

Limfocita aktiváció vizsgálata áramlási citométerrel

Doktori értekezés

dr. Mészáros Gergő

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Szabó Zsófia, PhD, gyógyszerész

Dr. Lacza Zsombor, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szalai Csaba, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Nagy György, PhD, egyetemi docens

Dr. Pállinger Éva, PhD, egyetemi docens

Budapest
2015.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	6
1.1. Az újszülöttek adaptív immunválaszának sajátosságai	6
1.1.1. T-sejtes immunválasz újszülöttekben.....	7
1.2. Áramlási citométerrel vizsgálható sejtelettani folyamatok és a limfocita aktiváció	8
1.2.1. T-sejt receptoron (TCR) keresztül zajló jelátvitel	8
1.2.2. A citoplazmatikus Ca^{2+} -szint és plazmamembrán-potenciál szabályozása	11
1.2.3. A mitokondriumok szerepe a T-sejtek anyagcseréjében	12
1.2.4. A mitokondriumok hatása a kalcium-anyagcserére T-limfocitákban.....	14
1.2.5. Mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$)	15
1.2.6. Szabadgyökök.....	15
2. Célkitűzés	17
3. Módszerek	18
3.1. Általános módszerek.....	18
3.1.1. Készülék	18
3.1.2. Jurkat-sejtek tenyésztése	19
3.1.3. Oldatok	19
3.1.4. Anyagok	19
3.1.5. Mitokondrium tömeg mérése MitoTracker Green-nel	19
3.2. Új kísérleti rendszer kidolgozása: intracelluláris folyamatok monitorozása T-limfocitákban.....	20
3.2.1. Citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ mérése.....	20
3.2.2. Membránpotenciál mérés	21
3.2.3. Mitokondriális $[\text{Ca}^{2+}]$ mérése	23
3.2.4. Mitokondriális membránpotenciál mérés	24
3.2.5. Szabadgyök képződés (O_2^-) mérése.....	28
3.3. A klinikai vizsgálathoz használt módszerek.....	30
3.3.1. A vizsgálat alanyai.....	30
3.3.2. A mononukleáris sejtek izolálása	30
3.3.3. Sejtfelszíni markerek és kapuzás	31
3.3.4. A sejtek aktivációja	31
3.3.5. Kinetikus méréssel nyert FCM adatok jellemzése	32
3.3.6. Statisztikai elemzés	33
4. Eredmények	34
4.1. A fitohemagglutinin és a rotenon által kiváltott válasz Jurkat-sejtekben.....	34

4.1.1. A fitohemagglutinin által kiváltott aktivációs válasz Jurkat-sejtekben	34
4.1.2. A rotenon mitokondriális hatásai.....	37
4.2. Újszülött és felnőtt T-limfociták aktivációja	39
4.2.1. Kisebb mitokondriális tömeg újszülöttek T-sejtjeiben.....	39
4.2.2. Nyugalmi $[Ca^{2+}]_c$, $[Ca^{2+}]_m$ és nyugalmi $\Delta\Psi_m$	40
4.2.3. A fitohemagglutinin által kiváltott aktivációs válasz újszülött és felnőtt T-sejtekben	41
5. Megbeszélés	48
5.1. Az áramlási citométeres vizsgálatok: módszertani megfontolások	48
5.1.1. Az áramlási citometria és a felhasználható fluoreszcens vegyületek	48
5.1.2. A Jurkat-sejtek.....	50
5.1.3. A $[Ca^{2+}]_c$ és a membránpotenciál	51
5.1.4. Mitokondriális kalcium-anyagcsere	53
5.1.5. Mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$)	54
5.1.6. Szabadgyökök.....	54
5.2. A limfociták aktivációja újszülött- és felnőttkorban	55
5.2.1. A vizsgált paraméterek klinikai jelentősége	55
6. Következtetések	61
7. Összefoglalás	63
8. Summary	65
9. Irodalomjegyzék	67
10. Saját publikációk jegyzéke	75
10.1. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények.....	75
10.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények.....	76
11. Köszönetnyilvánítás.....	77

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APC	antigénprezentáló sejt
ATP	adenozin-trifoszfát
AUC	görbe alatti terület (area under the curve)
BP	band pass
$[Ca^{2+}]_c$	citoplazmatikus kalciumion koncentráció
$[Ca^{2+}]_m$	mitokondriális kalciumion koncentráció
CMBC	cord blood mononuclear cells
CRAC	kalciumszint-emelkedés aktiválta kalciumcsatorna (calcium-release activated calcium channel)
DAG	diacil-glicerol
DMSO	dimetil-szulfoxid
DIPPMPO	5-diisopropoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide
ER	endoplazmás retikulum
FCCP	karbonilcianid-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazone
FCM	áramlási citométer
FCS	fetal calf serum
FSC	forward scatter characteristics
HPLC	nagy teljesítményű folyadék kromatográfia
IFN- γ	interferon- γ
IL-2	interleukin-2
IMM	belső mitokondriális membrán
IP ₃	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
LP	long pass
MAP	mitogén-aktivált protein
MCU	mitokondriális Ca ²⁺ uniporter
MNTBAP	mangán (III) tetrakis (4-benzoészav) porfirin klorid
MPTP	mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus
NADH+H	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NF-AT	nuclear factor of activated T cells
NF κ B	nuclear factor kappa B

