuk, hogy az A23187 egyedüli alkalmazása szintén nem eredményezi a $GEM-LTB_4$ inten-

zításnövekedését (20.a és b ábra).



20. ábra. Az A23187 kezelés szenzorra gyakorolt hatása.

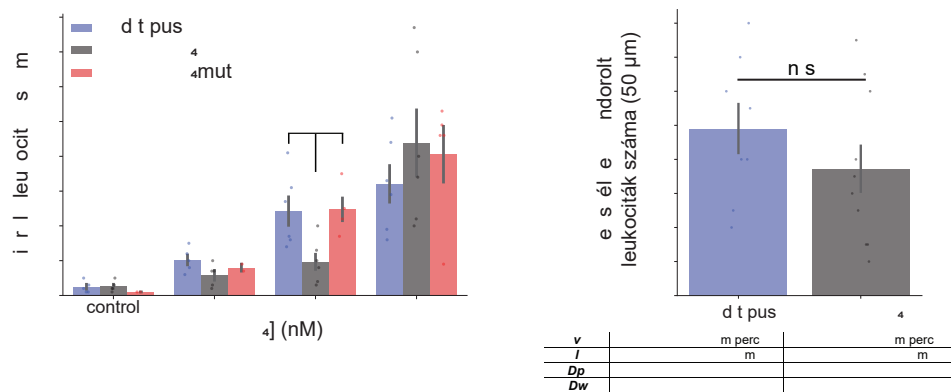
a) Reprezentatív $\Delta F/F_0$ ábrák a GEM-LTB₄ és a szenzor mutáns verziójának HEK293A sejtekben mért intenzitásváltozásairól 1 μ M A23187 jelenlétében, majd 100 nM LTB₄ stimulust követően (skála= 50 μ m). **b)** A GEM-LTB₄ és a GEM-LTB₄mut $\Delta F/F_0$ értékeinek időbeli változása a 2. percben adott A23157 és a 4. percben alkalmazott LTB₄ stimulust követően (átlag $\pm$ SEM, n=40 és 79 sejt, 3-3 különálló mérésből, az LTB₄ hozzáadást megelőzően elvégzett kétoldali T próba, p=0,097)⁷⁶.

4.6. A GEM-LTB₄ expresszió leukocita migrációra gyakorolt hatása

A GEM-LTB₄ a fentiek alapján alkalmas az exogén és az endogén LTB₄ jelenlétének kimutatására. Azonban ahhoz, hogy a szenzort a jövőben széleskörben tudjuk alkalmazni, meg kellett határoznunk, hogy a GEM-LTB₄ expressziója mennyire befolyásolja a leukociták LTB₄-re adott válaszát.

A GEM-LTB₄ kifejeződés leukocita migrációra gyakorolt hatását különböző exogén LTB₄ koncentrációk mellett vizsgáltuk. Vad típusú zebraalakban az LTB₄ koncentráció növelésével megnövekszik a hemopoetikus szövetből a halak úszójába vándorló immunsejtek száma^{146,147}. A GEM-LTB₄-et kifejező lárvák esetében az alacsonyabb (30 nM) nanomoláros koncentrációk esetén szignifikánsan csökkent a mobilis neutrofilek száma, a vad és a mutáns szenzort expresszáló egyedekéhez képest (21.a ábra). Ez a jelenség a GPCR alapú szenzoroknál már leírt pufferező hatásra vezethető vissza¹⁴⁸. A GEM-LTB₄ nagy mértékű és kiterjedésű epiteliális expressziója, a BLT1 receptoréval megegyező ligandkötési tulajdonságai miatt, az alacsony koncentrációban jelenlévő LTB₄ molekulák

megkötése révén kisebb mértékű leukocita választ idéz elő. A nagyobb, szaturáló dózishoz közelítő koncentrációk esetén a vad típustól való eltérés már nem bizonyult szignifikánsnak, ahogy a farokúszó amputációra adott korai migrációs válaszok sem változtak a transzgenikus egyedekben (21.b ábra).



21. ábra. A GEM-LTB₄ szenzorok expressziójának hatása a leukocita migrációra zebra-
rahalakban.

a) Különböző LTB₄ dózisok használatára a zebrahalak notokordjából kirajzó leukociták számának átlaga vad típusú, GEM-LTB₄ és GEM-LTB₄mut egyedekben (átlag ± SEM, n=5-6 lárva, a különböző koncentrációkra egyedileg elvégzett egyoldali ANOVA a kontroll, 10- 30 és 100 nM-os koncentráció esetében F=5,773, és p=0,016). **b)** A leukocita migráció mértéke farokúszó amputációt követően vad típusú és GEM-LTB₄-et expresszáló zebrahal lárvákban (átlag ± SEM, n=8-11 lárva, kétoldali T próba, p=0,275)⁷⁶.

5. Megbeszélés

Kutatásunk során létrehoztunk egy LTB_4 detektálására alkalmas fluoreszcens bioszenzort, mely mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között nagy affinitással és specificitással jelzi ligandja jelenlétét. A GEM- LTB_4 arachidonsav és eikozanoid származékainak kötési tulajdonságai megegyeznek a szenzor vázát adó BLT1 receptoréval, az LTB_4 szenzorhoz való kötődése azonban nem indítja el a receptor szignalizációs útvonalait. Ennek valószínűsíthetően a harmadik intracelluláris hurokrégióba elhelyezett cpEGFP az oka, amely méretéből és elhelyezkedéséből adódóan gátolja a G-fehérje receptorhoz kötődését. Ezáltal a GEM- LTB_4 , a BLT1 receptorral ellentétben, az LTB_4 kötését követően megőrzi ligandkötési képességét és nem internalizálódik. A szenzor ezen tulajdonságai hosszan fennálló nagy koncentrációjú LTB_4 jelenlétében sem változnak⁷⁶. A membránban való folyamatos jelenlét és a deszenzitizáció hiánya elengedhetetlen az extracelluláris LTB_4 koncentrációk dinamikus változásainak nyomonkövetéséhez.

A GEM- LTB_4 használata lehetőséget ad az LTB_4 szekréció és disztribúció vizsgálatára. A kemotaxis folyamatáról szerzett tudásunk alapját olyan szövetkultúrákon végzett kísérletek adják, melyekben a vizsgált sejtek egy exogén módon alkalmazott kemokin grádiens felé vándorolnak^{149,150}. Ezek a modellek, bár alkalmasak a tér- és időbeli kemokin gradiens terjedés matematikai modellezésére, a szövetekben fiziológiás körülmények között lezajló folyamatokat csak részlegesen írják le¹⁵¹. Erre szolgál megoldásként a különböző szövetekben és sejttípusokban kifejezett bioszenzorok alkalmazása. Kísérleteink során a zebrafish farokúszó laphám, bazális és mezenchimális sejteiben expresszálandó szenzorok amputációt követő $1\ \mu\text{M}$ koncentrációjú exogén LTB_4 stimulusra adott válaszait detektáltuk. A három vizsgált sejttípus közül a mezenchimális sejtekben mért fluoreszcencia intenzitásváltozások alacsonyabb értékeket mutattak, mint amiket a laphám és a bazális sejtekben mértünk. Ezen eltérés egyedül a bazális sejtekhez mérten bizonyult szignifikánsnak ($p=0,032$). E jelenség okai még további vizsgálatra szorulnak, azonban magyarázatot adhat rá a sejttípusok elhelyezkedésének és az LTB_4 penetrációs és diffúziós tulajdonságainak szöveten belüli eltérése. Az eredményt okozhatja még a különböző sejtek GEM- LTB_4 expressziós mintázatainak különbsége, a gyenge vagy túl erős génkifejeződés befolyásolhatja a plazmamembránba való kihelyeződés mértékét, ezzel csökkentve a fluoreszcencia

intenzitásváltozás detektálhatóságát.

