

Kationcsatorna-gátlók hatása mitogénnel stimulált T-limfocitákra

Tudományos Diákköri Pályamunka

2013.

Pethő Zoltán Dénes
ÁOK V.

Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet



Témavezető:

Dr. Varga Zoltán
Prof. Dr. Panyi György

Bírálatra való beküldéséhez hozzájárulok:

Prof. Dr. Szöllősi János
Intézetvezető

Prof. Dr. Vereb György
TDK felelős

TARTALOMJEGYZÉK

1. ABSZTRAKT.....	3
2. BEVEZETÉS.....	4
A T-limfociták szerepe az immunrendszer működésében.....	4
Ioncsatornák szerepe a T-sejtek aktivációjában.....	5
A T-sejtek kalcium-mediált aktivációja.....	6
A T-sejtek ioncsatornáinak kis és nagy méretű gátlószerei	7
A T-sejt proliferációjának modulálása mitogénekkal.....	9
A T-sejtek proliferációjának gátlási lehetőségei.....	10
3. VIZSGÁLT KÉRDÉSEK.....	12
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	13
a T-sejtek szeparálása és tenyésztése.....	13
A CFSE-hígulási esszé	13
a T-sejt osztódás gátlása	15
Áramlási citometria.....	16
Mért adatok kiértékelése.....	17
5. EREDMÉNYEK.....	18
6. ÖSSZEFOGLALÁS	23
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	24
8. FELHASZNÁLT IRODALOM	25
9. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	29
10. FÜGGELÉK.....	30

ABSZTRAKT

A humán T-limfociták ioncsatornáinak működése nagymértékben befolyásolja ezen sejtek aktivációját, és ezáltal az immunválaszt. A legfontosabb ioncsatornák a feszültségfüggő Kv1.3 és a Ca^{2+} -aktivált IKCa1 K^+ -csatornák, illetve a CRAC, vagyis a Ca^{2+} -felszabadulás aktiválta Ca^{2+} -csatorna. Ezen ioncsatornák specifikusan gátolhatók, ami különböző mechanizmusokon keresztül a sejtaktiváció és -proliferáció gátlásához vezethet. Vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy az egyes ioncsatornák gátlása a különböző koncentrációjú mitogénnel kezelt sejtek proliferációját és aktivációját hogyan befolyásolja.

A vizsgálatokhoz humán perifériás vér limfocitákat használtunk fel. A sejteket a T-sejt receptor-CD3-komplexhez és a ko-stimulátor CD28-hoz kötődő antitestekkel (anti-CD3 és anti-CD28) stimuláltuk, ezeket együttesen, különböző koncentrációkban használtuk. A sejtek ioncsatornáinak gátlására Kv1.3 csatorna esetében TEA-t és Anuroctoxint, IKCa1 csatornánál TRAM-34-et, illetve CRAC csatornánál 2-APB-t, illetve ezek kombinációját adtuk három koncentrációban: a disszociációs állandónak megfelelő, azaz átlagosan a csatornák felét gátló koncentrációban (K_d), ennek a háromszorosában ($3K_d$), illetve tízszeresében ($10K_d$). Ezt követően az ötödik napon, 120 óra elteltével áramlási citométerrel vizsgáltuk a sejtsztódás mértékét CFSE (karboxifluoreszcein szukcinimidil észter) hígulási esszével.

Az irodalmi és saját eredmények alapján az anti-CD3 és anti-CD28 koncentrációjának emelése fokozta a proliferáció mértékét. Hasonlóképpen, az alkalmazott gátlószerek is dózisfüggően csökkentették az osztódó sejtek arányát, a 2-APB kivételével. A 2-APB viszont késleltette a sejtaktivációt, vagyis amíg a kontroll sejtek mitogén kezelés mellett a többi esetben akár négy osztódási cikluson is végigmentek, addig 2-APB hatására csak kettőn. A mitogén-koncentráció növelésével ugyanakkor egyre kisebb lett a gátlószerek proliferációt gátló hatása, és a maximális koncentráció mellett még $10K_d$ koncentrációban alkalmazott gátlószer sem okozott szignifikáns csökkenést az aktivációban.

A proliferáció legnagyobb mértékű gátlását a gátlószerek együttes alkalmazása esetén tapasztaltuk, ami a különböző csatornák szabályozási útvonalainak lehetséges kölcsönhatására utal, melynek mértékének kiderítésére további vizsgálatok szükségesek.

BEVEZETÉS

A T-limfociták szerepe az adaptív immunrendszer működésében

Az immunhomeosztázis fenntartásában felbecsülhetetlen szerepet játszik az adaptív immunrendszer, ezen belül a csontvelői eredetű, majd a tímuszban fejlődő T-limfociták. A védekezés hatékonyságát a limfociták klonális expanziója nagyban megnöveli. Ezen sejtek egyedi receptorai (TCR) antigénprezentáló sejtek (APC) útján közvetve, immunológiai szinapszis útján kölcsönhatásba kerülnek specifikus antigénnel, vagy azok különböző méretű fragmentjeivel, az epitópokkal. Ennek hatására megfelelő extra- és intracelluláris körülmények között aktiválódnak a szekunder nyirokszervekben. Az aktiváció következtében a sejtek osztódásnak indulnak, majd effektor sejtekké vagy memória sejtekké differenciálódnak (1).

TCR szerkezet alapján megkülönböztetünk α és β alegységekből álló heterodimer TCR-rel rendelkező $\alpha\beta$ T-sejteket, illetve γ és δ alegységekkel rendelkező, az előbbieknél a véráramban sokkal ritkábban előforduló, heterodimer $\gamma\delta$ T-sejteket. Az $\alpha\beta$ T-sejteket sejtfelszíni CD markereik és effektor funkcióik alapján további altípusokra oszthatjuk, melyek közül a legfőbbek a $CD4^+ CD8^-$ segítő (T_H), helper T-sejtek, illetve a $CD4^- CD8^+$ ölü, citotoxikus (T_C) sejtek. Ezeken kívül ismerünk regulatorikus (szuppresszor) T-sejteket is, melyeknek a leggyakoribb, és leginkább kutatott fenotípusa a $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ sejtpopuláció, de léteznek $CD8^+$, illetve $CD25^-$ regulatorikus T-sejtek is (1). Attól függően, hogy milyen citokint termelnek, a T_H sejtek további alpopulációkba sorolhatók. A T_{H1} típusu sejtek főleg gyulladásos és citotoxikus folyamatokban fontos citokineket termelnek, mint például az interferon- γ (IFN- γ) és a TGF- β (transforming growth factor β), és a sejtmediált immunitásban fontosak (2). A T_{H2} sejtek főként IL-4-t, IL-5-t, IL-6-t és IL-10-et állítanak elő, melyek a B-limfociták aktivációjához elengedhetetlenek, így a humorális immunválaszt segítik főleg elő (1,2). Emellett leírtak T_{H3} , T_{H9} és T_{H17} sejteket is. A T_{H3} sejtek az indukált regulatorikus T-sejtek (iTreg) közé tartoznak, naív T-sejtekből alakulnak ki általában orális antigénfelvételt követően. TGF- β -termelésükkel gátolják a T_{H1} és T_{H2} sejtek aktivációját (3). A T_{H9} effektor sejtek IL-9-et termelnek, míg a T_{H17} sejtek IL-17et állítanak elő és fiziológias szerepük mellett fontos szereppel bírhatnak autoimmun betegségek kialakulásában (4-6).

Ioncsatornák szerepe a T-sejtek aktivációjában

Az utóbbi 30 évben eddig öt különböző típusú ionáramot sikerült karakterizálni emberi T-sejteken (7). Ezek közül először a Kv1.3 feszültségfüggő, kifele egyenirányító K^+ csatornát ismerték fel (8), mely nagyon fontos szereppel bír a sejtaktivációban és jelenleg a legfontosabb célpontnak tűnik a T-sejt aktivációjának ioncsatornák általi modulálásában. A Kv1.3 csatorna a Shaker-típusú ioncsatornák közé tartozik és a KCNA3 gén kódolja (9). Egy nyugvó T-sejt membránjában kb. 200-400 ilyen csatorna található funkcióképes állapotban (8). Ez az ioncsatorna -60 mV feletti membránpotenciáloknál nyílik ki a T-sejt depolarizációjakor. Szerkezetileg homotetramer, minden alegységet hat-hat α -helikális transzmembrán szegmens alkot (S1–S6), amelyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnék össze (7). A csatorna pórusát és a kapuját, amelyen keresztül a K^+ ionok átjutnak a membránon, az S5 és S6 szegmensek között elhelyezkedő extracelluláris hurkok (szelektivitási filter), illetve maguk az S6 szegmensek alkotják (10). A csatorna nyitását egy többszörösen pozitívan töltött aminosavakkal rendelkező, a csatorna S4 szegmensében elhelyezkedő feszültség-szenzor domén triggereli (11). Feszültségváltozás hatására a feszültség-szenzor doménban bekövetkezett konformációváltozás az S6 kapuját kinyitja, ami végül K^+ ionok kiáramlásához vezet (7,12).