NO	nitrogén-monoxid
OMM	külső mitokondriális membrán
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline (foszfát puffer)
PHA	fitohemagglutinin
IP ₂	inozitol-1,4-biszfoszfát
PIP ₂	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
RA	rheumatoid arthritis
ROS	reaktív oxigén gyök
RPMI médium	Roswell Park Memorial Institute médium
SLE	szisztémás lupus erythematosus
SSC	side scatter characteristics
Th	helper T-sejt
TCR	T-sejt receptor

1. BEVEZETÉS

Kalcium. Membránpotenciál. Mitokondriumműködés. Reaktív oxigéngyökök. Alapvető sejtélettani jellemzők, melyek központi szerepet játszanak a sejtek működésének szabályozásában, megváltoztatásában. A laboratóriumunk nyújtotta lehetőségeket kihasználva olyan vizsgálómódszer kifejlesztését tűztük ki célul, amelynek segítségével lehetőség van e sejtélettani folyamatok nyomon követésére. Ezek révén egyszerre többféle limfocita-alpopulációban kinetikus módon lehet különböző immunmoduláns szerek hatását jellemezni *ex vivo*, ami akár a preklinikai gyógyszerfejlesztésben is hasznosítható eredményeket hozhat. A technikát kiemelten kívántuk tesztelni újszülöttek vérmintáin.

Klinikai megfigyelések és kísérletes adatok egyaránt azt mutatják, hogy a felnőttekhez képest az újszülöttek hajlamosabbak bakteriális és virális fertőzésekre. Azonban az, hogy az adaptív immunválaszért felelős T-limfociták aktivációs jellegzetességei hozzájárulnak-e a fertőzéshajlamhoz, nem ismert. A doktori disszertációmban bemutatott munkánk kapcsán olyan kísérletsorozatot végeztünk el, melynek során újszülöttektől és kontroll személyektől vett vérmintákból preparált limfociták esetében elemeztük a rövidtávú T-sejt aktivációt.

Elvégzett kísérleteink azt igazolják, hogy az áramlási citométeres mérési eljárásunk alkalmas az eddig is alkalmazott citoplazmatikus kalciumjel vizsgálata mellett, a plazmamembrán- potenciál, a mitokondriális kalcium-anyagcsere, a mitokondriális potenciál és a szabadgyökök képződésének vizsgálatára. Adataink alapján a T-sejt aktivációval járó intracelluláris milieu-változás kinetikája jelentős különbségeket mutat felnőttek és újszülöttek között.

1.1. AZ ÚJSZÜLÖTTEK ADAPTÍV IMMUNVÁLASZÁNAK SAJÁTOS SÁGAI

A világra jövő magzatok immunrendszerének komplex elvárásoknak kell megfelelnie:

1) a szülőcsatornán való áthaladás során védekezés a fertőző ágensekkel szemben (vírusok, baktériumok), 2) az esetlegesen kialakuló, az anyára és a magzatra nézve is káros gyulladáshoz vezető alloimmun válasz megelőzése, 3) az intrauterin steril környezetből a külvilág antigéneiben gazdag környezetébe való átmenet szabályozása (például a bőr és az emésztőrendszer elsődleges kolonizációja) (1-4).

Klinikai megfigyelések és kísérletes adatok egyaránt azt mutatják, hogy a felnőttekhez képest az újszülöttek védtelenebbek a súlyos bakteriális és virális fertőzésekkel szemben (1, 5, 6). Az eddigi kutatási eredmények alapján 1) az újszülöttekre jellemző az alacsonyabb immunsejtszám a perifériás nyirokszervekben (4), 2) az immunválasz eltolódása a 2-es helper T-sejtek irányába (7, 8), 3) és az immunológiai memória hiánya (2) hozzájárul a csökkent immunválaszhoz. Mindazonáltal egyes vizsgálati eredmények szerint bizonyos vakcinák és infekciós ágensegek képesek a felnőttekéhez hasonló Th1-es immunválaszt kiváltani újszülöttekben (9, 10).

Nem pontosan ismert, hogy az adaptív immunválaszban központi szerepet betöltő T-limfociták aktiválódási mechanizmusai ebben az életkorban eltérőek-e.

1.1.1. T-sejtes immunválasz újszülöttekben

A T-sejtek újszülöttkorra jellemző működésével kapcsolatos vizsgálatok többségét egérmodelleken végezték. A jelenlegi, korlátozott számú humán adat, nagyfokú hasonlóságot mutat az egereken végzett kísérletekhez ebben az életkorban. További vizsgálatok szükségesek azonban ennek megerősítésére.

A T-sejtes immunválasz kiváltásához megfelelő számú immunsejt-repertoár, illetve ezen sejtek megfelelő lokalizációja szükséges. A különböző T-sejt szubpopulációk kvantitatív összehasonlítása a perifériás nyirokszervekben azt mutatta, hogy újszülött, 1,5 napos egerek perifériás nyirokcsomóiban, illetve lépében mind a CD4+ mind pedig a CD8+ T-sejtek száma tizede - százada a felnőttekéhez képest. Az idő előrehaladtával a thymust elhagyó T-sejtek kolonizációja során elsősorban a nyirokcsomóban növekszik meg a T-sejtek száma. Mindez azt jelenti, hogy a lépben relatív nagyobb T-sejt deficiencia áll fenn ebben az életkorban. A CD4+ / CD8+ T-sejtek aránya mindkét perifériás nyirokszervben megegyezik a felnőttekére jellemzővel (2:1) (4). Ezen alacsonyabb T-sejtszámok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy azonos mennyiségű infekciós ágensre az újszülöttek korlátozott immunválaszra képesek (1).

