

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

1. Bevezetés

A szöveteket ért sérülés, fertőzés hatására az elsődleges immunválasz részeként legelőször a neutrofil granulociták jelennek meg a gyulladás helyszínén. A neutrofilek migrációját a sérült szövetekből felszabaduló elsődleges és másodlagos kemoattraktáns molekulák irányítják. Elsődleges kemoattraktánsokként funkcionálnak a baktériumokból és a sérült szövetekből felszabaduló formil-peptidek, például az fMLP, vagy a komplement kaskád részét képező komplement komponens 5a (C5a). Az elsődleges kemoattraktánsok jelenlétére a környező szövetek és a sérüléshez érkező immunsejtek másodlagos kemoattraktánsokat termelnek, ezzel tovább fokozva a neutrofilek vándorlását. A másodlagos kemoattraktánsok feltehetően egymást követő hullámokban szabadulnak fel, közülük elsőként a leukotrién B₄ (LTB₄), amely a neutrofil granulociták egy speciális migrációs formáját a neutrofil rajzást (swarming) is előidézi. 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.

A neutrofil granulociták *de novo* LTB₄ szintézisét a mikrobiális peptidek, allergének vagy citokinek jelenléte váltja ki. A sejtfelszíni receptorok ligandkötésének hatására megemelkedő citoplazmatikus és sejtmagi kalciumion koncentráció és a sejtek duzzadása, így a sejtmembránok megnyúlása együttesen aktiválja a bioszintézisben résztvevő enzimeket. A kemoattraktáns prekursorát az arachidonsavat (AA) a magmembránhoz transzlokálódott citoszolikus foszfolipáz A2 (cPLA2) hasítja le a sejtmembrán foszfolipidjeiről. 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 (LTA₄) alakítja. A folyamat utolsó lépéseként a leukotrién A₄-hidroláz (LTA₄H) az LTA₄ hidrolízis katalizálásával LTB₄-et állít elő, amely főként diffúzióval jut ki a sejtközzöti térbe.

Az LTB₄ élettani hatását elsősorban receptoraihoz, a leukotrién B₄ receptor 1 és leukotrién B₄ receptor 2-höz (BLT1 és BLT2) kötődve fejti ki. Mind a két receptor a hét transzmembrán doménnel rendelkező

G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) rodopszin-típusú családjába tartozik, aminosav-szekvenciájuk azonban csak 45.2%-nyi egyezést mutat. 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 általánosabb.

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 létre. A BLT1 jelpálya elindítja és szabályozza a neutrofil granulocita migrációhoz szükséges folyamatokat. A BLT1 további funkciói között szerepel a gyulladás kialakulásához vezető molekuláris kaszkádok elindítása és a fagocitózisban fontos kinázok (Syk, PKC és ERK1/2) foszforilációja.

A BLT2 élettani szerepe kevésbé ismert, feltételezések szerint funkcióját elsődlegesen az epitél sejtek barrier szerepének szabályozásában fejt ki.

Az LTB₄ mennyiségének felhalmozódását és a jelátviteli útvonalak túlzott aktivációját több szabályozó mechanizmus kontrollálja. Az LTB₄ BLT1 receptorhoz való kötődését követően G-protein receptor kinázok (például a GRK2 és 6 fehérjék) foszforilálják a receptor harmadik intracelluláris hurokrégióját és a C-terminális farokrégióban található szerin- és treonin aminosavakat. Az intracelluláris hurok foszforilációja a receptor deszenzitizációját, míg a C-terminális szakaszé a β -arresztin által mediált internalizációt idézi elő.

Az internalizáció során a BLT1-LTB₄ komplex a korai endoszómába kerül, ahol a savas pH hatására a receptor és ligandja szétválik. Ezt követően a receptor vagy visszakerül a plazmamembránba, vagy ubiquitinációt követően lebomlik a sejt lizoszómáiban.