A T-sejtek másik káliumcsatornája a Ca^{2+} aktivált K^+ csatorna, a korábban IKCa1-ként ismert $K_{Ca}3.1$, melyet a KCNN4 gén kódol (13,14). Szerkezetileg nagyon hasonló a Kv1.3 csatornához, azzal a különbséggel, hogy az S4 szegmensekben nincsenek a Kv1.3 csatornánál megtalálható többszörös pozitív töltéssel rendelkező aminosavak. Így nem alakul ki az ún. feszültségszenzor régió, és így nem feszültség-kapuzott a csatorna, hanem kb. 300 nM feletti intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnál nyílik (7,15). Ezt a csatorna alegységeinek C-terminusán elhelyezkedő kalciumkötő kalmodulin jelenléte teszi lehetővé, mely kalcium-érzékelőként működik (13). Nyugalmi állapotban a T-sejten 2-20 ilyen csatorna található, azok is javarészt zárt állapotban. Aktivált T-sejtnél az intenzív Ca^{2+} -jelátvitellel párhuzamosan a csatornák kinyílnak és számuk 300-800-ra emelkedik. A sejtmembrán Ca^{2+} influx által okozott depolarizációjára hiperpolarizáló K^+ effluxszal válaszolnak és ezáltal negatív visszacsatolási kaszkádot okozva stabilizálják a sejtmembránt (7,16).

Egy másik fontos ioncsatorna a Ca^{2+} felszabadulás által aktivált Ca^{2+} csatorna, a CRAC (calcium release activated calcium) csatorna. A fő funkciója a csatornának az intracelluláris

raktárak által vezérelt kalciumbelépés (SOCE) lehetővé tétele. Ez a csatorna két fő funkcionális egységből áll: az Orai1 formálja a pórust, vagyis az ioncsatornát, míg a STIM1 kalcium szenzorként működik az ER membránjában (17). A sejten belüli Ca^{2+} raktárak ürülésekor a STIM1 a plazmamembránhoz vándorol, majd egyéb fehérjéken keresztül aktiválja a transzmembrán Orai1 fehérjét (18). Ennek hatására két Orai1 dimer tetramerként egyesülve létrehozza a CRAC pórusát, lehetővé téve a Ca^{2+} beáramlását és a sejtaktivációt és a sejtosztódást (19,20).

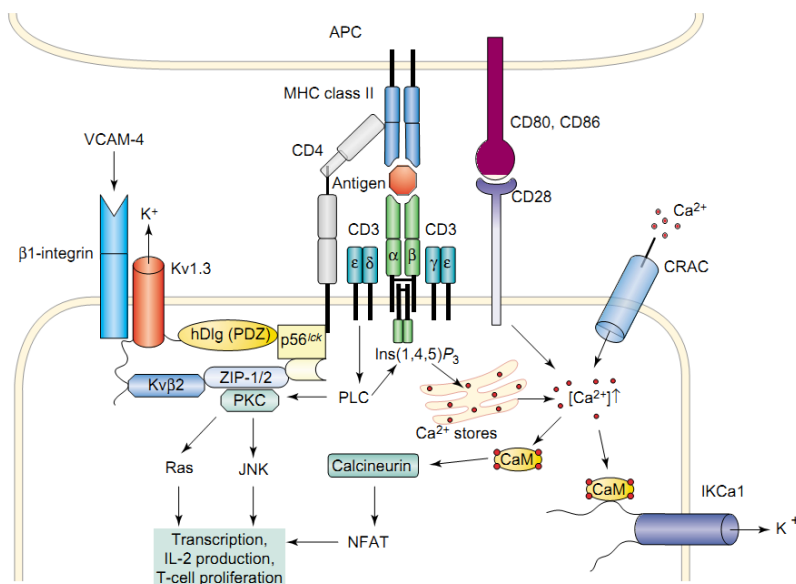
Ezen ioncsatornák mellett ismertek további csatornák is: a Cl_{swell} ioncsatorna, mely Cl^- -on kívül egyéb anionokat is átenged és a Kv1.3 mellett fontos a sejt térfogatszabályzásában (21). A T-sejt ozmotikus duzzadását követően ezek a csatornák már 1 perccel kinyílnak és regulatorikus volumencsökkenést okoznak (22). Végül létezik egy nonspecifikus kationcsatorna, melyet eddig még nem sikerült pontosan azonosítani, illetve a T-sejtek kb 1-5%-ában ismert még feszültségkapuzott Na^+ áram is (7).

A T-sejtek kalcium-mediált aktivációja

A T-sejtek aktiválódásához, és ezáltal a sejtosztódáshoz is elengedhetetlen a megfelelő Ca^{2+} milió. Az aktivációs folyamat a sejtmembránban a TCR-CD3 komplexnél kezdődik, ahol antigénfelismerés, majd konformációváltozás hatására az intracelluláris térben különböző tirozinkinázok (mint például a ZAP-70, az ICK, az LCK) aktiválódnak, melyek végül többek közt foszfolipáz C-t (PLC) aktiválnak (23). Ennek hatására végül foszfoinozitol-biszfoszfátból inozitol-triszfoszfát (IP_3), illetve diacil-glicerin (DAG) hasítódik. A DAG proteinkináz C-t (PKC) és RasGRP-t aktivál, míg az IP_3 a belső Ca^{2+} raktárakból Ca^{2+} -ot szabadít fel, amelyet a CRAC csatornák nyitása követ. Az így beáramló nagy mennyiségű Ca^{2+} már elegendő ahhoz, hogy a sejtben Ca^{2+} -kalmodulin komplexek jöjjenek létre. Ez a komplex a kalcineurint aktiválja, ami sejtmagban található NFAT (nuclear factor of activated T-cells) molekulát defoszforilálja, így aktiválván azt. Az NFAT idegsejtekben a szinaptikus plaszticitást, az axonnövekedését és a sejtek túlélését is elősegíti, de a T-sejtekben is létfontosságú: az új gének expressziójának mintegy 75%-át regulálja (24,25).

A K^+ csatornák hatása abban nyilvánul meg, hogy a Ca^{2+} beáramlását a membránpotenciál szabályzásával kontrollálják. A T-sejt depolarizációja miatt csökken a Ca^{2+} -áramlás hajtóereje, így csökken a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} áramlás. A T-sejtek K^+ csatornái

éppen ekkor, depolarizációkor nyílnak. A beáramló K^+ hatására hiperpolarizálódik a membrán, így visszaáll a Ca^{2+} -beáramlás hajtóereje (24).



1. ábra: Modellára az APC antigén- bemutatásának hatására létező T-sejtbeli aktivációs, ioncsatornához kapcsolt folyamatokról (24).

A T-limfociták ioncsatornáinak különböző gátlószerei

Amikor a szervezet immunrendszere saját komponensei ellen lép fel, autoimmunitásról beszélünk. Ez a folyamat kóros méreteket ölthet, és ezáltal létrejönnek az autoimmun betegségek, akár szervre lokalizáltan, akár az egész szervezetre kiterjedően (26). Több, mint nyolcvan féle autoimmun betegséget ismerünk, együttes előfordulásuk, prevalenciájuk nagyon magas, mintegy a fejlett országok társadalmának hét százalékát is érinthetik (27,28). Kezelésükre nagyon sokféle immunszuppresszív anyagot is kipróbáltak, melyeknek viszont gyakori és komoly mellékhatásai vannak: az infekciós hajlam növekedésétől a kortikoszteroidok által indukált Cushing-szindrómán át hipertónián át nagyon széles skálát lefedhetnek (29). Így nem meglepő, hogy megnőtt az igény olyan immunomoduláns anyagok alkalmazására, amelyek kevés szövetben hatnak, így nem rendelkeznek nagy mellékhatás-profillal. Az ideális immunszuppresszív gyógyszer specifikusan akadályozná meg az autoreaktív T-sejtek működését, viszont nem érintené a normális immunreakciót. Bár egyelőre ilyen anyagok nem léteznek, a T-limfociták ioncsatornáinak potens blokkolói nagyon ígéretesnek látszanak. Ezek közül a Kv1.3 csatorna gátlószerei mutatkoznak talán a

legértékesebbnek, kedvező hatásuk már kísérletek által is alátámasztott például sclerosis multiplex, 1-es típusú diabetes mellitus, illetve rheumatoid arthritis modell-betegségeiben (30,31).

A T-sejtek Kv1.3 ioncsatornáinak nagy affinitású gátlószereit két fő csoportra osztjuk: peptid toxinokra és kis molekulású gátlószerekre. A természetes peptid toxinok tengeri rózsákból, például a *Stichodactyla helianthus*-ból, skorpiókból, illetve egyéb állatokból és növényekből származnak. A káliumcsatornákat gátló skorpiótoxinok molekulásúlya jellemzően kb. 4 kDa, pozitív töltésük miatt impermeábilisak a sejtmembránon és 30-40 aminosavból állnak. Hatásmechanizmusuk leírható egy parafadugó-borosüveg metaforával, vagyis a csatorna pórusának extracelluláris végéhez kapcsolódva zárják el a K^+ ionok útját. Ilyen anyagok például a charybdotoxin, illetve a kísérleteinkben is használt anuroctoxin (24,32). Ezen természetes eredetű gátlószerek már eleve nagy affinitásúak Kv1.3 iránt, de szelektivitásukat más csatornákkal szemben nagyban lehetett növelni *in vitro* peptidszekvenciabeli módosításokkal.

A kis molekulású gátlószerek ellenben 800 Da-nál alacsonyabb tömegűek és hidrofóbok, így könnyen átjutnak a sejthártyán és belülről zárják el a csatornát. Kis méretük miatt kevesebb helyen kötődnek az ioncsatornához, így általában affinitásuk is kisebb, mint a peptid toxinoknak (31). Az első ilyen nagyobb, nanomoláris affinitású anyagok egyes aminosavak voltak, mint például a WIN173173, melyek viszont relatív alacsony szelektivitásúak voltak. A jelenleg ismert legszelektívebb anyaggal, a PAP-1-el már *in vivo* is folynak kísérletek, és legalább 20-szoros szelektivitása van egyéb ioncsatornákkal szemben (24,31).