A '90-es évek „in vitro” vizsgálataiban csökkent T-sejt proliferációt, valamint alacsonyabb interleukin-2 (IL-2) termelést állapítottak meg, a felnőttekhez képest (11, 12). Ezen eredmények alapján az újszülöttestet immundeficiensnek tekintették. Idővel, a helper T-sejtek, Th1-Th2 sejtcsoportok funkcióinak a leírásával (13, 14) világossá vált,

hogy nem immundeficienciáról, hanem Th2 irányú eltolódásról van szó. Meg kell jegyezni azonban, hogy egyes antigének, melyek képesek erős Th1-sejtes választ kiváltani (pl. DNS vakcinák), a felnőttekéhez hasonló Th1-es immunválaszt indukálnak újszülött egerek CD4+ sejtjeiben (9, 10).

A humán vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a Th-sejtes immunválasz gyakran alacsonyabb újszülöttekben (1). Különböző mechanizmusok járulnak hozzá a korlátozott Th1-es immunválaszhoz a prenatális illetve perinatális életkorban. „In utero”, a Th1-es immunválasz toxikus lenne a placentára nézve, ezért a trophoblastok által termelt IL10, illetve a progeszteron gátló hatást fejtenek ki (15, 16). Újszülöttek CD4+ sejtjei „in vitro” vizsgálatok során, alacsonyabb proinflammatorikus interferon- γ (IFN- γ) termelést mutattak felnőtt naive T-sejtekhez képest (5, 6). Ezzel egybehangzóan az IFN- γ gén promotere hipermetilált az újszülöttek CD4+-sejtjeiben (17).

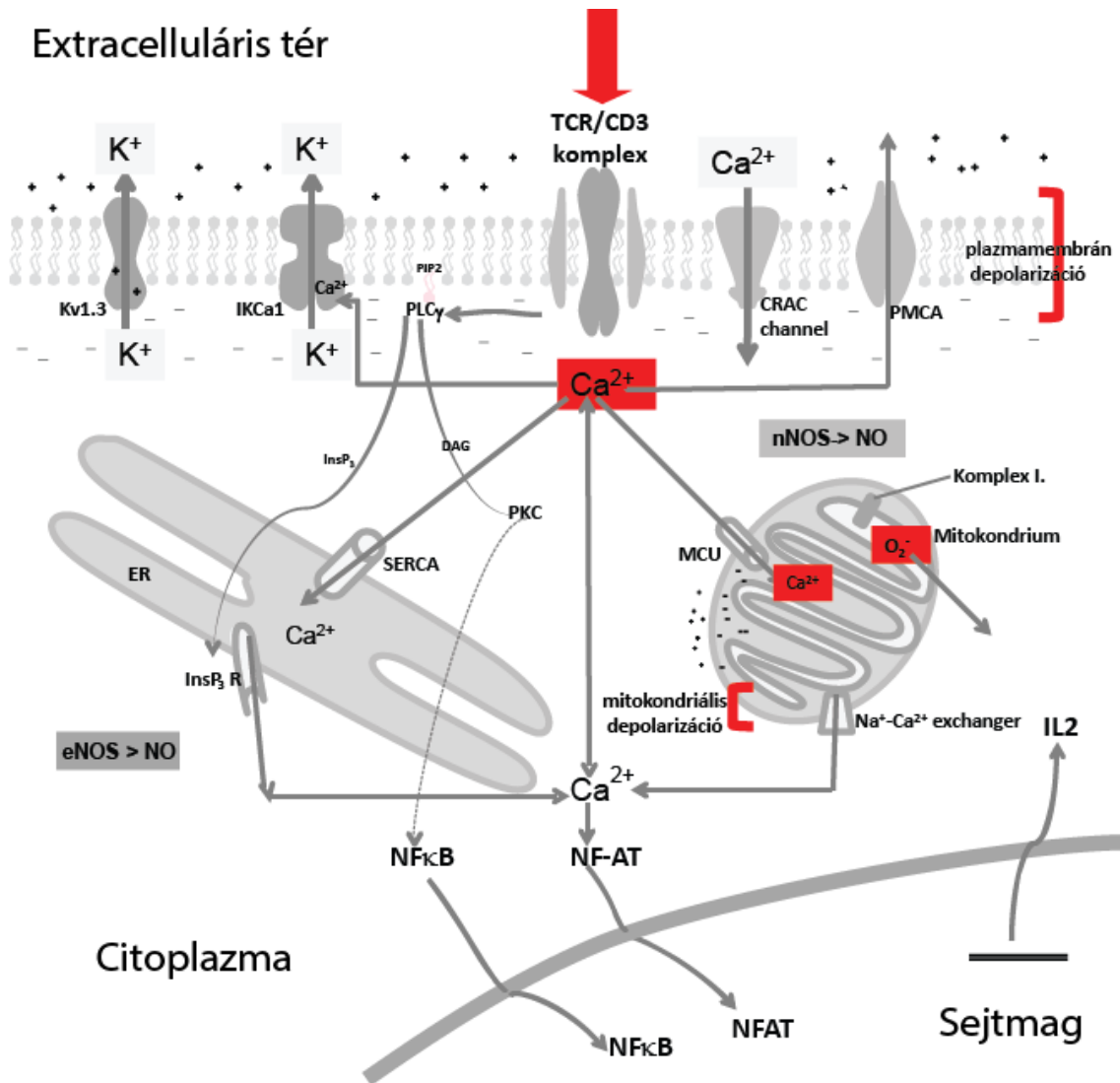
A csökkent proinflammatorikus citokintermeléshez az immunológiai memória hiánya is hozzájárulhat. Az újszülöttek T-sejtjeinek túlnyomó többsége (~90%) naiv (CD45RA+) sejt (18), míg felnőttekben ez az arány körülbelül 55% (19). De egyes szerzők a születéskor is meglévő, Th2-es irányú immunológiai memóriával (CD45RO+ memória sejt) magyarázzák az újszülöttekre jellemző Th2-irányú eltolódást.