Az LTB₄-ből a citokróm P450 4F3A (CYP4F3A) és az aldehid-

dehidrogenáz (ALDH) enzimek katalizálta folyamatok során először a biológiailag aktív 20-hidroxi-leukotrién B₄ (20-OH-LTB₄), majd az inaktív 20-karboxi-leukotrién B₄ (20-COOH-LTB₄) keletkezik, amely konjugációt követően kiürül a szervezetből.

Az elmúlt években, elsősorban a központi idegrendszerben felszabaduló neurotranszmitterek tér- és időbeli terjedésének megfigyelésére, több GPCR fehérjén alapuló genetikailag kódolt fluoreszcens bioszenzort fejlesztettek. A bioszenzorok vázát a vizsgált ligandra érzékeny és specifikus GPCR fehérje, míg riporter egységét a receptor harmadik intracelluláris hurokrégiójába illesztett konformációváltozásra érzékeny cirkulárisan permutált fluorofór (cpFP) képezi. A ligand receptorhoz való kötődésének hatására a cpFP fluoreszcencia intenzitása megváltozik. E változás iránya és mértéke a cpFP-t a GPCR harmadik intracelluláris hurokrégiójához kapcsoló N- és C-terminális linker régiók hosszának és aminosav összetételének függvénye. Az, hogy pontosan mely linker régiók használata okozza a legnagyobb fluoreszcencia intenzitás változást az adott bioszenzort felépítő GPCR és cpFP fehérjék határozzák meg.

A neurotranszmitterekhez hasonlóan az immunsejtek kemotaxisát irányító kemokin receptorok, többek között a BLT1 is, a GPCR-ek fehérjecsaldájába tartoznak, így a GPCR alapú genetikailag kódolt fluoreszcens bioszenzorok létrehozása hatékony eszköznek ígérkezik a gyulladásos folyamatok vizsgálatára és mélyebb megértésére.

2. Célkitűzések

A 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 útvonalaits 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 kevésbé 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 sejtvonallal alkalmazásával.
- Az LTB_4 bioszenzort transzgenikusan kifejező zebrahal egyedekben az exogén LTB_4 diffúziós grádiensének detektálása, valamint a neutrofilekből sérülést követően felszabaduló endogén LTB_4 vizualizációja.

3. Módszerek

3.1. LTB₄ szenzor prototípusok létrehozása és tesztelése

Az LTB₄ szenzor prototípusok alapját képező BLT1 receptort kódoló szekvenciát perifériás vérből származó humán mononukleáris sejtek cDNS-éből sokszoroztuk fel, majd helyeztük be a pEGFP-N1 plazmidba.

A szenzor variánsok létrehozása során különböző aminosav összetételű és hosszúságú linker régiók használatával illesztettük be a konformáció változásra érzékeny cpEGFP-t a BLT1 harmadik intracelluláris hurokégiójába. Az első prototípusok esetében a hosszú LSSLE, valamint a rövid GG aminosavakból álló linker régiókat és azok különböző kombinációit alkalmaztuk. A későbbi variánsok esetén a cpEGFP-t N-terminális oldalról LSSLI, míg C-terminális oldalról NHDQL aminosavakat tartalmazó kapcsoló régiókkal, és ezen linkerek rövidebb változatainak permutációival vettük közre.

A szenzor prototípusok tesztelése HEK293A sejtekben történt. A mikroszkópos méréseket 16-24 órával a lipofectamine 2000 reagenssel történő transzfekciót követően végeztük el. A mikroszkópos mérések alatt, a két perces alapvonal felvételét követően 100 nM LTB₄-el stimuláltuk a különböző szenzor variánsokat expresszáló sejteket és további két percig monitoroztuk a ligand hatására bekövetkező fluoreszcencia intenzitás változásokat.

3.2. A GEM-LTB₄ karakterizálása HEK293A sejtekben

A szenzor variánsok közül a legkedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező prototípust GEM-LTB₄-nek neveztük el. Kontrollként létrehoztuk a GEM-LTB₄ mutáns verzióját, amiben a BLT1 fehérje 156. arginin aminosavjának alaninra való cseréjével gátoltuk az LTB₄ szenzorhoz való kötődését.