A KCa3.1 csatornát több különböző peptid-, illetve nem-peptid természetű anyag képes gátolni, pontos hatásmechanizmusuk még nem tisztázott. Ilyen gátlószerek például a Clotrimazol, illetve ennek potens és szelektív analógjai, az ICA-17043, illetve a kísérleteinkben is használt TRAM-34 (triarylmethane-34) (7). A CRAC csatorna gátlására a kutatásban leggyakrabban a 2-APB nevű anyagot használják, ami sajnos alacsony koncentrációban aktiválja ezt a csatornát, és nem eléggé specifikus. Ezeknek a hatásoknak kiküszöbölésére újabban szintetizáltak több 2-APB analógot (pl. DPB162-AE, DPB163-AE), melyek szelektívebbek és százszor potensebbek a 2-APB-nél (33).

A T-sejt poliklonális aktiválása mitogénekkal

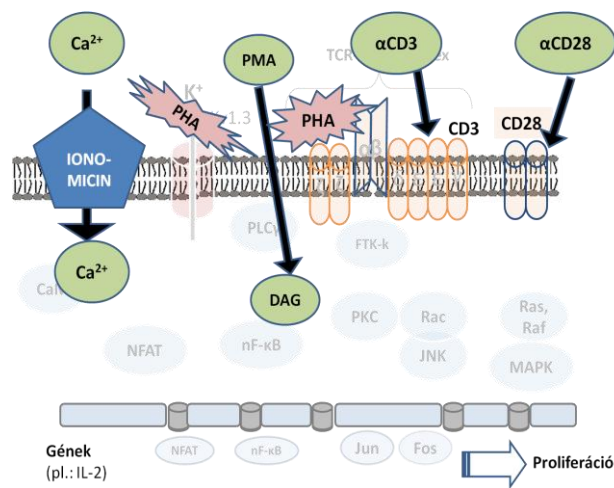
Az immunrendszer sejtjeinek szüksége van az extenzív növekedésre, hogy az antigén-specifikus T- és B-sejtek elég gyorsan és hatékonyan lépjenek fel a fertőző ágensek ellen. A limfocita-proliferáció kísérleti modellezésére poliklonális T-sejt aktivátorokat, mitogéneket használunk, melyek a legtöbb T-limfocitát képesek aktiválni, TCR specificitástól függetlenül. Legfőképp *in vitro* használjuk őket a vérből illetve limfoid szövetekből nyert limfocitákon. A leggyakrabban használt mitogének közé tartoznak a növényi lektinek, az aktiváló antitestek, a forbolészter, illetve a lipopoliszaccharidok (34).

A lektinek a sejtfelszíni glikoproteinek (ezek közé tartozik a TCR és a CD3 molekula is) szénhidrátreszeit keresztkötve okoznak sejtaktivációt. Bár az állati sejtek, például májsejtek felszínén is találhatók lektin típusú szénhidrátkötő molekulák, továbbá a komplementrendszer aktivációjához vezető egyik útvonal is lektin-mediált, a laboratóriumokban használt mitogén lektineket (növények, főképp pillangósvirágúak (*Fabaceae*) termelik. A fitohemagglutinin (PHA) legnagyobb koncentrációban a vörös vesebabban (*Phaseolus Vulgaris*), míg a konkanavalin A (Con A) a *Canavalia ensiformis*-ban található. Neve abból ered, hogy az emlősök vörösvértestjeit agglutinálja, vagyis kicsapja (35).

A mitogének következő típusa az aktiváló antitestek. A főleg TCR és CD3 ellen képződött ellenanyagok segítségével kezdetben T-sejt aktivációs szignálokat észlelhetünk, de kiegészítő stimulus nélkül nem következik be hosszan tartó aktiváció. Amennyiben viszont kombináljuk őket kostimulátor receptorok, például anti-CD2 vagy anti-CD28 elleni ellenanyagokkal, a proliferációs hatás teljessé válik (36). Az optimális sejtaktiváció érdekében az antitesteket célszerű immobilizálni vagy kikötni szolid felszínekhez, másodlagos antitestekhez vagy akár gyöngyökhöz (37).

További jellegzetes, kombinációban használt mitogének a forbolészter (forbol-mirisztoil-acetát-PMA) és a Ca^{2+} ionofór ionomicin. Ezek az anyagok antigén jelenlététől függetlenül képesek a T-sejtet aktiválni. A PMA DAG-analóg, vagyis a sejtmembránon át tud hatolni, majd intracellulárisan PKC aktivációhoz vezet. Az ionofór kalcium számára permeabilizálja a sejtmembránt, illetve az ER-membránt, így hatása egyrészt az extracelluláris térből történő Ca^{2+} beáramlás, továbbá SOCE-mechanizmus útján CRAC csatorna aktiváción keresztüli további intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedés. A Ca^{2+} másodlagos jelátviteli molekulaként funkcionál, kalciumkötő fehérjéket, például kalmodulint aktivál, végül

kalcineurinon át az NFAT defoszforilációjához vezet. A két útvonal együttesen elegendő a T-sejtek proliferációjához (34). Korábbi kísérleteink, melyekben összehasonlítottuk a fenti mitogének hatékonyságát, arra mutattak rá, hogy bár mind a lektinnel (PHA), mind a mitogén antitesttel (anti-CD3 és anti-CD28) történő stimuláció hatásos, a mitogén antitestek alkalmazása sokkal egyeneműbb aktivációt és homogénebb sejtpopulációt eredményez. Nagy mértékű aktivációt érhetünk el bakteriális szuperantigénekkal, lipopoliszaccharidokkal is. Jellemző rájuk, hogy bár sok T-limfocitát aktiválnak (jóval többet, mint egy átlagos antigén), mégsem hatnak az összes sejtre, mint a fentebb említett többi mitogén. Ebbe a csoportba tartoznak a *Staphylococcus* enterotoxinjai vagy a TSST (toxikus shock szindróma toxin) (34).



2. ábra: Illusztráció a fent taglalt mitogének hatásmechanizmusáról, illetve az általuk aktivált másodlagos jelátvivő anyagok útvonaláról (saját ábra).

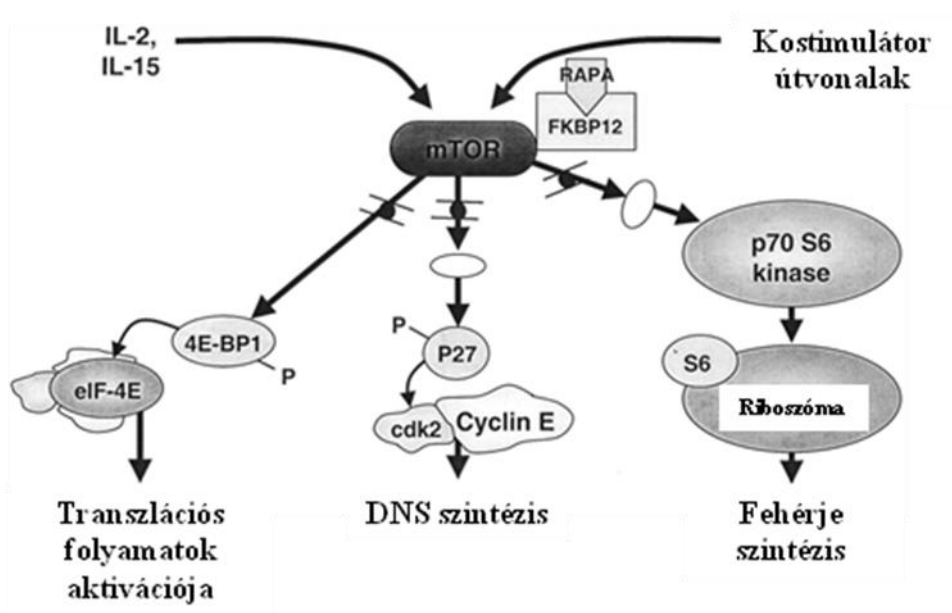
A T-sejtek proliferációjának gátlása ioncsatornagátlókkal és rapamicinnel

Kísérleti eredmények, megfigyelések már 1984 óta fellelhetők azzal kapcsolatban, hogy az ioncsatornákat gátló anyagok csökkentik a T-sejtek osztódásának mértékét (38). A legelső ilyen eredmények nem szelektív K⁺ csatorna gátlókkal, tetraetil-ammóniummal (TEA), 4-aminopiridinnel (4-AP), illetve kinidinnel születtek. Azóta mind a Kv1.3 gátlókról, mind néhány KCa3.1 és CRAC csatornát gátló anyagról bebizonyosodott egyben proliferációt gátló hatásuk is (39,40).

A T-limfociták aktivációját a Ca²⁺-jelátvitel megzavarása nélkül is gátolhatjuk. Az eredetileg gombák ellen ható makrolid típusú antibiotikumként leírt rapamicin (más néven

sirolimus) a sejtben FKBP12-n keresztül az mTOR (mammalian target of rapamycin) komplexet köti, és gátolja annak működését (41). A TOR normális esetben a sejt növekedésében, riboszómák szintézisében, transzkripció, transzlációs iniciációs folyamataiban vesz részt, továbbá nélkülözhetetlen az aktin citoszkeleton újrendeződéséhez (42). Ezen folyamatok java részét az S6-, illetve az eIF-4E komplex aktivációja útján szabályozza. A tacrolimussal (FK-506) ellentétben, mellyel nagyon sok szerkezeti homológiát mutat, a kalcineurin működését nem gátolja, így a Ca^{2+} -mediált sejtaktivációs folyamatok nagyrészt érintetlenek maradhatnak.

Mindazonáltal az irodalomban nem található azonos, kontrollált körülmények között tartott limfocitákon a különböző ioncsatornagátló szerek alkalmazását vizsgáló tanulmány, mely azok hatását egymáshoz viszonyítva külön-külön, illetve kombinálva leírná. Továbbá felvetődött bennünk az a kérdés, hogy Ca^{2+} -tól független útvonalak blokkolásával, rapamicinnel milyen proliferációbeli hatást tudunk elérni az ioncsatorna-gátlókéhoz képest.