A legújabb kutatási eredmények arra utalnak, hogy az újszülöttekben fiziológias körülmények között is magasabb számban keringő CD71+ erithroid sejt (sejtmaggal rendelkező vörösvérsejt) immunszupresszív hatást fejtenek ki (20). Az ezen sejtekre jellemző argináz-2 enzim gátlásával az immunszupresszív hatás gátolható volt. A vizsgálat szerint CD71+ sejt gátló hatása a CD8+ sejteken érvényesül. Újszülött CD71+ sejteket közös sejt kultúrában tartva felnőtt CD8+ T-sejtekkel, a CD8+ sejt aktivációjára jellemző aktivációs markerek kifejeződésének (CD25, CD69) csökkenését figyelték meg.

1.2. ÁRAMLÁSI CITOMÉTERREL VIZSGÁLHATÓ SEJTÉLETTANI FOLYAMATOK ÉS A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ

1.2.1. T-sejt receptoron (TCR) keresztül zajló jelátvitel

Az adaptív immunválasz létrejöttéhez elengedhetetlen azon T-limfociták aktivációja és klonális expanziója, amelyek egy adott antigént felismerni képesek. A folyamat első lépéseként az antigénprezentáló sejtek (APC) által a T-limfociták felé bemutatott antigén és a TCR/CD3 komplex közötti specifikus kölcsönhatás több, sejtmembránon keresztüli jelátviteli útvonalat aktivál (21). Ezen jelátviteli útvonalak határozzák meg a sejt további működését, így a citokintermelést, proliferációt és differenciálódást. A TCR/CD3 komplexről induló és aktiválódó foszforilációs kaszkádok különböző módon befolyásolják a T-limfociták működését. Egyes protein kináz útvonalak, így például a Ras/MAP útvonal, direkt módon járulnak hozzá a T-limfocita proliferációhoz szükséges géntranszkripció irányításához (22). A tirozin kinázok aktiválódása a foszfolipáz C- γ (PLC- γ) aktiválódásához vezet. Ez az enzim egy membránban elhelyezkedő foszfolipidet, a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP2) hasítja, melyből diacilglicerol (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP3) keletkezik. Ezen a ponton kettéválik a jelátviteli útvonal. A DAG aktiválja a protein kináz C-t (PKC), ami több lépésen keresztül az NF κ B nevű transzkripciós faktor aktivációjához vezet (23). Ezzel egy időben az IP3 az intracelluláris tér szabad Ca²⁺-ion koncentrációjának ([Ca²⁺]_c) kétfázisú növekedéséhez járul hozzá (24). A Ca²⁺-jel egy másik transzkripciós faktor, az NF-AT (nuclear factor of activated T cells) aktivációjához vezet (25). Ez a folyamat a Ca²⁺-kalmódulin komplextől függő foszfátáz, a kalcineurin által mediált (26). A kalcineurin defoszforilálja az NF-AT-t, amely így képes lesz felhalmozódni a sejtmagban, ahol az IL-2, az egyik legfontosabb proliferációt serkentő gén promóter régiójához kötődik. Az IL-2 gén aktiválódását követően a T-sejtek, akár antigén jelenléte nélkül is képesek proliferálni (1. ábra).



1. ábra: A Ca^{2+} központi szerepe a T-sejt aktiváció kezdeti szakaszában

A T-sejt receptor komplex stimulálása a citoplazmatikus Ca^{2+} -szint növekedéséhez, a plazmamembrán depolarizációjához, mitokondriális Ca^{2+} felvételhez, a mitokondriális membrán depolarizációjához és szuperoxid képződéshez vezet. CRAC – calcium release activated calcium csatorna, DAG – diacil-glicerol, ER – endoplazmás retikulum, PIP2 – foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot, IP3 – inozitol-1,4,5-triszfoszfát, PLC γ – foszfolipáz-C γ , PKC - protein kináz C, PMCA – plazma membrán kalcium ATPáz, SERCA – szarko/endoplazmás retikulum kalcium ATPáz, TCR/CD3 – T sejt receptor/CD3 komplex, NF-AT - nuclear factor of activated T cells, NF κ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NOS - nitrogén monoxid szintáz, MCU - mitokondriális Ca^{2+} uniporter.

1.2.2. A citoplazmatikus Ca^{2+} -szint és plazmamembrán-potenciál szabályozása

A citoplazmatikus kalcium-jelnek sokrétű hatása van a T-limfociták működésének szabályozásában. Befolyásolja ezen sejtek aktivációját, az immunológiai szinapszis kialakulását, a sejtek motilitását, a sejtosztódást, bizonyos gének transzkripcióját (1. ábra) (24).