Egy kellően érzékeny GEM-LTB₄ állatmodell használata lehetőséget nyújt nemcsak az LTb₄ termelődés és lebomlás dinamikájának valós idejű vizsgálatára, hanem a kemoattraktáns termelődés pontos sejtszintű lokalizációjának meghatározására is.

Ezen felül segíthet a neutrofil granulociták különböző populációinak vizsgálatában. A neutrofil granulociták génexpressziós mintázatait, sejt felszínükön található receptorait, enzimek szintjét és enzimaktivitásukat érettségük, aktivációs állapotuk, de szöveti lokalizációjuk és az őket körülvevő mikrokörnyezet is befolyásolja¹⁵². A neutrofil klaszterképződésben megfigyelhetők a neutrofil populációk LTb₄ termelésre gyakorolt hatásai. A szoros közelségben lévő különböző, az LTb₄ szintézishez szükséges enzimaktivitási szintekkel rendelkező neutrofil granulociták közötti transzcelluláris bioszintézis fokozza a kemoattraktáns termelését, ezáltal létrehozva a neutrofil rajzást¹⁵³. Az általunk fejlesztett szenzor pontosabb képet adhat a neutrofil populációk közötti LTb₄ termelés mennyiségi eltéréseire; a termelődést és lebontást meghatározó transzcelluláris kapcsolatok leírására és ezen jelenségek a sejtek migrációjára és a neutrofil rajzás kialakulására gyakorolt hatásaira.

Bár a GEM-LTB₄ használata sok kérdés megválaszolására szolgálhat kiváló eszközként, használata közben bizonyos korlátokat mégis figyelembe kell vennünk. A szenzor hatékony működésének alapját szerkezete adja, melynek két komponense az LTb₄ nagy affinitású receptora, a BLT1 és a cpEGFP fluoreszcens fehérje. A szenzor nagyfokú expressziója, a BLT1 receptorral megegyező ligandkötési tulajdonságai miatt csökkentheti az endogén módon felszabaduló LTb₄ receptoraihoz való kötődési valószínűségét. Kísérleteink során a szenzor bazális hámsejtekben való kifejezése nem befolyásolta a farokúszó amputációra adott leukocita migrációt, de a különböző exogén LTb₄ dózisokra a migrációban részt vevő leukociták száma az alacsonyabb koncentrációk esetén megváltozott a szenzort nem, vagy annak mutáns változatát expresszáló lárvákhoz képest. A GEM-LTB₄ ezen tulajdonsága nem egyedi; a GPCR-alapú szenzorok működési mechanizmusa révén több ezen elven működő bioszenzor esetében, mint például a dopamin szenzor dLight, vagy a GRAB_{ATP 1.0} figyeltek meg hasonló puffer hatásokat¹⁵⁴.

A GEM-LTB₄ elengedhetetlen komponense a szenzor harmadik intracelluláris hurkába illesztett cpEGFP, amely pH érzékenységet nem hagyhatjuk figyelmen kívül. Míg az

extracelluláris pH megváltozása minimálisan befolyásolja a GPCR-alapú szenzorok aktivitását, addig a szenzort expresszáló sejtek intracelluláris terében bekövetkező pH változás megváltoztathatja a vizsgált fluoreszcens szignál mértékét^{155,156}. Ezért a pH és egyéb nem ligand specifikus környezeti hatások okozta változások felismeréséért a méréseink kontrolljaként használt mutáns szenzorvariáns alkalmazása minden kísérleti felállásban ajánlott.

A megfelelő immunológiai válasz kialakításában szükséges a kemokinek jelenléte, melyek közül az LTB₄ kulcsfontosságú a neutrofil granulociták toborzásában¹⁷. Az LTB₄ termelés indikációjában és szabályozásában több kemoattraktáns molekula, mint az fMLP, C5a vagy a PGE₂ vesz részt, melyek valós idejű monitorozása közelebb vihet minket a gyulladás kialakulásának és feloldásának megértéséhez^{150,157}. Ebben segítségünkre lehet az egyéb kemoattraktánsokra és kemokinekre specifikus GPCR-alapú bioszenzorok fejlesztése. További lehetőségeket nyithat meg előttünk ha a cirkulárisan permutált zöld fluoreszcens protein helyett más hullámhosszon emittáló fluoreszcens proteint tartalmazó bioszenzort fejlesztünk, mint például a piros fluoreszcens mApple-t vagy mScarlet-et^{158,159}. A különböző ligandra specifikus zöld és piros fluoreszcens bioszenzorok együttes alkalmazása a kemoattraktánsok egymáshoz viszonyított időbeli megjelenésére, a kemokingrádiensek egymásra és neutrofil migrációra gyakorolt együttes hatásaira is magyarázatot adhatnak.

6. Következtetések

A kutatómunka során kapott eredmények alapján a következő megállapításokat tehetjük:

- Létrehoztunk egy LTB_4 detektálására alkalmas fluoreszcens bioszenzort, a GEM- LTB_4 -et, mely specifikusan és nagy érzékenységgel jelzi a mediátor molekula jelenlétét. A GEM- LTB_4 ligandkötési specificitása nagy hasonlóságot mutat a szenzor vázát adó BLT1 receptoréhoz. Az általunk vizsgált eikozanoidok közül az LTB_4 mellett, egyedül a receptort aktiváló 20-OH- LTB_4 okozott mérhető fluoreszcencia intenzitásváltozást. Az LTB_4 szenzor már az 5nM körüli LTB_4 koncentráció jelenlétét is megbízhatóan tudja detektálni. Ezen felül lényeges tulajdonsága, hogy a ligandkötése során nem indítja el a BLT1 receptor jelátviteli útvonalaikat, így nem következik be a bioszenzor deszenzitizációja és internalizációja.
- A GEM- LTB_4 -et stabilan expresszáló HEK293A sejtek alkalmazásával valós időben tudtuk az izolált egér neutrofilekből fMLP stimulus hatására felszabaduló LTB_4 jelenlétét detektálni. Méréseink során az egyedi aktivált neutrofilekből felszabaduló LTB_4 grádiensek terjedését is kimutattuk.
- A transzgenikus zebrahal egyedek laphám, bazális és mezenchimális sejtjeiben kifejezett GEM- LTB_4 -gyel a zebrahal lárvák farokúszó amputációját követően detektáltuk az exogén LTB_4 jelenlétét, majd a $\text{Tg}(krt4::\text{GEM-LTB}_4)$ egyedeken vizualizáltuk az LTB_4 grádiens tér-és időbeli bejutását a zebrahal farokúszó szövetébe. Végezetül a zebrahal lárvák bazális sejtjeiben kifejezett bioszenzorunkkal sikeresen regisztráltuk a kalciumionofór A23187 hatására aktiválódott leukocitákból felszabaduló endogén LTB_4 jelenlétét.

7. Összefoglalás

Az LTB₄ egy leukociták által termelt lipid mediátor, mely kemoattraktáns hatása révén fontos szerepet tölt be a gyulladásos folyamatokban. Bár az LTB₄ jelátviteli útvonalait és hatásmechanizmusait részletesen feltárták, a steril szöveti sebzést követő szerepe, valamint az aktivált immunsejtekből felszabaduló LTB₄ szöveti eloszlása kevésbé ismert: nem ismert, hogy fehérvérsejtekből felszabadulva milyen messze diffundál és milyen távoli sejtekre hat. Kutatómunkánk céljából egy olyan bioszenzor fejlesztését tűztük ki, ami lehetőséget ad az endogén módon felszabaduló LTB₄ szöveti eloszlásának vizsgálatára.