3. ábra: Az ábrán az mTOR jelátviteli útvonala, illetve annak gátlása látható rapamicinnel (a képen RAPA). Ez az útvonal nagyban független a T-sejt Ca^{2+} -mediált aktivációjától. A képen nem ábrázolt receptor szinten integrinek, receptor-tirozinkinázok, G-fehérje kapcsolt receptorok is szerepelhetnek a jelátvitelben (43).

VIZSGÁLT KÉRDÉSEK

- 1, Célunk volt azonos mitogén-koncentrációval stimulált, azonos körülmények között tartott sejtpopulációkban kimutatni, hogy melyik T-sejt gátlószer alkalmazása vonja maga után a legnagyobb mértékű aktiváció- és osztódásbeli gátlást.
- 2, Kísérleteinkben fényt szerettünk volna deríteni a Ca^{2+} -tól független és Ca^{2+} -függő aktivációs mechanizmusok gátlószerei közti lehetséges kölcsönhatásaira *in vitro*.
- 3, Végül ioncsatorna-gátlók hatását vizsgáltuk meg változó mitogén-koncentráció függvényében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A T-sejtek szeparálása és tenyésztése

Kísérleteinkben a limfocitákat egészséges donorok perifériás véréből, könyökvénájából izoláltuk. A PBMC (peripheral blood mononuclear cell) sejteket 1:1 arányban HBSS-sel (Hank's Balanced Salt Solution) hígított heparinózott vérből Ficoll gradiens segítségével 30 percig tartó szobahőmérsékleten történő centrifugálással nyertük. Centrifugálás után a nagy sűrűségű vörösvértestek és a Ficoll gradiens felett úszó tejfehér réteget, az ún. buffy coat-ot leszívtuk. Ezután a mononukleáris sejteket kétszer mostuk HBSS-sel, majd elvégeztük rajtuk a CFSE-festést (lásd alább). A kísérleteinkben 1×10^5 /ml sejtszámmal 120 óráig inkubáltuk a PBMC-ket 5% CO₂ mellett 37°C-on 96 lyukú tenyésztőedényekben. Amennyiben lyukanként nagyobb sejtszámmal ($2,5 \times 10^5$) dolgoztunk, nem működött megfelelően a mitogénstimulus. 15% HEPES tartalmú RPMI médiumot használtunk tápoldatnak, mely tartalmazott 10% főtális borjú savót (FCS; Hyclone, Logan, Utah), 100 µg/ml penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 2 mM L-glutamint. A kísérlet félidejében, a harmadik nap elején 50 µl friss médiumot kaptak.

A sejtek és a tenyésztő médium hozzáadása előtt a lyukak aljára 1 µg/ml végkoncentrációjú szolubilis anti-CD28-at, illetve négy különböző mennyiségben szolubilis CD3-at adtunk. A legkisebb anti-CD3 koncentrációt 200 ng/ml-ben határoztuk meg, a közepes koncentrációt 500 ng/ml-ben, a magasat 1 µg/ml-ben, míg a nagyon magas anti-CD3 koncentrációt 3 µg/ml-ben (44,45). A lyukak alján 30 percig szobahőmérsékleten hagytuk a szolubilis antitesteket kikötődni, majd hozzáadtuk a tenyésztő médiumot és a sejteket. Az antitestek hatására kis koncentrációt alkalmazva a sejtek kb. kétharmada, közepes koncentrációnál a sejtek közel fele, nagy koncentrációnál a sejtek kétharmada, míg nagyon magas koncentrációban akár 90%-a osztódott (pontos számokat lásd az eredmények c. fejezetben).

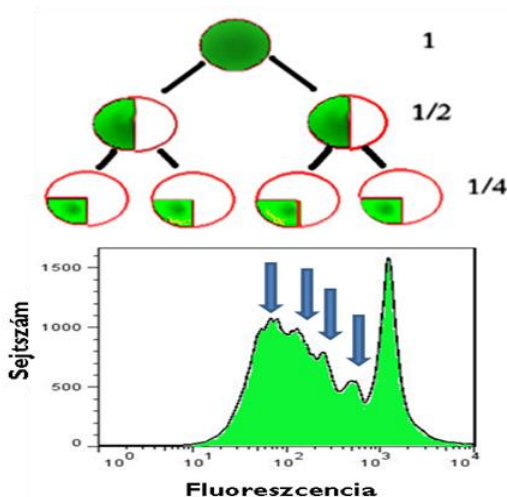
A CFSE-hígulási esszé

A limfociták osztódásának hatékony áramlási citometriai monitorozását 1994-ben oldották meg Lyons és mtsai (46). Kísérleteikhez egy fluoreszceinnel rokon fluorokrómot,

karboxifluorescein-szukcinimidil-észtert (CFSE) használtak fel. A többi ismert proliferációs esszéhez képest, melyek 1-3 osztódási cikluson át tudták követni a sejteket, a CFSE-hígulási esszével akár 8-10 osztódási cikluson keresztül is lehet monitorozni a limfocitákat. Ezt a CFSE kedvező biokémiai tulajdonságai teszik lehetővé. Maga a CFSE két acetát csoportjával és szukcinimidil-észter funkciós csoportjával membrán-permeábilis, de nem fluoreszcens. A sejtbe vándorolva intracelluláris észterázok hasítják le a két acetát csoportot, és ennek hatására a molekula erősen fluoreszcenssé válik, továbbá nem képes újra átjutni a sejtmembránon (47). Ennek az anyagnak a gerjesztési maximuma 488nm, illetve emissziós maximuma 520 nm (saját spektrofluorimetriás mérés, illetve irodalmi alapok alapján). Kísérleteinkben a kontroll, CFSE-vel nem kezelt autofluoreszcens sejtekhez képest általában 10 000-szeres fluoreszcenciabeli intenzitás-növekedést észleltünk. A szukcinimidil-észter intracelluláris fehérjék aminocsoportjaihoz kapcsolódva stabil festék-fehérje konglomerátumokat képez. A nagyon lassan metabolizálódó citoskeletális fehérjékhez való kapcsolódás az oka a CFSE-festés nagyon hosszú időtartamának.

Az általunk alkalmazott anti-CD3 és anti-CD28 kezelés hatására a vizsgált időtartam alatt a limfociták többször, átlagosan naponta-kétnaponta osztódtak, a hozzáadott mitogén koncentrációjának függvényében. A limfociták mitózisai után a leánysejtekben mindig feleződik az intracelluláris CFSE mennyisége, így áramlási citométeren jól megfigyelhetőek az egyes osztódási ciklusokon átment limfocitapopulációkhoz tartozó csúcsok.

Saját kísérleteinkhez is a CFSE-hígulási esszét használtuk fel a T-sejtek osztódásának megfigyelésére. A perifériás vérből származó mononukleáris sejtekhez 1 μ M-os végkoncentrációban adtuk a CFSE-t. A továbbiakban a sejtszuspenziót 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, hogy a CFSE általi reakciók végbemenjenek, majd 20 percig 37 °C-on inkubáltuk, hogy a felesleges, nem beépült CFSE-t kiiktassuk. Tekintve, hogy a CFSE fényérzékeny anyag, a sejteket az áramlási citométeres mérésekig (lásd lentebb) fénytől védve kezeltük és tároltuk.



4. ábra: a felül látható vázlat sematikusan bemutatja a CFSE eloszlását, majd feleződését a leánysejtekben. Az alsó kép egy reprezentatív áramlási citometriás mérésünket mutatja a CFSE-esszéről, ahol a nyilak az osztódott sejtpopulációra mutatnak (saját ábra).

A T-sejtek osztódásának gátlása

Kísérleteinkben a CFSE-jelölést követően az anti-CD3 és anti-CD28 stimuláció okozta T-sejt aktivációt gátoltuk. Az ioncsatornákat gátló szereket három koncentrációban alkalmaztuk: a disszociációs állandójuknak megfelelő, K_d -nyi koncentrációkban, melynél átlagosan az ioncsatornák a feléhez kötődik gátlószer egy adott időben, ennek a koncentrációnak 3-szorosában, illetve 10-szeresében.

Egyik gátlószerként a Kv1.3 ioncsatornák gátlására a TEA-t alkalmaztuk, melynek T-sejt osztódásgátló hatása jól dokumentált. A TEA-t 20 mM-os (K_d -nyi), 60 mM-os, illetve 200 mM-os koncentrációban alkalmaztuk (38t,48). Másik Kv1.3 csatornagátlónak az anuroctoxint (későbbiekben Antx) használtuk, hogy összehasonlítsuk a két különböző karakterű (kis molekula ill. peptid) Kv1.3 csatornagátló szer proliferációt gátló hatását. Az Antx-et 500 pM (K_d -nyi), 1,5 nM, illetve 5 nM-os koncentrációkban alkalmaztuk (49).