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 létre.

A BLT1 és a GEM-LTB₄ jelátviteli útvonalainak összehasonlítása a HEK293A sejtekben a 100 nM LTB₄ stimulus hatására 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 jRGECO1a-val vagy az mScarlet piros fluoreszcens fehérjével jelölt β -arrestin-2 fehérjével koexpresszáltattuk a HEK293A sejtekbe. A mikroszkópos mérések során a három perces alapvonal felvétele után a sejteket 100 nM LTB₄-el kezeltük. Az ezt követő percekben a jRGECO1a citoplazmatikus kalcium szint emelkedésre bekövetkező fluoreszcencia intenzitás változásait, vagy a β -arrestin-2 a citoplazmából a plazmamembrán felé irányuló transzlokációját követtük nyomon.

A szenzor specificitás vizsgálata közben a GEM-LTB₄-et stabilan kifejező sejteket az LTB₄-hez molekulaszervezetileg hasonló arachidonsav származékokkal stimuláltuk 100 nM-os végkoncentrációban. A kísérletben felhasznált eikozanoidok a következők voltak: AA, 5-oxo-eikozatetraénsav (5-oxo-ETE), 5(S)-hidroxi-eikozatetraénsav (5(S)HETE), 12(S)-hidroxi-eikozatetraénsav (12(S)HETE) és a 20-OH-LTB₄.

A dózis-hatás görbe felvétele során a GEM-LTB₄-et vagy a GEM-LTB₄mut-ot expresszáló sejteket az egy-két perces alapvonal felvétele után egyszeri 1-10-100 pM, 1-5-10-25-50-100-250 és 500 nM, vagy 1 μ M végkoncentrációban kezeltük LTB₄-el, majd további 2 percig monitoroztuk a szenzorokban bekövetkező intenzitás változás mértékét.

3.3. Izolált egér neutrofil granulocitákból felszabaduló LTB₄ mérése

Az endogén LTB₄ mérését célzó *ex vivo* kísérleteinkhez 6-12 hetes, vad típusú egér csontvelőből izolált neutrofil granulocitákat használtunk.

Az izolálást 20mM HEPES-t és fenolvöröst tartalmazó, kalcium és magnézium mentes Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) oldattal végeztük. Az eljárás első lépéseként a femurból és a tibiából kimostuk a csontvelőt, majd centrifugálást és a felülúszó eltávolítását követően

0,2%-os NaCl oldattal lizáltuk a vörösvértesteket. A sejtörmelékek és az izolálás során megmaradt csontdarabkák eltávolítása után a neutrofil granulocitákat 62,5 %-os Percoll grádiens centrifugálással különítettük el a többi fehérvérsejttől.

Az izolált neutrofil granulocitákat $1 \cdot 10^6 \text{ cm}^2$ -es sűrűségben helyeztük a GEM-LTB₄-et stabilan expresszáló HEK293A sejtekre. Ezt követően a neutrofileket egy egyszeri 2 μM -os fMLP stimulussal aktiváltuk. A kezelés hatására felszabaduló endogén LTb₄ révén a GEM-LTB₄ fluoreszcencia intenzitásában bekövetkező változásokat 30 percen keresztül figyeltük meg. A szenzor megfelelő működésének ellenőrzésére, a mérés végén 100 nM LTb₄ -et adtunk a sejtekhez. A kísérletet a GEM-LTB₄ mutáns változatát kifejező alsó sejtréteggel szintén elvégeztük.

A neutrofil granulociták által fMLP hatására termelt LTb₄ mennyiségét LTb₄ specifikus enzimhez kötött immunszorbens assay (ELISA) eljárással a sejtek felülszójából határoztuk meg.