Az általunk fejlesztett bioszenzor vázát az LTB₄ nagy affinitású receptora a BLT1 receptor képezi. A receptor harmadik intracelluláris hurokrégiójához különböző linker régiók használatával egy cirkulárisan permutált zöld fluoreszcens fehérjét fuzionáltunk. A linker régiók módosításával számos szenzorvariánst hoztunk létre, amelyek közül a sejten belüli elhelyezkedésük és az LTB₄-re adott fluoreszcencia intenzitásváltozásuk alapján kiválasztottuk a legjobb tulajdonságokkal rendelkezőt, amit GEM-LTB₄-nek neveztünk el. Az LTB₄ jelenlétére GEM-LTB₄ koncentrációfüggő módon reagál (EC₅₀=19,8 nM). A szenzor ligandkötési tulajdonságai megegyeznek a BLT1 receptoréval, azonban az endogén receptor jelpályáit nem aktiválja. A szenzor karakterizálást követően, a GEM-LTB₄-gyel egér neutrofil granulociták LTB₄ termelését vizsgáltuk. A szenzor használatával vizualizáltuk az fMLP stimulus hatására felszabaduló LTB₄-et, valamint az egyedi neutrofilekből származó LTB₄ grádiensek megjelenését.

A QF2-QUAS rendszer alkalmazásával a GEM-LTB₄ bioszenzort sejtspecifikusan fejeztük ki zebrahál lárvákban. A transzgenikus zebradánió vonalakban farokúszó sebzést követően nyomon követtük az exogén LTB₄ szövetekbe való bejutását és diffúzióját. Ezen felül sikeresen detektáltuk a kalciumionofór hatására zebrahál neutrofilekből felszabaduló endogén LTB₄ jelenlétét.

Összességében, munkánk során létrehoztunk egy LTB₄-re specifikus, nagy szenzitivitással rendelkező, konfokális mikroszkóppal jól detektálható szenzort, mellyel nemcsak *ex vivo*, de *in vivo* állatmodellen is képesek voltunk az exogén és endogén LTB₄ jelenlétének kimutatására.

8. Summary

Leukotriene B₄ (LTB₄) plays a prominent role in launching and propagating inflammatory responses. Acting as a signal relay molecule, LTB₄ creates local and long-range gradients to orchestrate leukocyte recruitment and neutrophil swarming during tissue damage. Despite its profound biological relevance, we lack tools to directly measure and visualize these chemoattractant gradients *in vivo*. Our aim was to create a genetically encoded biosensor to detect and monitor levels of LTB₄ *ex vivo* and *in vivo*. We developed GEM-LTB₄, a GPCR-based fluorescent indicator by inserting a circularly permuted EGFP (cpEGFP) module into the third intracellular loop of the high-affinity LTB₄ receptor, BLT1. We optimized and increased the sensitivity of our sensor by screening different length and amino acid composition linkers flanking the cpEGFP module. The best version, namely GEM-LTB₄, shows precise membrane localization, high affinity (EC₅₀=19.8 nM) and specificity towards LTB₄. To measure endogenous LTB₄ concentrations, we isolated murine neutrophils and seeded them on GEM-LTB₄ expressing cells. When activated with fMLP, we detected an overall increase in LTB₄ production and also captured LTB₄ derived from individual neutrophils. With the use of the QF2-QUAS system, we created a transgenic GEM-LTB₄ expressing zebrafish lines. In these transgenic zebrafish lines, we monitored the penetration and tissue diffusion of exogenous LTB₄ following tailfin injury. Additionally, we successfully detected endogenous LTB₄ released from zebrafish neutrophils following a calcium ionophore stimulus.

In summary, we developed a highly sensitive, LTB₄ specific fluorescent biosensor that can be reliably detected with confocal microscopy. Using this sensor, we were able to visualize both exogenous and endogenous LTB₄ not only *ex vivo*, but also *in vivo* in an animal model.

9. Irodalomjegyzék

1. Wu D. Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. en. *Cell Research* 2005 Jan; 15:52–56. old. DOI: 10.1038/sj.cr.7290265
2. Jin T, Xu X és Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 2008 Oct; 44:1–8. old. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.06.017
3. Showell HJ, Freer RJ, Zigmond SH, Schiffmann E, Aswanikumar S, Corcoran B és Becker EL. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 1976 May; 143:1154–1169. old. DOI: 10.1084/jem.143.5.1154
4. Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, McCann CP, Oliver CM, Aamer KA, Losert W, Cicerone MT és Parent CA. LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. eng. *Developmental Cell* 2012 May; 22:1079–1091. old. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.02.003
5. Lauffenburger DA és Horwitz AF. *Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process*. English. *Cell* 1996 Feb; 84:359–369. old. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81280-5
6. Sánchez-Madrid F és Pozo MA del. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. eng. *The EMBO journal* 1999 Feb; 18:501–511. old. DOI: 10.1093/emboj/18.3.501
7. Roussos ET, Condeelis JS és Patsialou A. Chemotaxis in cancer. en. *Nature Reviews Cancer* 2011 Aug; 11:573–587. old. DOI: 10.1038/nrc3078
8. Ng LG, Ostuni R és Hidalgo A. Heterogeneity of neutrophils. eng. *Nature Reviews Immunology* 2019 Apr; 19:255–265. old. DOI: 10.1038/s41577-019-0141-8
9. Petri B, Phillipson M és Kubes P. The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective. *The Journal of Immunology* 2008 May; 180:6439–6446. old. DOI: 10.4049/jimmunol.180.10.6439
10. Powell D, Lou M, Barros Becker F és Huttenlocher A. Cxcr1 mediates recruitment of neutrophils and supports proliferation of tumor-initiating astrocytes in vivo. en. *Scientific Reports* 2018 Sep; 8:13285. old. DOI: 10.1038/s41598-018-31675-0

11. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM és Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of Experimental Medicine* 2006 Nov; 203:2569–2575. old. DOI: 10.1084/jem.20060925
12. Németh T, Sperandio M és Mócsai A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. *en. Nature Reviews Drug Discovery* 2020 Apr; 19:253–275. old. DOI: 10.1038/s41573-019-0054-z
13. Woodfin A, Reichel CA, Khandoga A, Corada M, Voisin MB, Scheierrmann C, Haskard DO, Dejana E, Krombach F és Nourshargh S. JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood* 2007 Sep; 110:1848–1856. old. DOI: 10.1182/blood-2006-09-047431
14. Voisin MB és Nourshargh S. Neutrophil Transmigration: Emergence of an Adhesive Cascade within Venular Walls. *Journal of Innate Immunity* 2013 Jun; 5:336–347. old. DOI: 10.1159/000346659
15. McDonald B és Kubes P. Chemokines: Sirens of Neutrophil Recruitment—but Is It Just One Song? *English. Immunity* 2010 Aug; 33:148–149. old. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.006
16. Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y és Luster AD. Lipid-Cytokine-Chemokine Cascade Drives Neutrophil Recruitment in a Murine Model of Inflammatory Arthritis. *Immunity* 2010 Aug; 33:266–278. old. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.07.018
17. Lämmermann T, Afonso PV, Angermann BR, Wang JM, Kastenmüller W, Parent CA és Germain RN. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *en. Nature* 2013 Jun; 498:371–375. old. DOI: 10.1038/nature12175
18. Futosi K, Fodor S és Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology* 2013 Nov; 17:638–650. old. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.06.034

19. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. en. *Nature Reviews Immunology* 2006 Mar; 6:173–182. old. DOI: 10.1038/nri1785
20. S R, O Ø, Nh H és N B. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. en. *Journal of leukocyte biology* 2013 Oct; 94. DOI: 10.1189/jlb.1212619
21. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? English. *Frontiers in Physiology* 2018 Feb; 9. DOI: 10.3389/fphys.2018.00113
22. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y és Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004 Mar; 303:1532–1535. old. DOI: 10.1126/science.1092385
23. Kolaczkowska E és Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. en. *Nature Reviews Immunology* 2013 Mar; 13:159–175. old. DOI: 10.1038/nri3399
24. Papayannopoulos V és Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. English. *Trends in Immunology* 2009 Nov; 30:513–521. old. DOI: 10.1016/j.it.2009.07.011
25. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, Nash GB, Chavakis T, Albelda SM, Rainger GE, Meda P, Imhof BA és Nourshargh S. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. en. *Nature Immunology* 2011 Aug; 12:761–769. old. DOI: 10.1038/ni.2062
26. Nourshargh S, Renshaw SA és Imhof BA. Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why? English. *Trends in Immunology* 2016 May; 37:273–286. old. DOI: 10.1016/j.it.2016.03.006
27. Loynes CA, Lee JA, Robertson AL, Steel MJ, Ellett F, Feng Y, Levy BD, Whyte MK és Renshaw SA. PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation.