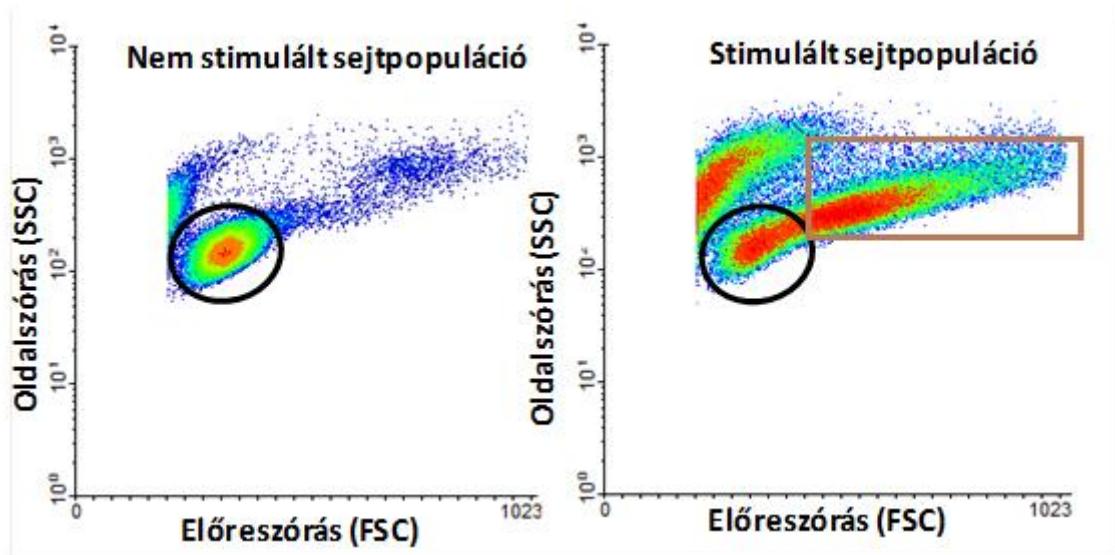
A Ca^{2+} -aktivált KCa3.1 csatornát a TRAM-34-gyel gátoltuk. A TRAM-34-ről ismert, hogy a ciklosporin-A immunszuppresszív hatását fokozza, és nincsenek nyilvánvaló, a szervezetre toxikus mellékhatásai alacsony koncentrációkban, így alkalmazható lehet immunszuppresszív terápiákban (16). A használt koncentrációk 20 nM (K_d), 60 nM és 200 nM voltak (24).

A T-sejtek CRAC csatornáját 2-aminoetoxi-difenil-boráttal, 2-APB-vel blokkoltuk, mely CRAC-on kívül IP3 receptorokon, illetve TRP (tranziens receptor potenciál) csatornákon is hat. Különlegessége, hogy alacsony koncentrációkban még aktiválja a CRAC csatornát, míg magasabb koncentrációban már gátolja (50,51). A 2-APB egy nem szelektív Ca^{2+} csatorna blokkoló, így a T-sejt magnézium által gátolt MIC (magnesium inhibited cation) csatornájára is gátló hatást fejt ki. A 2-APB K_d -nyi koncentrációjaként 5 μ M-t alkalmaztunk, további koncentrációk 15 μ M, illetve 50 μ M voltak.

Végül a T-sejtek Ca^{2+} -független aktivációs útvonalait rapamicinnel gátoltuk (lásd fentebb). Ezt az anyagot is három koncentrációban alkalmaztuk: 20, 60 és 200 pM-ban (52,53).

Áramlási citometria

Áramlási citométeres méréseket végeztünk a sejteken mind a kísérlet 0., mind az 5. napján. Kísérleteinkhez főként FACScan, illetve kisebb részben FACSCalibur típusú citométereket használtunk. Köpenyfluidékként egyszeres PBS-t alkalmaztunk. A vizsgált sejtek száma tenyésztőedényenként 100 000 volt. Emellett minden egyes aktiválási és gátlási konfigurációt háromszor, tripletekben vizsgáltunk. A 0. napon főként a CFSE festés intenzitását, homogenitását és ezáltal hatásosságát néztük, illetve, hogy elegendő limfocita található-e a tenyésztőedényekben. Az 5. napon vizsgáltuk meg a sejtaktivációt és a sejtosztódást. Három paramétert mértünk: az előreszórás (FSC), az oldalszórás (SSC), illetve a sejtekben a CFSE által emittált fluoreszcenciaintenzitást. Az előreszórás egy olyan detektor érzékeli, mely egy vonalban található az emittált lézersugárral, mely monokromatikus 488 nm gerjesztési hullámhosszú fényt generál. Az FSC információt ad a sejtek méretéről, illetve a fény útjában lévő közegek törésmutatójáról. Az oldalszórás érzékelésére szolgáló detektor a fénysugárhoz képest 90°-ban található. Az SSC a sejtek belső komplexitásáról, granuláltságáról szolgáltat információt.



5. ábra: Balra egy nem stimulált, jobbra pedig egy stimulált PBMC populációról alkotott denzitás diagramm látható. A meleg színek több azonos tulajdonságú sejtet jelentenek, a fekete kör a nem stimulált limfociták, a barna téglalap az aktivált limfociták populációját jelölik.

Ezen mért értékekből két paramétert számítottunk: a sejtaktiváció arányát és a sejtosztódás mértékét. Az aktivált sejtek arányát úgy állapítottuk meg, hogy a nem stimulált sejtpopulációban kaput definiáltunk a limfociták populációjára (a fenti ábrán fekete körrel körülvett sejtek), majd ezt a kaput exportáltuk a stimulált sejtpopulációra (jobb oldalt). Az ennél a populációnál nagyobb előre- és oldalszórást mutató sejteket neveztük aktivált sejteknek (az ábrán a barna téglalappal jelöltük őket). E módszer helyességét alátámasztotta egyik kísérletünk, melynek során mágneses gyöngyökkel, MACS technika segítségével szeparáltuk a kísérlet elején a T-limfocitákat. Ekkor az áramlási citometriás mérésnél az aktivált és osztódott T-limfociták aránya nem mutatott szignifikáns eltérést ahhoz képest, amikor nem alkalmaztunk mágneses szeparálást.

A sejtek osztódásának mértékét a CFSE-hígulás alapján állapítottuk meg. Az összes limfocitára kaput illesztettünk, majd a kapu által határolt populációnak vizsgáltuk meg a fluoreszcencia-hisztogramját. A hisztogrammon minden elkülöníthető populációra (0. osztódás, 1. osztódás... 4. osztódás) Gauss-görbét illesztettünk, és a görbe alatti területen elhelyezkedő sejtek számát állapítottuk meg a kiértékelő program segítségével (ld. lentebb).

Mért adatok kiértékelése

Az áramlási citométeren a CellQuest programmal rögzítettük az eredményeinket. Kiértékelő programként a FlowJo program próbaverzióját, továbbá a WinMDI 2.9 programot, illetve a Cyflogic program 1.2.1 verzióját próbáltuk ki, melyek közül az utóbbi bizonyult legalkalmasabbnak az analízis elvégzésére. A Cyflogictól kinyert számadatokat később Microsoft Office Excel táblázatokban rendszereztük. Eredményeink összehasonlítására, tekintve, hogy több csoport összehasonlítását végeztük el, az ANOVA statisztikai tesztet alkalmaztuk, illetve post-hoc analízisként Tukey's HSD tesztet végeztük el. Az egyes csoportok közötti statisztikai különbségeket $p < 0.05$ (<5% szignifikanciaszint) tekintettük szignifikánsnak. Grafikonjaink készítésére a széles körben elterjedt SigmaPlot program 10.0-es verzióját használtuk.

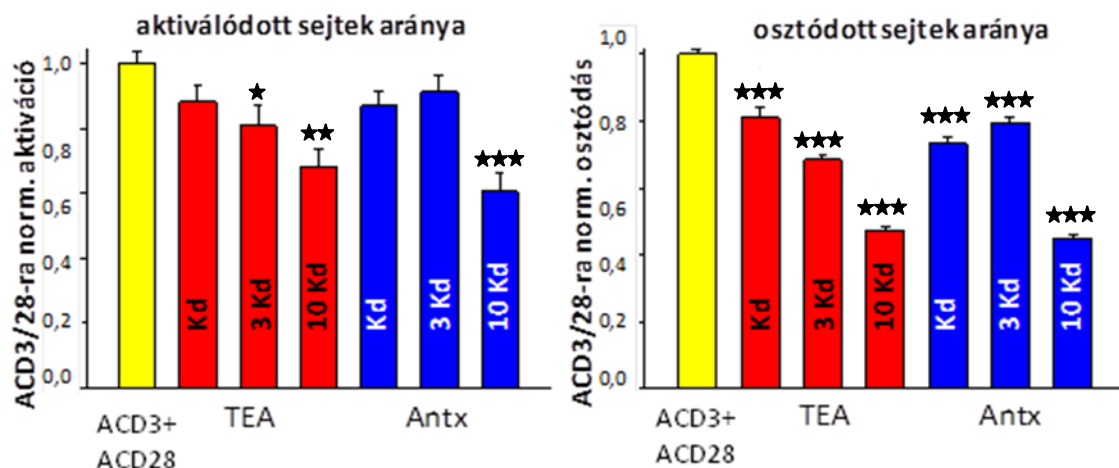
EREDMÉNYEK

Alacsony mitogén-koncentráció mellett a T-sejtek aktivációjának és osztódásának gátlása

Első kísérleteinkben alacsony anti-CD3 (200 ng/ml) és anti-CD28 (1 µg/ml) koncentrációval stimulált limfocitákon vizsgáltuk mind a sejtaktiváció, mind a proliferáció mértékét csupán mitogén alkalmazásakor, illetve a Kv1.3 csatorna gátlása esetében (n=3). Az aktivált sejtek arányát az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint számítottuk ki. Alacsony koncentrációjú mitogénstimulus mellett a csak mitogénnel kezelt sejtek átlagosan 48,6 százaléka aktiválódott, illetve 36,3 százaléka osztódott. Erre a populációra normáltuk a kísérleteinkben az ioncsatorna-gátlókkal kezelt sejtek aktivációs, illetve osztódási rátáját. A fenti ábrán is jól kivehető, hogy a TEA-és az Antx kezelés csökkentette az aktivált sejtek arányát a populációban. Bár alacsony gátlószer-koncentrációk mellett (K_d -nyi, illetve Antx-nél még $3K_d$ -nyi mellett is) az aktivációbeli csökkenés a kontrollokhöz képest nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,131$; $p=0,081$; $p=0,184$), $10K_d$ -nyi gátlószer alkalmazása esetén a tendencia már mindkét gátlószer alkalmazásakor nyilvánvalóvá válik. Ekkor már a csupán mitogénnel kezelt sejtekhez képest szignifikánsan kevesebb sejt (Antx-nél: 60,5%; TEA-nál: 67,9%) aktiválódott.