3.4. Exogén és endogén LTb₄ grádiensek vizualizációja zebrahalakban

A GEM-LTB₄-et és annak mutáns változatát transzgenikus módon expresszáló zebrahal vonalainkat vad (AB) és Casper típusú egyedek keresztezéséből származó ikrákon hoztuk létre a Tol2 transzpozáz rendszer alkalmazásával.

Az LTb₄ kimutatására a GEM-LTB₄ bioszenzort epiteliálisan, bazálisan, valamint mezenhimálisan expresszáló 4 napos zebrahal lárvákat alkalmaztunk.

Az exogén LTb₄ szöveti penetrációjának vizsgálata során az intakt, vagy közvetlenül a mikroszkópia megkezdése előtt farokúszó amputációon átesett lárvákat alacsony olvadáspontú agaróz gélbe ágyaztuk. Az alapvonal felvétele után 1 μM koncentrációjú LTb₄-et csepegtettünk a kísérleti állatokba, majd további 40 percig monitoroztuk az LTb₄ szöveti eloszlásának alakulását.

A leukocitákból felszabaduló endogén LTb₄ mérése során, először a lárvák hasi úszóján ejtettünk bemetszést. Ezt követően 90 percre

20 μM AA-val kiegészített izotóniás E3 oldatba helyeztük a kísérleti egyedeket. Az inkubációs idő leteltével a lárvákat alacsony olvadáspontú agaróz gélbe ágyasztuk. A mikroszkópos felvételek készítésének megkezdése után 3 perccel 100 μM -os A23187 kalcium-ionofór stimulust alkalmaztunk. A kontroll kísérlet során az LTB_4 termelést a mérést megelőző 40 perces 20 μM koncentrációjú zileutonnal történő inkubációval gátoltuk.

A GEM-LTB_4 specificitását bizonyítandó a kísérleteket a szenzor mutáns variánsát expresszáló halakon is elvégeztük.

3.5. 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 a Cellpose szoftverrel, valamint Python programnyelven megírt analízis pipeline-okkal végeztük.

A szignifikanciaszintek meghatározásához két mintás párosítatlan Welch korrekciós Student t-próbát és egyoldali Fisher, valamint Dunnett korrekciós ANOVA varianciaanalízist végeztünk a Python „Pingouin” könyvtárának használatával.

4. Eredmények

4.1. A GEM-LTB₄ fejlesztése és karakterizálása

Az általunk fejlesztett bioszenzor vázát az LTB₄ nagy affinitású receptora a BLT1 receptor képezte. A szenzor prototípusok létrehozása során a receptor harmadik intracelluláris hurokrégiójába illesztettük be a konformációváltozásra érzékeny cpEGFP-t. Ehhez különböző hosszúságú és aminosav összetételű N-és C-terminális linker szekvenciákat alkalmaztunk. A linker régiók módosításával számos szenzor variánst hoztunk létre, amelyek közül a plazmamembránban való elhelyezkedésük mértéke és az LTB₄-re adott fluoreszcencia intenzitás változásuk alapján kiválasztottuk a legjobb tulajdonságokkal rendelkezőt. Ezen két feltétel alapján a cpEGFP-t közrefogó N-terminális oldali LSSL és C-terminális oldali NHDQ aminosav összetételű linkereket tartalmazó bioszenzor bizonyult a legideálisabbnak. A további méréseinkhez ezt a szenzor variánst alkalmaztuk, amit GEM-LTB₄-nek neveztünk el.

Az endogén receptorral ellentétben a GEM-LTB₄ a ligand kötést követően nem növelte a sejtek citoplazmatikus kalcium koncentrációját, valamint nem indult el a bioszenzor β -arrestin-2 mediált internalizációja sem. Ezen eredmények alapján arra következtettünk, hogy a GEM-LTB₄ nem aktiválta a BLT1 receptor jelpályáit.

Az általunk vizsgált eikozanoidok közül az LTB₄ mellett, egyedül a 20-OH-LTB₄ stimulus hatására mértünk fluoreszcencia intenzitás növekedést. Ez a ligandkötési mintázat megegyezett a BLT1 receptoréval.