Az említett kétfázisú $[\text{Ca}^{2+}]_c$ növekedés az IP_3 keletkezéséhez kapcsolt. Az első fázis során az IP_3 az endoplazmatikus retikulumon (ER) található receptorához (rianodin-receptor) kötődve kalciumot szabadít fel e kompartment Ca^{2+} raktáraiból. Az IP_3 receptor tulajdonképpen intracelluláris ligand-vezérelt ioncsatornaként fogható fel. A Ca^{2+} -szint emelkedés második, fenntartott fázisa az extracelluláris térből belépő Ca^{2+} -ionok következtében jön létre. Ez az ún. „calcium-release activated” Ca^{2+} -csatornán (CRAC) keresztül történik (27). A CRAC-et a sejten belüli Ca^{2+} raktárak kiürülése nyitja, így az ún. „store-operated” csatornák közé tartozik. A CRAC csatornák másik jellegzetessége, hogy aktiváció után az ionáramot elsősorban a Ca^{2+} -ra vonatkozó elektrokémiai hajtóerő határozza meg, a csatorna kapuzása tehát feszültségtől független, de az ionáram nagysága a sejtek membránpotenciáljára érzékeny lesz. Ez a befelé rektifikációval együtt nagyobb Ca^{2+} -áramhoz vezet, ha negatívabb a membránpotenciál (28). A depolarizáló hatású, befelé irányuló Ca^{2+} -áramot ezért kationok kiáramlásával szükséges ellensúlyozni ahhoz, hogy fenntartható legyen az elektrokémiai hajtóerő a Ca^{2+} további beáramlásához, és így a transzkripció folyamatok hatékony működéséhez szükséges Ca^{2+} -jel fennmaradásához.

A biológiai membránok nem egyformán átjárhatóak a különböző ionok számára, eltérő ion-összetételű elektrolit oldatokat választanak el egymástól, és így a két oldaluk között potenciálkülönbség van. Az egyes ionkoncentrációk és a transzmembrán potenciálkülönbségek jellemzőek az adott sejt típusra, illetve membránra. Az állati sejtek membránjainak potenciálja, a mitokondriumokat is beleértve, +50 és -200 mV között változhat. Az egyes csatornákon keresztül folyó iontranszport hajtóerejét az adott ion koncentráció-gradiensének és a membránon keresztüli elektromos potenciál-gradiensnek az összege adja meg, melyet az ion elektrokémiai gradiensek neveznek. Amennyiben ennek értéke nulla, azaz a kérdéses ion koncentrációkülönbségéből fakadó hajtóerő éppen ellensúlyozza az elektromos potenciálkülönbségből eredő hajtóerőt, az adott ion nettó transzportja megszűnik és dinamikus egyensúlyi állapot áll be. Azt az

elektromos potenciál értéket, amelynél adott koncentrációviszonyok mellett egy ion dinamikus egyensúlyban van, a Nernst-egyenlet adja meg, ezt az adott ion egyensúlyi, vagy Nernst-potenciáljának nevezzük. Bármely membránpotenciál esetén a kérdéses ionra ható hajtóerő arányos az adott membránpotenciál és az ion egyensúlyi potenciáljának a különbségével.

A biológiai membránok esetén természetesen egyszerre több ion transzportjával kell számolni, így az egy ionra redukált Nernst-egyenlet helyett, a Goldman-Hodgkin-Katz (G-H-K) egyenletet kell alkalmazni, amely figyelembe veszi a membrán egyes ionokra vonatkoztatott permeabilitási állandóját is (p). A permeabilitási állandó megadja az adott ion egységnyi koncentrációkülönbsége mellett mérhető ionáramlás sebességét. A fiziológiásan legfontosabb szerepet játszó ionok közül a Cl^- , a Na^+ és a K^+ ion befolyásolja leginkább a membránpotenciált.

A T-limfociták plazmamembrán-potenciálját a Kv1.3 és IKCa1 csatornák limfocita-altípustól és a sejt aktiváltságától függően határozzák meg (nyugalomban (-45) és (-70) mV közötti) (29). A nyugvó T-sejtek K^+ kiáramlása dominánsan a feszültségfüggő Kv1.3 csatornán keresztül történik (30). A T-limfociták aktivációjának korai szakaszában mérhető Ca^{2+} influx depolarizáló hatású, melyet a sejtek kationok kiáramlásával (főleg K^+) ellensúlyoz, hogy fenntartható legyen az elektrokémiai hajtóerő a Ca^{2+} -ionok további beáramlásához, és így a transzkripció folyamatok hatékony működéséhez szükséges Ca^{2+} -jel fennmaradásához. Több kísérlet is igazolta, hogy a Kv1.3 csatorna iránt nagyobb szelektivitást mutató ioncsatorna-gátlók, mint a margatoxin vagy a noxiustoxin, depolarizálják a nyugvó T-sejteket, gátolják a Ca^{2+} beáramlását, és így a sejtproliferációt is (31). Mindezek következtében a T-limfociták aktivációja során a plazmamembrán tartósan depolarizálódik (32).

1.2.3. A mitokondriumok szerepe a T-sejtek anyagcseréjében

Az idegen antigének által kiváltott T-sejtes válasz jellemző lépései a következők: kezdeti aktiválódás, majd az antigénre specifikus sejtek klonális expansiója és differenciálódása, az immunválasz lecsengése során részben a sejtek elhalása, részben az immunológiai memória kialakulása és fenntartása. A T-sejtek anyagcseréje jelentős változásokon megy át, hogy fedezze az egyes szakaszokra jellemző metabolikus

igényeket (33, 34). Ebben a mitokondriumok mint energiatermelő szervecskék és mint jelátviteli szabályzókként vesznek részt (35).