Az osztódott sejtek arányának számolása során ugyanez a tendencia figyelhető meg, de a változás sokkal határozottabb, az eredmények szórása jóval alacsonyabb. Emiatt az alább látható kísérleteinkben már csak a sejtek osztódását vizsgáltuk. A különbség egyik oka lehet, hogy az aktivált sejtek FSC és SSC tartományában egyéb mononukleáris sejtek is vannak, például monociták, makrofágok, melyek torzították az eredményeinket. Emiatt a jövőben tervezett kísérleteinkben aktivált sejtek populációjának vizsgálatára fluoreszcens anyaggal jelölt aktivációs marker (pl.: CD45RA/RO) ellenes antitesteket kívánunk felhasználni.

Az osztódott sejtek populációjának vizsgálatakor már bármely általunk alkalmazott gátlószermennyiség szignifikáns, a gátlószer koncentrációjától függő osztódásbeli csökkenéshez vezetett (p mindegyik esetben $<0,01$). $10K_d$ -nyi gátlószer alkalmazásakor mindössze feleannyi sejt osztódott, mint egyedül mitogén használatakor, és nem láttunk szignifikáns különbséget a TEA és az Antx osztódást gátló hatásában ($p=0,09$).



6. ábra: alacsony mitogén-koncentráció mellett láthatjuk a TEA és anuroctoxin dóziszfüggő gátló hatását mind aktiválódott, mind osztódott sejtek arányát vizsgálva. Az ábrákon az ACD3 és az ACD28 a CD3, illetve CD28 ellenes mitogén antitesteket jelölik. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

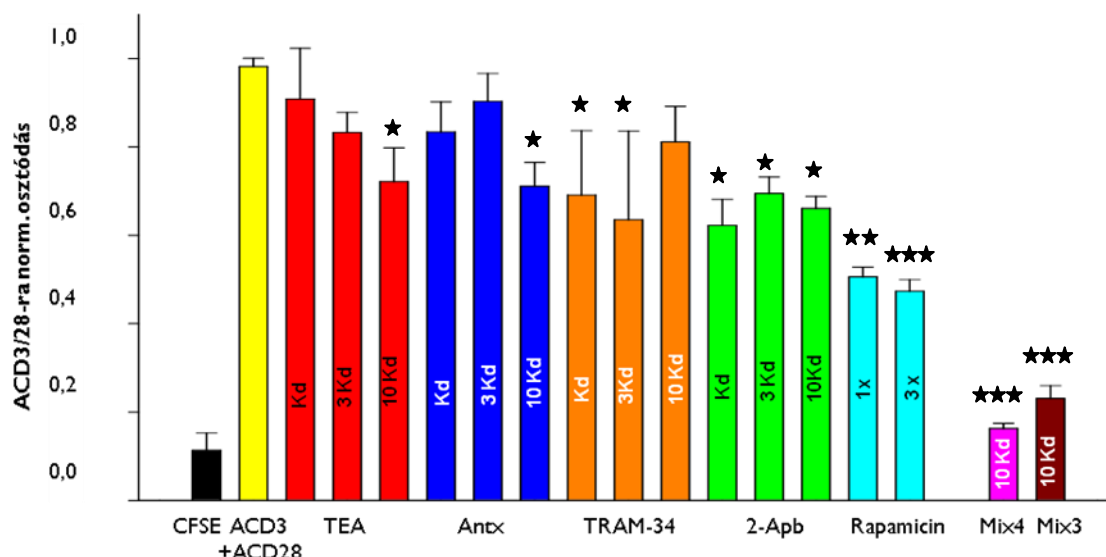
Közepes mitogén-koncentrációnál alkalmazott gátlók hatása a T-sejtek osztódására

A fenti eredményekhez hasonlóan a csupán mitogénnel kezelt (anti-CD3: 500 ng/ml; anti-CD28: 1 μ g/ml) populációnál kapott sejtosztódásra (átlag: 47,6%) normáltuk az osztódott T-sejtek arányát. Kv1.3 csatornagátlók esetén ($n=6$) hasonlóak az eredmények, mint alacsony mitogén-koncentráció alkalmazásakor, de az osztódásbeli változás nem olyan kifejezett: csak a 10K_d-nyi TEA, illetve Antx használatakor szignifikáns, átlagosan 23%-nyi a csökkenés ($p=0,04$; $p=0,01$).

A TRAM-34-nek ($n=4$), a 2-APB-nek ($n=5$), illetve a rapamicinnek ($n=6$) mindegyik alkalmazott koncentrációja szignifikánsan csökkentette a sejtosztódás mértékét, a legnagyobb csökkenést rapamicinnél tapasztaltuk. Tízszerez rapamicin koncentráció esetében nem sikerült elegendő kielégítő mérést végezni ($n=2$), mert a sejtek a kísérletek nagy részében elpusztultak a 120. órai mérés idejére. Érdekes megfigyelés volt a 2-APB-nél, hogy bár gátlószer mennyiségétől nem függött az osztódásbeli csökkenés, az osztódások sejtenkénti száma csökkent: az öt nap alatt átlagosan négyszeri osztódás helyett csak átlagosan kétszer osztódtak. Ezen eredményeink egybevágnak a Ca²⁺-csatornagátlókról ismert irodalmi adatokkal (54), miszerint e gátlók növelhetik egy osztódási ciklus időtartamát.

Amennyiben az ioncsatornagátlók közül az anuroctoxint, a TRAM-34-et, illetve a 2-APB-t egyszerre alkalmaztuk 10K_d-nyi koncentrációban ($n=4$), a csak mitogénnel kezelt

sejtekhez képest az osztódott sejtek száma átlagosan 69,3%-nyit, míg ha ezek mellett még rapamicint is használtunk (n=5), akkor 81%-nyit csökkent. Ez a kifejezett proliferáció-gátlás, mely még magasabb mitogén-koncentrációnál is megfigyelhető (lásd alább), is utal a T-sejt különböző ioncsatornáinak, illetve a Ca^{2+} -független útvonalainak szinergizmusára.



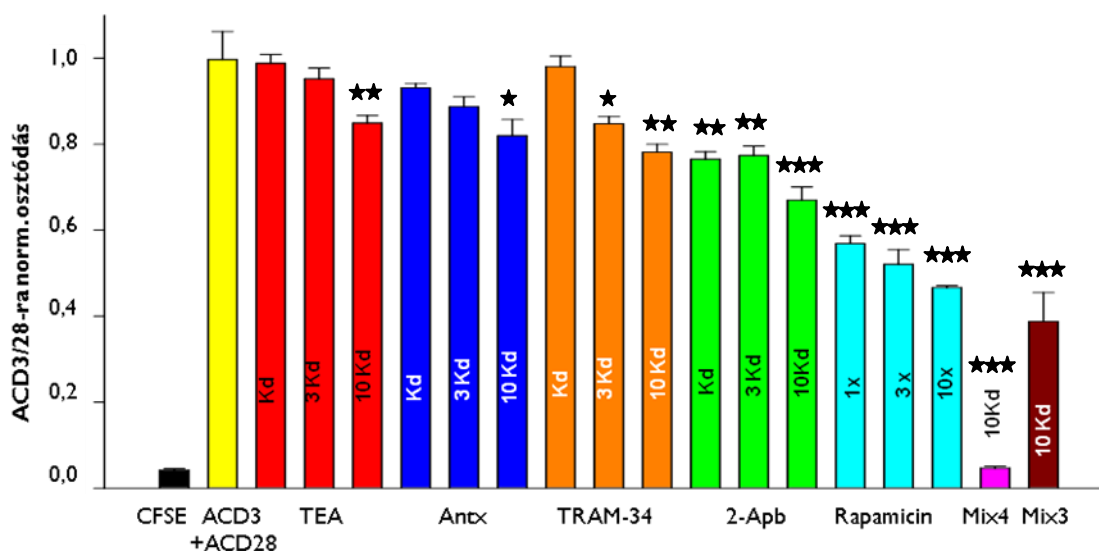
7. ábra: Közepes mitogén-koncentrációnál a csupán mitogénnel kezelt sejtekhez képest statisztikailag szignifikáns eltérést láthatunk Kv1.3 csatornagátlók 10K_d-nyi koncentrációjánál, míg a többi gátlószer mindhárom vizsgált dózisa gátolta a sejtosztódást. A CFSE jelöli a mitogénnel nem kezelt populációt, a Mix3 a három különböző ion-csatornagátló (Antx+TRAM-34+ 2-APB), a Mix4 pedig az ioncsatornagátlók+rapamicin kombinációt. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

A gátlók osztdást csökkentő hatása magas koncentrációban alkalmazott mitogén mellett

Magas mitogén-koncentráció, vagyis 1 µg/ml anti-CD3 és 1 µg/ml anti-CD28 alkalmazásakor a sejtek 68,2%-a osztódott (n=7). Csak 10K_d-nyi koncentrációjú TEA és Antx proliferációt gátló hatása bizonyult ennél a mitogén-koncentrációnál szignifikánsnak (p<0,001), az osztódásbeli csökkenés 17%-os volt. TRAM-34-nél (n=3) már 3K_d is szignifikánsan csökkentette a proliferációt (p=0,024), illetve 2-APB-nél (n=3) és rapamicinnél (n=3) mind a három koncentráció hatásosnak bizonyult.