A GEM-LTB₄ már az 5nM-os LTB₄ stimulusra is jól detektálható fluoreszcencia intenzitás változást mutatott. A bioszenzor ligandja jelenlétére koncentrációfüggő módon reagált (EC₅₀=19,8 nM).

4.2. Egér neutrofil granulocitákból felszabaduló LTB₄ vizualizációja

A szenzor karakterizálást követően, a GEM-LTB₄-gyel egér csontvelőből izolált 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 kontrollként alkalmazott GEM-LTB₄mut sejtekkel végzett kísérletekben nem jelentkezett mérhető fluoreszcens intenzitás változás.

Az eredményeink alátámasztására ELISA méréssel meghatároztuk a megegyező kísérleti körülmények között stimulált neutrofilek LTB₄ termelésének mennyiségét, ami a $267,25 \pm 31,28$ pmol-os tartományba esett.

4.3. Exogén LTB₄ grádiens mérése *in vivo* zebrahalakban

Az exogén LTB₄ penetrációját és szöveti eloszlását az ép vagy amputált farokúszójú zebrahal lárvák felületi hámsejtjeiben kifejezett GEM-LTB₄ segítségével határoztuk meg.

Az intakt farokúszóval rendelkező halakban expresszált GEM-LTB₄-ben nem alakult ki az LTB₄ stimulust követően fluoreszcencia intenzitásbeli változás, míg az amputált egyedekben egy legalább 200 μm mélységbe betérjedő LTB₄ grádiens 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 specifitását a GEM-LTB₄ mutáns verziójával végzett kísérleteink igazolták. Ebben az esetben nem következett be szignifikáns változás az alap fluoreszcencia értékekhez képest.

4.4. Kalcium ionofór által kiváltott endogén LTB₄ detektálása zebrahalakban

A kísérletekben használt zebrahal lárvákban 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 megakadályozta a sebzáródást, ezzel biztosítva a neutrofilek stimulációjára használt A23187 kalcium ionofór szövetekbe jutását. 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 AA-val ellensúlyoztuk. Az AA önmagában nem serkenti a leukocita migrációt, azonban előanyaga olyan a sérülés következtében megjelenő kemoattraktánsoknak, amik hatással vannak a neutrofil granulociták vándorlására. Az A23187 stimulust követően az előzőleg sebszélhez vonzott neutrofil granulocitákban az ionofór hatására megemelkedő kalciumion szint révén az 5-LOX enzim a magmembránba transzlokálódott és aktiválódott, ezáltal megkezdődött a sejtekben az endogén LTB₄ termelődése.

A GEM-LTB₄-et expresszáló lárvákban az A23187 stimulust követően detektálhatóvá vált, egy a sebszél és a leukociták közvetlen közelében megjelenő LTB₄ grádiens.

Az LTB₄-re adott specifikus szenzorválaszt jelzi, hogy az 5-LOX inhibitor zileutonnal előinkubált és a GEM-LTB₄ mutáns változatát kifejező lárvákkal végzett kísérletekben nem jelentkezett fluoreszcencia intenzitás változás.

5. 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 ligand kötési 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 ligand kötése 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 mezenhimális sejtjeiben kifejezett GEM- LTB_4 -el a zebrahal lárvák farokúszó amputációját követően detektáltuk az exogén LTB_4 jelenlétét, majd vizualizáltuk az LTB_4 gradiens tér-és időbeli bejutását a zebrahal farokúszó szövetébe. Végezetül a zebrahal lárvák bazális sejtjeiben kifejezett bioszenzorunkkal sikeresen regisztráltuk a kalcium ionofór A23187 hatására aktiválódott leukocitákból felszabaduló endogén LTB_4 jelenlétét.

6. 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; 144610. 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; 225e202501165. DOI: 10.1083/jcb.202501165 IF: 6.4