A mitokondrium az eukarióta sejtek energiatermelő szervecskéje. A sejtek működéséhez szükséges energia (többnyire adenzin-trifoszfát (ATP)) előállításáért - aerob körülmények között - a mitokondriumok felelősek. A mitokondriumok száma a sejtek energiaigényétől, aktivitásától függően változik, egyes sejtek, például az emberi májsejtek, akár több ezer mitokondriumot is tartalmazhatnak (36).

A mitokondrium morfológiailag egy belső mátrixanyagot tartalmazó, külső (OMM) és belső (IMM) membránnal határolt részecske, melynek átlagos hosszúsága 7 μm , átmérője 0,5-1,5 μm . A két membrán közt található az intermembrán tér. A OMM lipid és fehérje összetétele az eukarióta sejtekre jellemző, mintegy 50%-ban tartalmaz fehérjéket. Ezzel szemben az IMM endoszimbióta eredetűre utal eltérő összetétele. Nagyobb arányban, ~75 %-ban tartalmaz fehérjéket. Az IMM-ben helyezkednek el a légzési lánc komplexei és az F_0F_1 ATPáz is. További tulajdonsága, hogy permeabilitása ionokra nézve nagyon alacsony. Ez a membránt alkotó, egyes prokariótákra jellemző glicerofoszfátidnak, a kardiolipinnek köszönhető. A mitokondrium alacsony ionáteresztő képessége elengedhetetlen a mátrix és a membránközi tér között fennálló H^+ gradiens fenntartásához (37). Ezen H^+ gradiens a hajtóereje a F_0F_1 ATPáz által katalizált ATP szintézisnek.

A mitokondriális mátrix fontos anyagcsere-folyamatok helyszíne. A Szentgyörgyi-Krebs ciklus enzimeit itt állítják elő az ATP termeléshez szükséges $NADH+H^+$ -t (ennek a folyamatnak egyes lépései Ca^{2+} dependensek). Továbbá itt zajlik a zsírsavak β -oxidációja, a hem és szteroid szintézis, valamint az ornitin ciklus.

A T-sejt aktiváció kezdeti szakaszában a naiv T-sejtekre jellemző, zsírsavak mitokondriális β -oxidációját a döntően glikolitikus ATP-termelés váltja fel (emellett a pentóz-foszfát és a glutaminolitikus útvonal is aktiválódik) (38). Azonban korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy a mitokondriális oxidatív foszforiláció és az ezzel párosuló szabadgyök termelés fontos szereppel bír a T-sejt aktivációban (ld. alább) (35). A korábbiakban részletezett citoplazmatikus kalcium jel mitokondriumra való hatása részben felelős a mitokondriális anyagcsere változásokért (39, 40).

1.2.4. A mitokondriumok hatása a kalcium-anyagcserére T-limfocitákban

A mitokondriumok ATP termelő szerepe mellett a celluláris Ca^{2+} anyagcserében is funkciót töltenek be (41). A nyugvó állapotú T-limfociták mitokondrium mátrixának kalcium koncentrációja ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) ~ 200 nM, amely a ~ 180 mV-os potenciálkülönbséget (átlagosan ennyi az izolált mitokondriumok membránpotenciálja (42)) figyelembe véve alacsony. A Nernst-egyenlet egyszerűsített formáját alkalmazva: $-180 \text{ mV} = 30 \lg [\text{Ca}^{2+}]_m/[\text{Ca}^{2+}]_c$ mintegy milliószoros koncentrációnövekedésre lehetne számítani a mitokondriumok mátrixában, azonban a mitokondriumok belső membránján a Ca^{2+} átjutása szabályozott folyamat (43, 44). A mitokondriumok kalciumfelvételét és leadását szabályozó szállítófehérjék a mitokondrium belső membránjában helyezkednek el (45, 46). A mitokondriumok Ca^{2+} felvétele alapvetően potenciálfüggő folyamat. A Ca^{2+} felvételért felelős, befelé rektifikáló uniporter (mitokondriális Ca^{2+} uniporter (MCU)) a mitokondriumok belső membránjában helyezkedik el, amely nagy kalcium szelektivitással rendelkezik (42). Nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mellett az uniporter nyitási valószínűsége igen alacsony, ami részben magyarázza a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_m/[\text{Ca}^{2+}]_c$ hányados 1 körüli értékét. A mitokondriumok lassú Ca^{2+} leadása a hagyományos felosztás szerint nátriumfüggő és nem nátriumfüggő úton történhet. A nátriumfüggő Ca^{2+} leadásban egy $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter szerepel. A transzport sztöchiometriájával kapcsolatos feltételezések ellentmondásosak. A nem nátriumfüggő Ca^{2+} leadásban két mechanizmus vesz részt: egy kalcium-proton antiporter és a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus (MPTP).

A T-sejtekben a mitokondriumok egy része képes érzékelni az immunológiai szinapszisznál kialakuló ún. Ca^{2+} mikrodomént és ennek közvetlen közelébe áthelyeződni (39). Ezáltal ezen mitokondriumok több Ca^{2+} -ot vesznek fel, mint az immunológiai szinapszisztól távolabb esők. Kimutatták továbbá, hogy a mitokondriumok felelősek a citoplazmatikus Ca^{2+} jel plató-fázisának a fenntartásáért a plazmamembrán CRAC csatornáinak befolyásolása révén (47).