Amennyiben a kationcsatorna-gátlókat együtt alkalmaztuk, a proliferáció-gátlás még kifejezettebb volt; a sejtek mindössze átlagosan 20%-a osztódott. Amikor mind a négy gátlószert egyszerre használtuk, akkor már nem láttunk szignifikáns eltérést a CFSE-

kontrollhoz képest ($p=0,701$), vagyis a T-sejtek proliferációját teljes mértékben gátolni tudtuk.



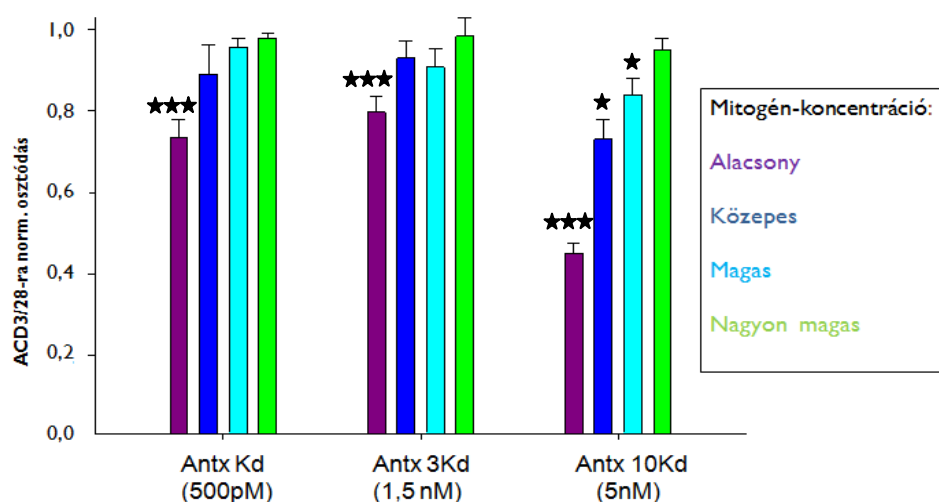
8. ábra: Mitogén antitestre normált osztódási ráták illusztrációja az általunk alkalmazott proliferációt gátló anyagok esetén. A legnagyobb csökkenést önmagában a rapamicin eredményezte ugyanúgy, mint közepes koncentrációnál. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

Eredmények nagyon magas mitogén-koncentráció alkalmazása mellett

3 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 és 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28 használata ahhoz vezetett ($n=3$), hogy a sejtek átlagosan 86%-a osztódott. Ezt a nagymértékű osztódást egyik ioncsatorna-gátlószer sem gátolta szignifikánsan, még 10K_d-nyi koncentráció mellett sem. Amennyiben az ioncsatorna-gátlókat együttesen alkalmaztuk, még észleltünk egy alacsony mértékű proliferációbeli csökkenést, de ez sem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,136$). Eredményeink alapján leszűrhetjük, hogy nagyon magas koncentrációjú mitogén alkalmazása teljesen semlegesítette a toxinok és egyéb ioncsatornagátlók proliferációt csökkentő hatását.

Az Anuroctoxin hatása különböző mitogén-koncentrációknál

A 9. ábra szemlélteti az Anuroctoxin proliferációt gátló hatását a négyféle alkalmazott mitogén koncentráció mellett. K_d -nyi és $3K_d$ -nyi toxin osztódásra gyakorolt hatása között nem észleltünk különbséget, de a $10K_d$ koncentrációban alkalmazott gátlószer nagyobb mértékben gátolta a sejtosztódást. Emellett $10K_d$ -nyi koncentrációnál megfigyelhető a toxin gátló hatásának megszűnése egyre növekvő mitogén-koncentrációknál: míg alacsony mitogén-koncentráció mellett csak a sejtek 47%-a osztódott, közepesnél 78%, magasnál 84%, nagyon magas koncentrációnál pedig már nem volt különbség a sejtosztódás mértékében a kontrollhoz képest.



9. ábra: Az Antx hatása az osztódó sejtek arányára különböző mitogén-koncentrációknál. A leglátványosabb változás $10K_d$ -nyi toxinnál figyelhető meg. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

ÖSSZEFOGLALÁS

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a legnagyobb mértékű proliferáció-gátlást a rapamicinnel értük el, illetve amikor a különböző gátlószereket kombinációban alkalmaztuk, egy még kifejezettebb gátlást figyelhettünk meg. Ez arra utal, hogy a Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -független útvonalak hatása additív, de feltételezésünk szerint bizonyos mértékben kölcsön is hatnak, mely kölcsönhatás kvantitatív jellemzésére további kísérleteket tervezünk. Továbbá megfigyeltük, hogy az általunk használt két Kv1.3 ioncsatorna blokkoló, a TEA, illetve az anuroctoxin koncentrációfüggő osztódást gátló hatása között egymáshoz képest nincs különbség. Ez arra utalhat, hogy az ioncsatorna-gátlás pontos helye nem létfontosságú az osztódás gátlásában. Emellett annak ellenére, hogy mágnesesen szeparált T-sejteket vizsgálva is hasonló eredményeket tapasztaltunk, mint mononukleáris sejtek esetében, könnyen elképzelhető, hogy az egyéb sejtek, például monociták vagy B-limfociták befolyásolják a T-sejteken mért proliferációs változásokat. Ezen változások viszont minden esetben, a kontroll populációk esetében is fennállnak, így az eredmények számot tevő mértékben nem torzulnak.

Végül, ahogy az anuroctoxinnál megfigyelhettük, a mitogén-koncentráció növelésével a proliferáció gátlása csökkent azonos gátlószer-koncentrációk mellett. Ennek az oka az lehet, hogy a T-sejt Ca^{2+} -függő útvonalai mellett nagyobb mitogén-koncentrációnál a Ca^{2+} -független útvonalak is kielégítő osztódást indukálnak, még akkor is, ha az ioncsatornák, és ezáltal a Ca^{2+} -függő útvonalak gátoltak. Ezt támaszthatják alá a rapamicinnel kombinált eredményeink, vagyis amikor a Ca^{2+} -független útvonalakat is gátoltuk az ioncsatornák mellett, akkor csak nagyon kis mértékű osztódás, vagy az osztódás teljes hiánya volt megfigyelhető. Ennek a megfigyelésnek akár klinikai relevanciája is lehet, például rapamicin és ioncsatornagátló kombinációs terápiák kialakításában a jövőben autoimmun betegek kezelésére.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Dr. Gáspár Rezsőnek és Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak, a DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet egykori és jelenlegi igazgatóinak, hogy lehetővé tették számomra az intézetben való kutatómunkát.

Köszönettel tartozom Balajthy Andrásnak, másodszerzőmnek az önzetlen segítségéért, iránymutatásáért a kutatásban és azon kívül is.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, Dr. Varga Zoltánnak és munkacsoportunk vezetőjének, Prof. Dr. Panyi Györgynek akik mind szakmailag, mind emberileg támogattak, kutatómunkám során pedig mindvégig készséggel segítettek.

A kísérletek kivitelezésében nyújtott segítséget szeretném megköszönni Nagy Ceciliának, Dr. Hajdú Péternek, Dr. Papp Ferencnek és Bartók Ádámnak. Az elektrofiziológiai laboratórium és az intézet valamennyi tagjának köszönöm a kellemesen baráti és vidám légkört, mely nélkül a munka sokkal nehezebben haladt volna.

Felhasznált Irodalom

1. Erdei A., and Gergely J. 2006. *Immunbiológia*. Budapest; Medicina: 16-28.
2. "Timothy R. Mosmann (1986.) Two types of murine helper T cell clone , **I**. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
3. Lan, R. Y., A. A. Ansari, Z. X. Lian, and M. E. Gershwin. (2005.) Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 4: 351-363.
4. Jabeen, R., and M. H. Kaplan. (2012.) The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr. Opin. Immunol.* 24: 303-307.
5. Hemdan, N. Y., G. Birkenmeier, G. Wichmann, A. M. Abu El-Saad, T. Krieger, K. Conrad, and U. Sack. (2010.) Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 9: 785-792.
6. Korn, T., M. Oukka, V. Kuchroo, and E. Bettelli. (2007.) Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in Immunology* 19: 362-371.
7. Cahalan, M. D., and K. G. Chandy. (2009.) The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 231: 59-87.
8. Cahalan, M. D., K. G. Chandy, T. E. DeCoursey, and S. Gupta. (1985.) A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Physiol* 358: 197-237.
9. Grissmer, S., B. Dethlefs, J. J. Wasmuth, A. L. Goldin, G. A. Gutman, M. D. Cahalan, and K. G. Chandy. (1990.) Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 9411-9415.
10. Cahalan, M. D., H. Wulff, and K. G. Chandy. (2001.) Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* 21: 235-252.
11. Papazian, D. M., X. M. Shao, S. A. Seoh, A. F. Mock, Y. Huang, and D. H. Wainstock. (1995.) Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K⁺ channel. *Neuron* 14: 1293-1301.
12. Yellen, G. (2002.) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419: 35-42.
13. Begenisich, T., T. Nakamoto, C. E. Ovitt, K. Nehrke, C. Brugnara, S. L. Alper, and J. E. Melvin. (2004.) Physiological roles of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated potassium channel Kcnn4. *J. Biol. Chem.* 279: 47681-47687.
14. Logsdon, N. J., J. Kang, J. A. Togo, E. P. Christian, and J. Aiyar. (1997.) A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 32723-32726.

