Ονοματεπώνυμο Υποψήφιου Διδάκτορα:
Χαριτάκης Ιωάννης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:
Επιβλέπουσα: Πουλοπούλου Κορνηλία
Μέλος Α': Χατζηπαναγιώτου Στυλιανός
Μέλος Β': Ραγκούση Μαρία

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής:

Ηλεκτροφυσιολογική και απεικονιστική διερεύνηση της δράσης των μεταβολοτρόπων υποδοχέων του γλουταμικού στους διαύλους καλίου των ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων

Περίληψη:

Σκοπός της προτεινόμενης μελέτης ειναι να αναδείξουμε τον κυτταρικό στόχο του γλουταμικού οξέως στα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα καθώς και το μηχανισμό μέσω του οποίου η ενεργοποίηση αυτού του στόχου απο το γλουταμικό αλλάζει την διεγερσιμότητα του διαύλου Kv1.3 και κατ'επέκταση την αντιγονική απάντηση των Τ-λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, θα προσπαθήσουμε να διασαφηνίσουμε τις μοριακές οδούς που συνδέουν την δράση των αυξημένων συγκεντρώσεων του Glu με την μειωμένη ικανότητα αποκρίσεως των Τ-λεμφοκυττάρων σε ανοσολογικά ερεθίσματα.

Για το σκοπό αυτό θα απομονώσουμε Τ-λεμφοκύτταρα από υγιείς εθελοντές τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές (patch clamp) για την καταγραφή της ηλεκτρικής δραστηριότητας και των χαρακτηριστικών των διαύλων Kv1.3 παρουσία ειδικών αγωνιστών και ανταγωνιστών των υποδοχέων του γλουταμικού οξέος με έμφαση στους μεταβολοτρόπους υποδοχείς του γλουταμικού. Η χρήση τέτοιων ειδικών αγωνιστών και ανταγωνιστών θα μας επιτρέψει την ταυτοποίηση συγκεκριμένων υποτύπων των μεταβολοτρόπων υποδοχέων που προκαλούν μείωση της δραστηριότητας του Kv1.3 διαύλου. Δεδομένου ότι οι δίαυλοι αυτοί διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στα Τ-λεμφοκύτταρα λειτουργώντας ως μοριακός διακόπτης που οδηγεί τα κύτταρα αυτά στην ενεργοποίηση μετά από ένα αντιγονικό ερέθισμα καθώς τους παρέχει την αναγκαία αρνητική τιμή δυναμικού που θα ωθήσει τα ιόντα ασβεστίου μέσα στο κύτταρο, θα πραγματοποιηθεί και απεικόνιση των ενδοκυττάριων επιπέδων ασβεστίου (calcium imaging) κατά την αντιγονική ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων παρουσία ειδικών αγωνιστών και ανταγωνιστών των μεταβολοτρόπων υποδοχέων του γλουταμικού. Επιπλέον, θα εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης των μεταβολοτρόπων υποδοχέων σε ανενεργά και ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σε μεταγραφικό επίπεδο (mRNA) με την χρήση της μεθόδου της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) καθώς και σε επίπεδο πρωτεΐνης με τη μέθοδο Ανοσοστύπωσης κατά Western (Western Blot).

Name of PhD Candidate:
Charitakis Ioannis

Three-member Advisory Committee:
Supervisor: Poulopoulou Cornelia
Member A ': Hatzipanagiotou Stylianos
Member B: Ragousi Maria

Doctoral Thesis Title:

Electrophysiological and imaging study of the effects of metabotropic glutamate receptors on the voltage-gated potassium channels of human T-lymphocytes

Summary:

The aim of the proposed thesis is to identify the cellular target of glutamate (Glu) through which the neurotransmitter exerts its complex modulatory effects on the functional characteristics of human T-lymphocytes, as well as the molecular pathway that links the activation of its cellular target(s) by glutamate to the modulation of the activity of the Kv1.3 channel and consequently the antigenic response of these cells. More specifically, we will attempt to elucidate the molecular pathways that link the action of elevated Glu concentrations to the reduced ability of T cells to respond to immune stimuli.

For this purpose, human T-lymphocytes will be isolated from the peripheral blood of healthy consenting volunteers and will be used in single cell electrophysiological studies (patch clamp) in order to record and evaluate the biophysical characteristics of the Kv1.3 channels in the presence of specific agonists and antagonists of the glutamate receptors with specific emphasis on the metabotropic glutamate receptor family (mGluR). The use of specific mGluR agonists and antagonists will allow the identification of the mGluR receptor subtype that decreases Kv1.3 activity. Given the fact that Kv1.3 channels in T cells are key regulators of calcium influx into the cells following antigenic stimulation, the electrophysiological findings will be accommodated by measurements of intracellular calcium elevations following antigenic stimulation in the presence of either specific agonists of mGluRs or high Glu concentrations co-applied with specific mGluR antagonists by the use of calcium-imaging techniques in order to verify the involvement of the mGluRs that affect Kv1.3 activity with the reported reduced responsiveness of T cells to immune stimuli in the presence of high extracellular concentrations of Glu. Furthermore we will evaluate the expression levels of these receptors in quiescent and activated peripheral blood T lymphocytes at the level of transcription (mRNA) using Polymerase Chain Reaction (PCR) and at the level of translation (protein) by Western Blot Immunoblotting methods.