A Ca^{2+} jelnek fontos szerepe van a mitokondriumok anyagcseréjében, mely összekapcsolja a sejt energiaigényét a mitokondriális Ca^{2+} dependens enzimek aktivitásával. Ez a Szentgyörgyi-Krebs ciklus enzimeinek direkt, Ca^{2+} -függő, (48) vagy indirekt, foszforiláció általi aktiválásával valósul meg.

1.2.5. Mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$)

A mitokondriumok membránpotenciálja a mitokondrium mátrix és a citoplazma között fennálló potenciálkülönbség (negatív töltésű a mátrix). A potenciálkülönbség kialakulásáért főként a membránközi térben megemelkedett protonkoncentráció felelős, melynek jelentős szerepe van mind az ATP szintézisben, mind a sejtek Ca^{2+} homeosztázisában. Az elektrokémiai potenciálkülönbség befelé irányuló hajtóerőt jelent a H^+ és a Ca^{2+} ionok számára. A $\Delta\Psi_m$ csökkenése (depolarizáció) az intracelluláris oxigénfelhasználás hatékonyságát gátolja, ezen keresztül pedig az ATP szintézis csökkenéséhez vezet, míg a hiperpolarizáció ezzel ellentétes hatású (36).

T-sejtekben a TCR stimulálása által létrejött Ca^{2+} jel fokozza a mitokondriumok Ca^{2+} felvételét. A Ca^{2+} ionok pozitív töltésük által, a mitokondriumok átmeneti depolarizációjához vezetnek (49). Azonban a T-sejt aktiváció későbbi fázisaiban (4, 24 óra) a mitokondriumok hiperpolarizálódását írták le (50). Ezzel egyidejűleg F_0F_1 -ATPáz átmeneti gátlása, ATP hiány és nekrozisra való érzékenység áll fenn.

1.2.6. Szabadgyökök

A ROS (reactive oxygen species) rövid féléletidejű reaktív molekulák. A legtöbb sejttypusban a mitokondrium a szabadgyökök legfőbb forrása, itt ugyanis az oxidatív foszforiláció eredményeként párosítatlan elektronok keletkeznek. A ROS különböző folyamatok során melléktermékként (vastartalmú komplexek O_2 felvétele, szemikininok autooxidációja), vagy enzimatis reakciók során (NADPH, xantin- és flavin-oxidáz enzimek működése) is keletkezhetnek. A ROS keletkezése bizonyos immunsejtekben (makrofágok, monociták, granulociták) esszenciális a baktériumok elleni védekezésben, csökkent NADPH oxidáz működés esetén patológias következményekkel kell számolni (pl. krónikus granulomatózus betegségek). A nem fagocitáló immunsejtekben is keletkezik ROS, ennek jelátvivő szerepe lehet. A ROS kontrollálatlan keletkezése és felhalmozódása sejtkárosító hatású. Ez a folyamat a membránok integritásának megszűnésével, emellett a DNS közvetlen károsodásával és a fehérjék térszerkezetének megváltozásával, keresztkötések kialakulásával, az enzimműködés megváltozásával jár.

A ROS keletkezésnek alapvető szerepe van a T-sejtek aktivációjában (51). Az eddigi eredmények alapján a ROS forrása T-sejtekben a mitokondriumok mellett a fagocita-típusú NADPH-oxidáz (52). A O_2^- keletkezésének helye a mitokondriumok I, II és III komplexe. Az I és II komplex által termelt O_2^- a mitokondriális mátrixba jut, ahol a szuperoxid-diszmutáz 2 hidrogén-peroxiddá konvertálja. A III-as komplex által termelt szuperoxid a citoplazmába és a mitokondriális mátrixba egyaránt diffundálhat. A keletkező szuperoxid és hidrogén-peroxid (O_2^- , H_2O_2) egyaránt szabályoz jelátviteli folyamatokat (ERK kináz, NF- κ B és AP-1 transzkripciós faktorok) és több gén transzkripcióját is (pl. IL-2). A T-limfocitákra jellemző továbbá, hogy a mitokondriális O_2^- termelés kalcium dependens (53). Kimutatták, hogy a mitokondrium által termelt ROS növeli a nitrogén-monoxid szintáz expresszióját (50). Az ezen enzimek termelte NO pedig felelős a mitokondriumok hiperpolarizációjáért, valamint hozzájárul a sejtproliferációhoz is.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk első szakaszának célja olyan áramlási citométeres kísérleti rendszer kidolgozása volt, amelynek segítségével egyes sejtélettani folyamatok időbeli változását lehet mérni, kiértékelni és objektív módon összehasonlítani. Ehhez szükség volt egy sejtélettani folyamatok vizsgálatára alkalmas mérési módszer összeállítására, fejlesztésére.

Munkánk második szakaszának célja az általunk kidolgozott rendszer működésének igazolása két tesztanyag, az aspecifikus limfocita-aktivációt kiváltó fitohemagglutinin és a mitokondriumok I-es komplexét gátló rotenon jelenlétében.

Munkánk harmadik szakaszában kidolgozott módszerünket klinikai alap kutatásban hasznosítottuk. Azt elemeztük, hogy az újszülötteknél a T-sejtek intracelluláris jelátvittele eltérő lehet-e a felnőttekétől.