15. Fanger, C. M., S. Ghanshani, N. J. Logsdon, H. Rauer, K. Kalman, J. Zhou, K. Beckingham, K. G. Chandy, M. D. Cahalan, and J. Aiyar. (1999.) Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J. Biol. Chem.* 274: 5746-5754.
16. Wulff, H., M. J. Miller, W. Hansel, S. Grissmer, M. D. Cahalan, and K. G. Chandy. (2000.) Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97: 8151-8156.
17. Zhang, S. L., Y. Yu, J. Roos, J. A. Kozak, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, K. A. Stauderman, and M. D. Cahalan. (2005.) STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437: 902-905.
18. Liou, J., M. L. Kim, W. D. Heo, J. T. Jones, J. W. Myers, J. E. Ferrell, Jr., and T. Meyer. (2005.) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr. Biol.* 15: 1235-1241.
19. Luik, R. M., and R. S. Lewis. (2007.) New insights into the molecular mechanisms of store-operated Ca²⁺ signaling in T cells. *Trends Mol. Med.* 13: 103-107.
20. Wu, M. M., R. M. Luik, and R. S. Lewis. (2007.) Some assembly required: constructing the elementary units of store-operated Ca²⁺ entry. *Cell Calcium* 42: 163-172.
21. Cahalan, M. D., and R. S. Lewis. (1988.) Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes. *Soc. Gen. Physiol Ser.* 43: 281-301.
22. Lewis, R. S., P. E. Ross, and M. D. Cahalan. (1993.) Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes. *J. Gen. Physiol* 101: 801-826.
23. Lin J., and Weiss A. (2009.) Proximal tyrosine kinases that initiate T cell activation. Poster, <http://www.nature.com/nri/posters/tcrkinases/index.html>
Nature Reviews: Immunology.
24. Chandy, K. G., H. Wulff, C. Beeton, M. Pennington, G. A. Gutman, and M. D. Cahalan. (2004.) K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 280-289.
25. Robert, V., E. Triffaux, M. Savignac, and L. Pelletier. (2011.) Calcium signalling in T-lymphocytes. *Biochimie* 93: 2087-2094.
26. Mak, T. W., and M. E. Saunders. (2006.) 29 - Autoimmune Disease. In *The Immune Response* Academic Press, Burlington. 963-1023.
27. Cooper, G. S., M. L. K. Bynum, and E. C. Somers. (2009.) Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *Journal of Autoimmunity* 33: 197-207.
28. Miller, F. W., L. Alfredsson, K. H. Costenbader, D. L. Kamen, L. M. Nelson, J. M. Norris, and A. J. De Roos. Epidemiology of environmental exposures and human

autoimmune diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. (2012.) *Journal of Autoimmunity*. 39(4): 259-71.

29. Szerk.: Fürst Zs., and Gyires K. (2007.) *Farmakológia*. Medicina Könyvkiadó Zrt.
30. Beeton, C., H. Wulff, N. E. Standifer, P. Azam, K. M. Mullen, M. W. Pennington, A. Kolski-Andreaco, E. Wei, A. Grino, D. R. Counts, P. H. Wang, C. J. LeeHealey, S. Andrews, A. Sankaranarayanan, D. Homerick, W. W. Roeck, J. Tehranzadeh, K. L. Stanhope, P. Zimin, P. J. Havel, S. Griffey, H. G. Knaus, G. T. Nepom, G. A. Gutman, P. A. Calabresi, and K. G. Chandy. (2006.) Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 17414-17419.
31. Varga, Z., P. Hajdu, and G. Panyi. (2010.) Ion channels in T lymphocytes: An update on facts, mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases. *Immunology Letters* 130: 19-25.
32. Bartók, Á., Z. Varga, and G. Panyi. (2012.) 150. Tailoring the Selectivity of Anuroctoxin for Kv1.3 K⁺ Channels. *Toxicon* 60: 171-172.
33. Goto, J., A. Z. Suzuki, S. Ozaki, N. Matsumoto, T. Nakamura, E. Ebisui, A. Fleig, R. Penner, and K. Mikoshiba. (2010.) Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca(2⁺) entry via STIM proteins. *Cell Calcium* 47: 1-10.
34. Abul K.Abbas, Andrew H.Lichtman, and Shiv Pillai. (2012.) *Cellular and Molecular Immunology*, 6. ed. Saunders .
35. Hamelryck, T. W., M. H. Dao-Thi, F. Poortmans, M. J. Chrispeels, L. Wyns, and R. Loris. (1996.) The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.* 271: 20479-20485.
36. Frauwirth, K. A., and C. B. Thompson. (2002.) Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest* 109: 295-299.
37. Trickett, A., and Y. L. Kwan. (2003.) T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods* 275: 251-255.
38. DeCoursey, T. E., K. G. Chandy, S. Gupta, and M. D. Cahalan. (1984.) Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307: 465-468.
39. Khanna, R., M. C. Chang, W. J. Joiner, L. K. Kaczmarek, and L. C. Schlichter. (1999.) hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J. Biol. Chem.* 274: 14838-14849.
40. Wang, G. L., Y. Qian, Q. Y. Qiu, X. J. Lan, H. He, and Y. Y. Guan. (2006.) Interaction between Cl⁻ channels and CRAC-related Ca²⁺ signaling during T lymphocyte activation and proliferation. *Acta Pharmacol. Sin.* 27: 437-446.
41. Chen, J., and Y. Fang. (2002.) A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1071-1077.

42. Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg. (2001.) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15: 807-826.
43. Saunders, R. N., M. S. Metcalfe, and M. L. Nicholson. (2001.) Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int.* 59: 3-16.
44. Hu, L., M. Pennington, Q. Jiang, K. A. Whartenby, and P. A. Calabresi. (2007.) Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 179: 4563-4570.
45. Matsushita, Y., S. Ohya, H. Itoda, T. Kimura, Y. Suzuki, H. Yamamura, and Y. Imaizumi. (2008.) Molecular mechanisms for Kv1.3 potassium channel current inhibition by CD3/CD28 stimulation in Jurkat T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 152-157.
46. Lyons, A. B., and C. R. Parish. (1994.) Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171: 131-137.
47. Lyons, A. B. (2000.) Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods* 243: 147-154.
48. Price, M., S. C. Lee, and C. Deutsch. (1989.) Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86: 10171-10175.
49. Bagdany, M., C. V. Batista, N. A. Valdez-Cruz, S. Somodi, Rodriguez de la Vega RC, A. F. Licea, Z. Varga, R. Gaspar, L. D. Possani, and G. Panyi. (2005.) Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* 67: 1034-1044.
50. Bootman, M. D., T. J. Collins, L. Mackenzie, H. L. Roderick, M. J. Berridge, and C. M. Peppiatt. (2002.) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J.* 16: 1145-1150.
51. Prakriya, M., and R. S. Lewis. (2001.) Potentiation and inhibition of Ca(2⁺) release-activated Ca(2⁺) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J. Physiol* 536: 3-19.
52. Kay, J. E., L. Kromwel, S. E. Doe, and M. Denyer. (1991.) Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology* 72: 544-549.
53. Kopf, H., G. M. de la Rosa, O. M. Howard, and X. Chen. (2007.) Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3⁺ T regulatory cells. *Int. Immunopharmacol.* 7: 1819-1824.
54. Capiod, T. (2011.) Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie* 93: 2075-2079.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-APB	2-Aminoetoxi–difenilborát
ANOVA	variancia-analízis
Antx	anuroctoxin
APC	antigénprezentáló sejt
CD	differenciációs antigén (cluster of differentiaion)
CFSE	karboxifluoreszcein szukcinimidil észter
CRAC	Ca^{2+} -felszabadulás aktiválta Ca^{2+} -csatorna
DAG	diacil-glicerín
ER	endoplazmatikus retikulum
FCS	fötális borjúsavó
FSC	előreszórás
IKCa1, $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$	közepes konduktanciájú Ca^{2+} - aktivált K^{+} -csatorna
IL-2	interleukin-2
K_d	disszociációs állandó
MACS	magnetic-activated cell sorting
mTOR	mammalian target of rapamycin
NFAT	nuclear factor of activated T cells
PBS	<i>foszfát</i> -pufferelt fiziológiás sóoldat (phosphate-buffered saline)
PHA	fitohemagglutinin
PMA	forbol-mirisztoil acetát
SD	<i>standard</i> deviáció
SEM	standard error of the mean, az átlagérték közepes hibája
SOCE	store-operated calcium channel
SSC	oldalszórás
TEA	tetraetil-ammónium
TCR	T-sejt receptor
TRAM-34	triarilmetán-34

FÜGGELÉK

A kísérleteket a DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetének Elektrofiziológiai munkacsoportjában, annak laboratóriumában és az áramlási citometria laborban végeztem. A mononukleáris sejtek és a limfociták szeparálását és tenyésztését Nagy Cecilia segítségével, a CFSE-esszé előkészítését és helyes kivitelezését Szilágyi Orsolyától, az áramlási citométer használatát Dr. Krasznai Zoltán segítségével, az eredmények értékelését Dr. Varga Zoltán segítségével sajátítottam el, ezt követően önállóan, részben Balajthy András segítségével végeztem ezeket a munkákat.

A TDK előadásomat (mely a helyi TDK konferencián I., illetve országos TDK konferencián II. helyezést ért el) és a pályamunkámat önállóan készítettem, ennek lektorálását témavezetőimnek, Dr. Varga Zoltánnak és Dr. Panyi Györgynek köszönhetem, akik kritikus szemléletükkel sok segítséget nyújtottak. A pályamunkában szereplő ábrák szerkesztése javarészt önálló munka. A tudományos következtetésekben nélkülözhetetlen segítséget nyújtott Dr. Varga Zoltán és Prof. Dr. Panyi György szakértelme.