- tion resolution in vivo. *Science Advances* 2018 Sep; 4eaar8320. DOI: 10.1126/sciadv.aar8320
28. Coombs C, Georgantzoglou A, Walker HA, Patt J, Merten N, Poplimont H, Busch-Nentwich EM, Williams S, Kotsi C, Kostenis E és Sarris M. Chemokine receptor trafficking coordinates neutrophil clustering and dispersal at wounds in zebrafish. *Nature Communications* 2019 Nov; 105166. old. DOI: 10.1038/s41467-019-13107-3
 29. He R, Chen Y és Cai Q. The role of the LTB4-BLT1 axis in health and disease. *eng. Pharmacological Research* 2020; 158104857. old. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104857
 30. Peters-Golden M és Henderson WR. Leukotrienes. *New England Journal of Medicine* 2007; 3571841–1854. old. DOI: 10.1056/NEJMr071371
 31. Uozumi N, Kume K, Nagase T, Nakatani N, Ishii S, Tashiro F, Komagata Y, Maki K, Ikuta K, Ouchi Y, Miyazaki Ji és Shimizu T. Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *en. Nature* 1997 Dec; 390618–622. old. DOI: 10.1038/37622
 32. Enyedi B, Jelcic M és Niethammer P. The Cell Nucleus Serves as a Mechanotransducer of Tissue Damage-Induced Inflammation. *en. Cell* 2016 May; 1651160–1170. old. DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.016
 33. Dixon RaF, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW és Miller DK. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *en. Nature* 1990 Jan; 343282–284. old. DOI: 10.1038/343282a0
 34. Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J és Somers WS. Crystal Structure of Human Cytosolic Phospholipase A2 Reveals a Novel Topology and Catalytic Mechanism. *English. Cell* 1999 Apr; 97349–360. old. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80744-8
 35. Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, Neau DB, Boeglin WE, Brash AR és Newcomer ME. The structure of human 5-lipoxygenase. *Science (New York, N.Y.)* 2011 Jan; 331217–219. old. DOI: 10.1126/science.1197203

36. Sala A, Bolla M, Zarini S, Müller-Peddinghaus R és Folco G. Release of Leukotriene A₄ Versus Leukotriene B₄ from Human Polymorphonuclear Leukocytes*. *Journal of Biological Chemistry* 1996 Jul; 271:17944–17948. old. DOI: 10.1074/jbc.271.30.17944
37. Fabre JE, Goulet JL, Riche E, Nguyen M, Coggins K, Offenbacher S és Koller BH. Transcellular biosynthesis contributes to the production of leukotrienes during inflammatory responses in vivo. *eng. The Journal of Clinical Investigation* 2002 May; 109:1373–1380. old. DOI: 10.1172/JCI14869
38. Tager AM és Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B₄ receptors. *eng. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 2003; 69:123–134. old. DOI: 10.1016/s0952-3278(03)00073-5
39. Narala VR, Adapala RK, Suresh MV, Brock TG, Peters-Golden M és Reddy RC. Leukotriene B₄ Is a Physiologically Relevant Endogenous Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α Agonist. *The Journal of Biological Chemistry* 2010 Jul; 285:22067–22074. old. DOI: 10.1074/jbc.M109.085118
40. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y és Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *en. Nature* 1997 Jun; 387:620–624. old. DOI: 10.1038/42506
41. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T és Shimizu T. A Second Leukotriene B₄ Receptor, Blt2. *The Journal of Experimental Medicine* 2000 Aug; 192:421–432. old. DOI: 10.1084/jem.192.3.421
42. Nakamura M és Shimizu T. Leukotriene Receptors. *Chemical Reviews* 2011 Oct; 111:6231–6298. old. DOI: 10.1021/cr100392s
43. Saeki K és Yokomizo T. Identification, signaling, and functions of LTB₄ receptors. *Seminars in Immunology. Leukotriene B₄ Mediated Inflammation* 2017 Oct; 33:30–36. old. DOI: 10.1016/j.smim.2017.07.010
44. Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T és Shimizu T. Hydroxyeicosanoids Bind to and Activate the Low Affinity Leukotriene B₄ Receptor, BLT2*. *Journal of*

- Biological Chemistry 2001 Apr; 276:12454–12459. old. DOI: 10.1074/jbc.M011361200
45. Ritter SL és Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2009 Dec; 10:819–830. old. DOI: 10.1038/nrm2803
 46. Subramanian BC, Majumdar R és Parent CA. THE ROLE OF LTB₄-BLT1 AXIS IN CHEMOTACTIC GRADIENT SENSING AND DIRECTED LEUKOCYTE MIGRATION. *Seminars in immunology* 2017 Oct; 33:16–29. old. DOI: 10.1016/j.smim.2017.07.002
 47. Suire S, Lécureuil C, Anderson KE, Damoulakis G, Niewczas I, Davidson K, GUILLOU H, Pan D, Jonathan Clark n, Phillip T Hawkins n és Stephens L. GPCR activation of Ras and PI3Kc in neutrophils depends on PLCb2/b3 and the RasGEF RasGRP4. *eng. The EMBO journal* 2012 Jul; 31:3118–3129. old. DOI: 10.1038/emboj.2012.167
 48. Xu J, Wang F, Keymeulen AV, Herzmark P, Straight A, Kelly K, Takuwa Y, Sugimoto N, Mitchison T és Bourne HR. Divergent Signals and Cytoskeletal Assemblies Regulate Self-Organizing Polarity in Neutrophils. *English. Cell* 2003 Jul; 114. Publisher: Elsevier 201–214. old. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00555-5
 49. Eddy RJ, Pierini LM, Matsumura F és Maxfield FR. Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *Journal of Cell Science* 2000 Apr; 113:1287–1298. old. DOI: 10.1242/jcs.113.7.1287
 50. Canetti C, Hu B, Curtis JL és Peters-Golden M. Syk activation is a leukotriene B₄-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. *eng. Blood* 2003 Sep; 102:1877–1883. old. DOI: 10.1182/blood-2003-02-0534
 51. Serezani CH, Lewis C, Jancar S és Peters-Golden M. Leukotriene B₄ amplifies NF-κB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. *en. The Journal of Clinical Investigation* 2011 Feb; 121:671–682. old. DOI: 10.1172/JCI43302

52. Ishii Y, Saeki K, Liu M, Sasaki F, Koga T, Kitajima K, Meno C, Okuno T és Yokomizo T. Leukotriene B4 receptor type 2 (BLT2) enhances skin barrier function by regulating tight junction proteins. eng. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2016 Feb; 30933–947. old. DOI: 10.1096/fj.15-279653
53. Iizuka Y, Okuno T, Saeki K, Uozaki H, Okada S, Misaka T, Sato T, Toh H, Fukayama M, Takeda N, Kita Y, Shimizu T, Nakamura M és Yokomizo T. Protective role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in murine inflammatory colitis. eng. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2010; 244678–4690. old. DOI: 10.1096/fj.10-165050
54. Chiba T, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Yokomizo T, Uchi H és Furue M. The leukotriene B4 receptor BLT2 protects barrier function via actin polymerization with phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 in human keratinocytes. eng. Experimental Dermatology 2016 Jul; 25532–536. old. DOI: 10.1111/exd.12976
55. Chen Z, Gaudreau R, Le Gouill C, Rola-Pleszczynski M és Stanková J. Agonist-induced internalization of leukotriene B(4) receptor 1 requires G-protein-coupled receptor kinase 2 but not arrestins. eng. Molecular Pharmacology 2004 Sep; 66377–386. old. DOI: 10.1124/mol.66.3.
56. Jala VR, Shao WH és Haribabu B. Phosphorylation-independent β -Arrestin Translocation and Internalization of Leukotriene B4 Receptors *. English. Journal of Biological Chemistry 2005 Feb; 2804880–4887. old. DOI: 10.1074/jbc.M409821200
57. Tatsumi R, Aihara S, Matsune S, Aoki J, Inoue A, Shimizu T és Nakamura M. Step-wise phosphorylation of BLT1 defines complex assemblies with β -arrestin serving distinct functions. eng. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2023; 37e23213. DOI: 10.1096/fj.202301440R

58. Subramanian BC, Moissoglu K és Parent CA. The LTB₄–BLT1 axis regulates the polarized trafficking of chemoattractant GPCRs during neutrophil chemotaxis. *Journal of Cell Science* 2018 Sep; 131jcs217422. DOI: 10.1242/jcs.217422
59. Soberman RJ, Okita RT, Fitzsimmons B, Rokach J, Spur B és Austen KF. Stereochemical requirements for substrate specificity of LTB₄ 20-hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* 1987 Sep; 26212421–12427. old. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)45220-9
60. Christmas P, Tolentino K, Primo V, Berry KZ, Murphy RC, Chen M, Lee DM és Soberman RJ. Cytochrome P-450 4F18 Is the Leukotriene B₄ ω -1/ ω -2 Hydroxylase in Mouse Polymorphonuclear Leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2006 Mar; 2817189–7196. old. DOI: 10.1074/jbc.M513101200
61. Archambault AS, Poirier S, Lefebvre JS, Robichaud PP, Larose MC, Turcotte C, Martin C, Provost V, Boudreau LH, McDonald PP, Laviolette M, Surette ME és Flamand N. 20-Hydroxy- and 20-carboxy-leukotriene (LT) B₄ downregulate LTB₄-mediated responses of human neutrophils and eosinophils. en. *Journal of Leukocyte Biology* 2019; 1051131–1142. old. DOI: 10.1002/JLB.MA0718-306R
62. Sumimoto H és Minakami S. Oxidation of 20-hydroxyleukotriene B₄ to 20-carboxyleukotriene B₄ by human neutrophil microsomes. Role of aldehyde dehydrogenase and leukotriene B₄ omega-hydroxylase (cytochrome P-450LTB omega) in leukotriene B₄ omega-oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 1990 Mar; 2654348–4353. old. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)39570-5
63. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ és Wahli W. The PPAR α –leukotriene B₄ pathway to inflammation control. en. *Nature* 1996 Nov; 38439–43. old. DOI: 10.1038/384039a0
64. Shimomura O, Johnson FH és Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. en. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 1962; 59223–239. old. DOI: 10.1002/jcp.1030590302

65. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG és Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992 Feb; 111229–233. old. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90691-H
66. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW és Prasher DC. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* 1994 Feb; 263802–805. old. DOI: 10.1126/science.8303295
67. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S és Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *eng. Physiological Reviews* 2010 Jul; 901103–1163. old. DOI: 10.1152/physrev.00038.2009
68. Frei MS, Mehta S és Zhang J. Next-Generation Genetically Encoded Fluorescent Biosensors Illuminate Cell Signaling and Metabolism. *en. Annual Review of Biophysics* 2024 Jul; 53275–297. old. DOI: 10.1146/annurev-biophys-030722-021359
69. Greenwald EC, Mehta S és Zhang J. Genetically Encoded Fluorescent Biosensors Illuminate the Spatiotemporal Regulation of Signaling Networks. *Chemical reviews* 2018 Dec; 11811707–11794. old. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00333
70. Dong C, Zheng Y, Long-lyer K, Wright EC, Li Y és Tian L. Fluorescence Imaging of Neural Activity, Neurochemical Dynamics and Drug-Specific Receptor Conformation with Genetically-Encoded Sensors. *Annual review of neuroscience* 2022 Jul; 45273–294. old. DOI: 10.1146/annurev-neuro-110520-031137
71. Ravotto L, Duffet L, Zhou X, Weber B és Patriarchi T. A Bright and Colorful Future for G-Protein Coupled Receptor Sensors. *English. Frontiers in Cellular Neuroscience* 2020 Mar; 14. DOI: 10.3389/fncel.2020.00067
72. Sabatini BL és Tian L. Imaging Neurotransmitter and Neuromodulator Dynamics In Vivo with Genetically Encoded Indicators. *English. Neuron* 2020 Oct; 10817–32. old. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.09.036
73. Aggarwal A, Liu R, Chen Y, Ralowicz AJ, Bergerson SJ, Tomaska F, Mohar B, Hanson TL, Hasseman JP, Reep D, Tsegaye G, Yao P, Ji X, Kloos M, Walpita D, Patel R, Mohr MA, Tillberg PW, Looger LL, Marvin JS, Hoppa MB, Konnerth

- A, Kleinfeld D, Schreiter ER és Podgorski K. Glutamate indicators with improved activation kinetics and localization for imaging synaptic transmission. en. *Nature Methods* 2023 Jun; 20925–934. old. DOI: 10.1038/s41592-023-01863-6
74. Zhang WH, Herde MK, Mitchell JA, Whitfield JH, Wulff AB, Vongsouthi V, Sanchez-Romero I, Gulakova PE, Minge D, Breithausen B, Schoch S, Janovjak H, Jackson CJ és Henneberger C. Monitoring hippocampal glycine with the computationally designed optical sensor GlyFS. en. *Nature Chemical Biology* 2018 Sep; 14861–869. old. DOI: 10.1038/s41589-018-0108-2
 75. Patriarchi T, Cho JR, Merten K, Howe MW, Marley A, Xiong WH, Folk RW, Broussard GJ, Liang R, Jang MJ, Zhong H, Dombeck D, Zastrow M von, Nimmerjahn A, Gradinaru V, Williams JT és Tian L. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science* 2018 Jun; 360eaat4422. DOI: 10.1126/science.aat4422
 76. Tamás SX, Roux BT, Vámosi B, Dehne FG, Török A, Fazekas L és Enyedi B. A genetically encoded sensor for visualizing leukotriene B4 gradients in vivo. en. *Nature Communications* 2023 Aug; 144610. old. DOI: 10.1038/s41467-023-40326-6
 77. St-Pierre F, Chavarha M és Lin MZ. Designs and sensing mechanisms of genetically encoded fluorescent voltage indicators. *Current Opinion in Chemical Biology. Molecular imaging* 2015 Aug; 2731–38. old. DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.05.003
 78. Massengill CI, Day-Cooney J, Mao T és Zhong H. Genetically encoded sensors towards imaging cAMP and PKA activity *in vivo*. *Journal of Neuroscience Methods* 2021 Oct; 362109298. old. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2021.109298
 79. Austen K, Ringer P, Mehlich A, Chrostek-Grashoff A, Kluger C, Klingner C, Sabass B, Zent R, Rief M és Grashoff C. Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages. *Nature cell biology* 2015 Dec; 171597–1606. old. DOI: 10.1038/ncb3268
 80. Kiyonaka S, Kajimoto T, Sakaguchi R, Shinmi D, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Imamura H, Yoshizaki T, Hamachi I, Morii T és Mori Y. Genetically encoded

- fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. en. *Nature Methods* 2013 Dec; 101232–1238. old. DOI: 10.1038/nmeth.2690
81. Mahajan NP, Harrison-Shostak DC, Michaux J és Herman B. Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis. eng. *Chemistry & Biology* 1999 Jun; 6401–409. old. DOI: 10.1016/s1074-5521(99)80051-9
 82. Zhang Y, Rózsa M, Liang Y, Bushey D, Wei Z, Zheng J, Reep D, Broussard GJ, Tsang A, Tsegaye G, Narayan S, Obara CJ, Lim JX, Patel R, Zhang R, Ahrens MB, Turner GC, Wang SSH, Korff WL, Schreiter ER, Svoboda K, Hasseman JP, Kolb I és Looger LL. Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. en. *Nature* 2023 Mar; 615884–891. old. DOI: 10.1038/s41586-023-05828-9
 83. Schmitt DL, Mehta S és Zhang J. Illuminating the kinome: visualizing real-time kinase activity in biological systems using genetically encoded fluorescent protein-based biosensors. *Current opinion in chemical biology* 2020 Feb; 5463–69. old. DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.11.005
 84. Chen M, Sun T, Zhong Y, Zhou X és Zhang J. A Highly Sensitive Fluorescent Akt Biosensor Reveals Lysosome-Selective Regulation of Lipid Second Messengers and Kinase Activity. eng. *ACS central science* 2021; 72009–2020. old. DOI: 10.1021/acscentsci.1c00919
 85. Zhang JF, Liu B, Hong I, Mo A, Roth RH, Tenner B, Lin W, Zhang JZ, Molina RS, Drobizhev M, Hughes TE, Tian L, Huganir RL, Mehta S és Zhang J. An ultrasensitive biosensor for high-resolution kinase activity imaging in awake mice. *Nature chemical biology* 2021 Jan; 1739–46. old. DOI: 10.1038/s41589-020-00660-y
 86. Xue L, Schnacke P, Frei MS, Koch B, Hiblot J, Wombacher R, Fabritz S és Johnsson K. Probing coenzyme A homeostasis with semisynthetic biosensors. en. *Nature Chemical Biology* 2023 Mar; 19346–355. old. DOI: 10.1038/s41589-022-01172-7

87. Quijano-Rubio A, Yeh HW, Park J, Lee H, Langan RA, Boyken SE, Lajoie MJ, Cao L, Chow CM, Miranda MC, Wi J, Hong HJ, Stewart L, Oh BH és Baker D. De novo design of modular and tunable protein biosensors. en. *Nature* 2021 Mar; 591482–487. old. DOI: 10.1038/s41586-021-03258-z
88. Rosenow MA, Huffman HA, Phail ME és Wachter RM. The Crystal Structure of the Y66L Variant of Green Fluorescent Protein Supports a Cyclization–Oxidation–Dehydration Mechanism for Chromophore Maturation, *Biochemistry* 2004 Apr; 434464–4472. old. DOI: 10.1021/bi0361315
89. Balleza E, Kim JM és Cluzel P. Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. en. *Nature Methods* 2018 Jan; 1547–51. old. DOI: 10.1038/nmeth.4509
90. Li J, Shang Z, Chen JH, Gu W, Yao L, Yang X, Sun X, Wang L, Wang T, Liu S, Li J, Hou T, Xing D, Gill DL, Li J, Wang SQ, Hou L, Zhou Y, Tang AH, Zhang X és Wang Y. Engineering of NEMO as calcium indicators with large dynamics and high sensitivity. en. *Nature Methods* 2023 Jun; 20918–924. old. DOI: 10.1038/s41592-023-01852-9
91. Lee J, Liu Z, Suzuki PH, Ahrens JF, Lai S, Lu X, Guan S és St-Pierre F. Versatile phenotype-activated cell sorting. *Science Advances* 2020 Oct; 6eabb7438. DOI: 10.1126/sciadv.abb7438
92. Yoshioka-Kobayashi K, Matsumiya M, Niino Y, Isomura A, Kori H, Miyawaki A és Kageyama R. Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock. en. *Nature* 2020 Apr; 580119–123. old. DOI: 10.1038/s41586-019-1882-z
93. Chernov KG, Redchuk TA, Omelina ES és Verkhusha VV. Near-Infrared Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools Engineered from Phytochromes. *Chemical Reviews* 2017 May; 1176423–6446. old. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00700
94. Deo C, Abdelfattah AS, Bhargava HK, Berro AJ, Falco N, Farrants H, Moeyaert B, Chupanova M, Lavis LD és Schreiter ER. The HaloTag as a general scaffold for

- far-red tunable chemigenetic indicators. en. *Nature Chemical Biology* 2021 Jun; 17718–723. old. DOI: 10.1038/s41589-021-00775-w
95. Rodriguez EA, Campbell RE, Lin JY, Lin MZ, Miyawaki A, Palmer AE, Shu X, Zhang J és Tsien RY. The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photo-active Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 2017 Feb; 42111–129. old. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.09.010
 96. Broch F és Gautier A. Illuminating Cellular Biochemistry: Fluorogenic Chemo-genetic Biosensors for Biological Imaging. en. *ChemPlusChem* 2020; 851487–1497. old. DOI: 10.1002/cplu.202000413
 97. Chia HE, Marsh ENG és Biteen JS. Extending fluorescence microscopy into anaerobic environments. *Current Opinion in Chemical Biology. Chemical Genetics and Epigenetics • Molecular Imaging* 2019 Aug; 5198–104. old. DOI: 10.1016/j.cbpa.2019.05.008
 98. Shemetov AA, Monakhov MV, Zhang Q, Canton-Josh JE, Kumar M, Chen M, Matlashov ME, Li X, Yang W, Nie L, Shcherbakova DM, Kozorovitskiy Y, Yao J, Ji N és Verkhusha VV. A near-infrared genetically encoded calcium indicator for in vivo imaging. en. *Nature Biotechnology* 2021 Mar; 39368–377. old. DOI: 10.1038/s41587-020-0710-1
 99. Shcherbakova DM, Cox Cammer N, Huisman TM, Verkhusha VV és Hodgson L. Direct multiplex imaging and optogenetics of Rho GTPases enabled by near-infrared FRET. en. *Nature Chemical Biology* 2018 Jun; 14591–600. old. DOI: 10.1038/s41589-018-0044-1
 100. Ueda T, Tamura T és Hamachi I. In Situ Construction of Protein-Based Semisynthetic Biosensors. *ACS Sensors* 2018 Mar; 3527–539. old. DOI: 10.1021/acssensors.7b00894
 101. Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H és Johnsson K. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. en. *Nature Biotechnology* 2003 Jan; 2186–89. old. DOI: 10.1038/nbt765

102. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis \textbar ACS Chemical Biology
103. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo \textbar PNAS
104. Tebo AG, Pimenta FM, Zoumpoulaki M, Kikuti C, Sirkia H, Plamont MA, Houdusse A és Gautier A. Circularly Permuted Fluorogenic Proteins for the Design of Modular Biosensors. ACS Chemical Biology 2018 Sep; 13:2392–2397. old. DOI: 10.1021/acscchembio.8b00417
105. Tebo AG és Gautier A. A split fluorescent reporter with rapid and reversible complementation. en. Nature Communications 2019 Jun; 10:102822. old. DOI: 10.1038/s41467-019-10855-0
106. Tebo AG, Moeyaert B, Thauvin M, Carlon-Andres I, Böken D, Volovitch M, Padilla-Parra S, Dedeker P, Vríz S és Gautier A. Orthogonal fluorescent chemogenetic reporters for multicolor imaging. en. Nature Chemical Biology 2021 Jan; 17:30–38. old. DOI: 10.1038/s41589-020-0611-0
107. VargaMáté. The Doctor of Delayed Publications: The Remarkable Life of George Streisinger (1927–1984). en. Zebrafish 2018 Jun. DOI: 10.1089/zeb.2017.1531
108. Howe K és tsai. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. en. Nature 2013 Apr; 496:498–503. old. DOI: 10.1038/nature12111
109. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. en. Nature 2004 Oct; 431:931–945. old. DOI: 10.1038/nature03001
110. Lele Z és Krone PH. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. Biotechnology Advances 1996 Jan; 14:57–72. old. DOI: 10.1016/0734-9750(96)00004-3
111. White R, Rose K és Zon L. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. Nature reviews. Cancer 2013 Sep; 13:624–636. old. DOI: 10.1038/nrc3589

112. Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT és Zon LI. The Use of Zebrafish to Understand Immunity. English. *Immunity* 2004 Apr; 20:367–379. old. DOI: 10.1016/S1074-7613(04)00084-6
113. Choe CP, Choi SY, Kee Y, Kim MJ, Kim SH, Lee Y, Park HC és Ro H. Transgenic fluorescent zebrafish lines that have revolutionized biomedical research. *Laboratory Animal Research* 2021 Sep; 37:26. old. DOI: 10.1186/s42826-021-00103-2
114. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DMI, Elworthy S, Ingham PW és Whyte MKB. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. eng. *Blood* 2006; 108:3976–3978. old. DOI: 10.1182/blood-2006-05-024075
115. Ellett F, Pase L, Hayman JW, Andrianopoulos A és Lieschke GJ. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* 2011 Jan; 117:e49–e56. DOI: 10.1182/blood-2010-10-314120
116. Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, Mangum BD, Hardy ME, Campbell DS, Parant JM, Yost HJ, Kanki JP és Chien CB. The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. eng. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 2007; 236:3088–3099. old. DOI: 10.1002/dvdy.21343
117. Sun F, Zhou J, Dai B, Qian T, Zeng J, Li X, Zhuo Y, Zhang Y, Wang Y, Qian C, Tan K, Feng J, Dong H, Lin D, Cui G és Li Y. Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. *Nature methods* 2020 Nov; 17:1156–1166. old. DOI: 10.1038/s41592-020-00981-9
118. Stainier DYR, Raz E, Lawson ND, Ekker SC, Burdine RD, Eisen JS, Ingham PW, Schulte-Merker S, Yelon D, Weinstein BM, Mullins MC, Wilson SW, Ramakrishnan L, Amacher SL, Neuhauss SCF, Meng A, Mochizuki N, Panula P és Moens CB. Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genetics* 2017 Oct; 13:e1007000. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007000
119. Luo J, Lu C, Wang M és Yang X. Protocol for generating mutant zebrafish using CRISPR-Cas9 followed by quantitative evaluation of vascular formation. *STAR Protocols* 2023 Dec; 4:102753. old. DOI: 10.1016/j.xpro.2023.102753

120. Burgess J, Burrows JT, Sadhak R, Chiang S, Weiss A, D'Amata C, Molinaro AM, Zhu S, Long M, Hu C, Krause HM és Pearson BJ. An optimized QF-binary expression system for use in zebrafish. *eng. Developmental Biology* 2020 Sep; 465144–156. old. DOI: 10.1016/j.ydbio.2020.07.007
121. Fazekas L, Kaszás D, Vámosi B, Tamás SX, Szöllősi T, Mihályi V, Dehne FG, Vágó-Kiss K, Al-Sheraji NM, Paulovits B, Roux BT és Enyedi B. Fibroblasts promote osmotic surveillance by wound-induced unique calcium patterns. *Journal of Cell Biology* 2025 Oct; 225e202501165. DOI: 10.1083/jcb.202501165
122. Basu S, Jala VR, Mathis S, Rajagopal ST, Del Prete A, Maturu P, Trent JO és Haribabu B. Critical role for polar residues in coupling leukotriene B4 binding to signal transduction in BLT1. *eng. The Journal of Biological Chemistry* 2007 Mar; 28210005–10017. old. DOI: 10.1074/jbc.M609552200
123. Kim JH, Lee SR, Li LH, Park HJ, Park JH, Lee KY, Kim MK, Shin BA és Choi SY. High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *en. PLOS ONE* 2011; 6e18556. DOI: 10.1371/journal.pone.0018556
124. Izsvák Z és Ivics Z. Sleeping Beauty Transposition: Biology and Applications for Molecular Therapy. *English. Molecular Therapy* 2004 Feb; 9147–156. old. DOI: 10.1016/j.ymthe.2003.11.009
125. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, Hu J, Fleming I és Wang DW. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *en. Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 Feb; 61–30. old. DOI: 10.1038/s41392-020-00443-w
126. Michaelian N, Sadybekov A, Besserer-Offroy É, Han GW, Krishnamurthy H, Zamlynny BA, Fradera X, Siliphaivanh P, Presland J, Spencer KB, Soisson SM, Popov P, Sarret P, Katritch V és Cherezov V. Structural insights on ligand recognition at the human leukotriene B4 receptor 1. *en. Nature Communications* 2021 May; 122971. old. DOI: 10.1038/s41467-021-23149-1

127. Mócsai A, Zhang H, Jakus Z, Kitaura J, Kawakami T és Lowell CA. G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. eng. *Blood* 2003 May; 1014155–4163. old. DOI: 10.1182/blood-2002-07-2346
128. White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, Bourque C, Dovey M, Goessling W, Burns CE és Zon LI. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. English. *Cell Stem Cell* 2008 Feb; 2183–189. old. DOI: 10.1016/j.stem.2007.11.002
129. Nusslein-Volhard C, Dahm R, Nusslein-Volhard C és Dahm R. Zebrafish. Practical Approach Series. Oxford, New York: Oxford University Press, 2002 Sep
130. Karlsson J, Hofsten J von és Olsson PE. Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. eng. *Marine Biotechnology* (New York, N.Y.) 2001; 3522–527. old. DOI: 10.1007/s1012601-0053-4
131. Stoskopf M és Posner LP. Chapter 21 - Anesthesia and Restraint of Laboratory Fish. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals (Second Edition)*. Szerk. Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ és Karas AZ. American College of Laboratory Animal Medicine. San Diego: Academic Press, 2008 Jan 519–534. old. DOI: 10.1016/B978-012373898-1.50025-5
132. Enyedi B, Kala S, Nikolich-Zugich T és Niethammer P. Tissue damage detection by osmotic surveillance. *Nature cell biology* 2013 Sep; 151123–1130. old. DOI: 10.1038/ncb2818
133. Gault WJ, Enyedi B és Niethammer P. Osmotic surveillance mediates rapid wound closure through nucleotide release. eng. *The Journal of Cell Biology* 2014; 207767–782. old. DOI: 10.1083/jcb.201408049
134. Katikaneni A, Jelcic M, Gerlach GF, Ma Y, Overholtzer M és Niethammer P. Lipid peroxidation regulates long-range wound detection through 5-lipoxygenase in zebrafish. eng. *Nature Cell Biology* 2020 Sep; 221049–1055. old. DOI: 10.1038/s41556-020-0564-2

135. Silberberg M és Grecco HE. Robust and unbiased estimation of the background distribution for automated quantitative imaging. eng. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision* 2023 Apr; 40C8–C15. old. DOI: 10.1364/JOSAA.477468
136. Thevenaz P, Ruttimann U és Unser M. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Transactions on Image Processing* 1998; 727–41. old. DOI: 10.1109/83.650848
137. Stringer C, Wang T, Michaelos M és Pachitariu M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. eng. *Nature Methods* 2021; 18100–106. old. DOI: 10.1038/s41592-020-01018-x
138. Löffler K, Scherr T és Mikut R. A graph-based cell tracking algorithm with few manually tunable parameters and automated segmentation error correction. en. *PLOS ONE* 2021; 16e0249257. DOI: 10.1371/journal.pone.0249257
139. Mahotas: Open source software for scriptable computer vision \textbar *Journal of Open Research Software*
140. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P és Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. eng. *Nature Methods* 2012 Jun; 9676–682. old. DOI: 10.1038/nmeth.2019
141. Enyedi B és Niethammer P. H2O2. *Methods in Enzymology*. Szerk. Cadenas E és Packer L. 528. köt. Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part C. Academic Press, 2013 Jan 237–255. old. DOI: 10.1016/B978-0-12-405881-1.00014-8
142. Waskom ML. seaborn: statistical data visualization. en. *Journal of Open Source Software* 2021 Apr; 63021. old. DOI: 10.21105/joss.03021
143. Vallat R. Pinguin: statistics in Python. en. *Journal of Open Source Software* 2018 Nov; 31026. old. DOI: 10.21105/joss.01026

144. Poplimont H, Georgantzoglou A, Boulch M, Walker HA, Coombs C, Papaleonidopoulou F és Sarris M. Neutrophil Swarming in Damaged Tissue Is Orchestrated by Connexins and Cooperative Calcium Alarm Signals. eng. *Current biology: CB* 2020 Jul; 302761–2776.e7. DOI: 10.1016/j.cub.2020.05.030
145. Isles HM, Loynes CA, Alasmari S, Kon FC, Henry KM, Kadochnikova A, Hales J, Muir CF, Keightley MC, Kadirkamanathan V, Hamilton N, Lieschke GJ, Renshaw SA és Elks PM. Pioneer neutrophils release chromatin within in vivo swarms. *eLife* 2021 Jul; 10. Szerk. Rothlin CV, Taniguchi T és Rothlin C Ve68755. DOI: 10.7554/eLife.68755
146. Yoo SK, Starnes TW, Deng Q és Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. eng. *Nature* 2011; 480109–112. old. DOI: 10.1038/nature10632
147. Xie Y, Meijer AH és Schaaf MJM. Modeling Inflammation in Zebrafish for the Development of Anti-inflammatory Drugs. eng. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8620984. old. DOI: 10.3389/fcell.2020.620984
148. A versatile GPCR toolkit to track in vivo neuromodulation: not a one-size-fits-all sensor \textbar Neuropsychopharmacology
149. SenGupta S, Parent CA és Bear JE. The principles of directed cell migration. eng. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2021; 22529–547. old. DOI: 10.1038/s41580-021-00366-6
150. Majumdar R, Sixt M és Parent CA. NEW PARADIGMS IN THE ESTABLISHMENT AND MAINTENANCE OF GRADIENTS DURING DIRECTED CELL MIGRATION. *Current opinion in cell biology* 2014 Oct; 033–40. old. DOI: 10.1016/j.ceb.2014.05.010
151. Szatmary AC, Nossal R, Parent CA és Majumdar R. Modeling neutrophil migration in dynamic chemoattractant gradients: assessing the role of exosomes during signal relay. en. *Molecular Biology of the Cell* 2017 Nov; 283457. old. DOI: 10.1091/mbc.E17-05-0298

152. Silvestre-Roig C, Hidalgo A és Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood* 2016 May; 127:2173–2181. old. DOI: 10.1182/blood-2016-01-688887
153. Hopke A, Lin T, Scherer AK, Shay AE, Timmer KD, Wilson-Mifsud B, Mansour MK, Serhan CN, Irimia D és Hurley BP. Transcellular biosynthesis of leukotriene B4 orchestrates neutrophil swarming to fungi. *iScience* 2022 Sep; 25:105226. old. DOI: 10.1016/j.isci.2022.105226
154. Wu Z, He K, Chen Y, Li H, Pan S, Li B, Liu T, Xi F, Deng F, Wang H, Du J, Jing M és Li Y. A sensitive GRAB sensor for detecting extracellular ATP in vitro and in vivo. *English. Neuron* 2022 Mar; 110:770–782.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2021.11.027
155. Duffet L, Kosar S, Panniello M, Viberti B, Bracey E, Zych AD, Radoux-Mergault A, Zhou X, Dernic J, Ravotto L, Tsai YC, Figueiredo M, Tyagarajan SK, Weber B, Stoeber M, Gogolla N, Schmidt MH, Adamantidis AR, Fellin T, Burdakov D és Patriarchi T. A genetically encoded sensor for in vivo imaging of orexin neuropeptides. *Nature Methods* 2022; 19:231–241. old. DOI: 10.1038/s41592-021-01390-2
156. Ino D, Tanaka Y, Hibino H és Nishiyama M. A fluorescent sensor for real-time measurement of extracellular oxytocin dynamics in the brain. *Nature Methods* 2022; 19:1286–1294. old. DOI: 10.1038/s41592-022-01597-x
157. Sarris M és Sixt M. Navigating in tissue mazes: chemoattractant interpretation in complex environments. *Current Opinion in Cell Biology. Cell adhesion and migration* 2015 Oct; 36:93–102. old. DOI: 10.1016/j.cceb.2015.08.001
158. Patriarchi T, Mohebi A, Sun J, Marley A, Liang R, Dong C, Pugher K, Mizuno GO, Davis CM, Wiltgen B, Zastrow M von, Berke JD és Tian L. An expanded palette of dopamine sensors for multiplex imaging in vivo. *Nature methods* 2020 Nov; 17:1147–1155. old. DOI: 10.1038/s41592-020-0936-3
159. Fink R, Imai S, Gockel N, Lauer G, Renken K, Wietek J, Lamothe-Molina PJ, Fuhrmann F, Mittag M, Ziebarth T, Canziani A, Kubitschke M, Kistmacher V, Kretschmer A, Sebastian E, Schmitz D, Terai T, Gründemann J, Hassan S, Patriarchi T, Reiner A, Fuhrmann M, Campbell RE és Masseck OA. PinkyCaMP a mScarlet-

based calcium sensor with exceptional brightness, photostability, and multiplexing capabilities. bioRxiv 2025 Jan 2024.12.16.628673. old. DOI: 10.1101/2024.12.16.628673

10. Saját publikációk jegyzéke

Tamás SX, Roux BT, Vámosi B, Dehne FG, Török A, Fazekas L és Enyedi B. A genetically encoded sensor for visualizing leukotriene B4 gradients in vivo. en. Nature Communications 2023 Aug; 14:4610. old. DOI: 10.1038/s41467-023-40326-6 IF:14,7

Fazekas L, Kaszás D, Vámosi B, **Tamás SX**, Szöllősi T, Mihályi V, Dehne FG, Vágó-Kiss K, Al-Sheraji NM, Paulovits B, Roux BT és Enyedi B. Fibroblasts promote osmotic surveillance by wound-induced unique calcium patterns. Journal of Cell Biology 2025 Oct; 225:e202501165. DOI: 10.1083/jcb.202501165 IF: 6,4

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel és hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Enyedi Baláznak, támogatásáért, türelméért és fáradhatatlan munkájáért amivel laboratóriumát vezeti. Folyamatos iránymutatása, szakmai és személyes segítsége nélkül ez a disszertáció nem jöhetett volna létre. dr. Fabian Dehnenek, Fazekas Lászlónak, Kaszás Diánának, Marinkás Ádámnak, Dr. Török Annának, dr. Al-Sheraji Nadának és Vágó-Kiss Klaudiának, akiktől rengeteget tanulhattam és mindig készségesen segítettek munkámban. Külön köszönettel tartozom Dr. Benoit Rouxnak és dr. Vámosi Boldizsárnak, az ezen tézis gerincét adó cikkben nyújtott segítségükért és munkájukért.

Köszönetet szeretnék mondani az Élettani Intézet igazgatójának Dr. Mócsai Attilának és az intézet minden munkatársának, különösen Dr. Kálmán Eszternek és Nagy Mátkának, mind a laboratóriumi, mind pedig az oktatói munkámhoz tőlük kapott segítségért.

Hálás vagyok a végtelen támogatásért és szeretetért családomnak; szüleimnek, testvéreimnek, férjemnek és kislányomnak Ágotának, nélkülük az élet sokkal nehezebb és szürkébb lenne.