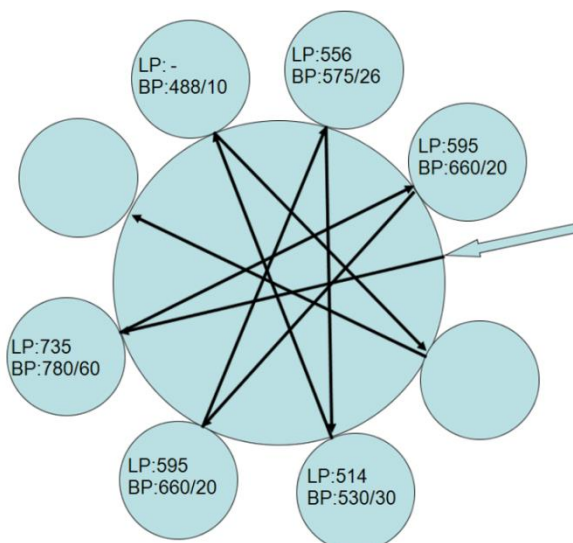
3. MÓDSZEREK

3.1. ÁLTALÁNOS MÓDSZEREK

A kiértékeléshez szükséges algoritmus létrehozását követően olyan kísérleti módszereket dolgoztunk ki, amelyekkel egy időben lehet kétféle sejtcsoporton (pl. CD4+ és CD8+ sejteken) különböző sejtleletani folyamatokat monitorozni. A módszer segítségével lehetőség van a sejtekben a citoplazmatikus kalcium ($[Ca^{2+}]_c$), a sejtmembrán-potenciál, a mitokondriális kalcium ($[Ca^{2+}]_m$), a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) és a reaktív oxigéngyök képződés kinetikájának vizsgálatára.

3.1.1. Készülék

Az általunk használt FACS Aria (BD San Jose, CA) típusú áramlási citométerben két lézer van: egy 488 nm hullámhosszú kék, és egy 633 nm-es vörös lézer. A készülékben az forward scatter (FSC) és a side scatter (SSC) csatornák mellett hét fluoreszcens csatorna található: a kék lézer fényét az ún. octagon, a benne elhelyezkedő optikai szűrők segítségével 5 tartományra bontja (2. ábra); a vörös lézer által gerjesztett fényt az ún. trigon speciális optikai szűrőivel két tartományra bontja. Kísérleteinkben olyan optikai szűrőket használunk, amelyek az egyes sejtleletani folyamatok vizsgálatára alkalmas fluoreszcens fényjelek elkülönítésére alkalmasak.



2. ábra: Az octagon egyes csatornáinál használt szűrők elrendezése. LP= long pass filter, BP= band pass filter

3.1.2. Jurkat-sejtek tenyésztése

A Jurkat-sejteket (humán leukémiás T sejt vonalat) 10% FCS, 2% L-glutamin tartalmú RPMI-1640 médiumot használva termosztátban (5% CO₂, 37°C-on) tartottuk fenn.

3.1.3. Oldatok

A kísérletek egy részét permeabilizált sejteken végeztük. A plazmamembrán permeabilizálása digitoninnal (25 µg/ml) történt, majd a sejteket az alábbi oldatban szuszpendáltuk (oldatkomponensek mmol/l-ben: 117 KCl, 6 NaCl, 1 KH₂PO₄, 0,3 Mg²⁺, 10 K⁺-HEPES, 2 K⁺-EGTA, 0,4 CaCl₂, 1,17 MgCl₂, 0,9 Na⁺-ATP, 0,1 Na⁺-ADP, 2 Na⁺-piruvát, 2 Na⁺-szukcinát valamint a pH 7,4 volt).

3.1.4. Anyagok

Fluoreszcens vegyületek: Fluo-3-AM (#F-1242), TMRM (#T668), di-BA-C4-(5) (#D243), di-BA-C4-(3) (#B-24570), Rhod2/AM (#R1245MP), Dihidroetidium (#D11347), MitoTracker Green (M-7514) mindegyik Molecular Probes (Invitrogen).

Oldószerek, reagensek: DMSO (Sigma, Bonnem, Belgium, #D5879); Pluronic F127 (Molecular Probes (Invitrogen), Karlsbad, CA, #P-3000MP); fitohemagglutinin (Sigma, Bonnem, Belgium, #L8754); FCCP (Sigma, Bonnem, Belgium, #21857-10MG); rotenon (Sigma, Bonnem, Belgium, #082K1294); digitonin (Sigma, Bonnem, Belgium, #D5628); RPMI-1640 (Sigma, Bonnem, Belgium #R0883), L-glutamin (Sigma, Bonnem, Belgium #G7513); FCS (Sigma, Bonnem, Belgium #12138C); CD4-PE-Cy7 antitest (BD Pharmingen San Jose, CA, #558431); CD8-APC-Cy7 antitest (BD Pharmingen San Jose, CA, #557834); Fiqoll-Paque Plus (GE Healthcare, #17-1440-03).

3.1.5. Mitokondrium tömeg mérése MitoTracker Green-nel

A mitokondrium tömeg vizsgálatára MitoTracker Green-t használtunk (emissziós maximum: 516 nm, a detektálásra 530/30 nm BP szűrő szolgált). A festési eljárás során

30 perces inkubációs időt, 37°C-ot, fénytől védett helyet alkalmaztunk, melyet mosási eljárás követett (7 perc, 400 g).

3.2. ÚJ KÍSÉRLETI RENDSZER KIDOLGOZÁSA: INTRACELLULÁRIS FOLYAMATOK MONITOROZÁSA T-LIMFOCITÁKBAN

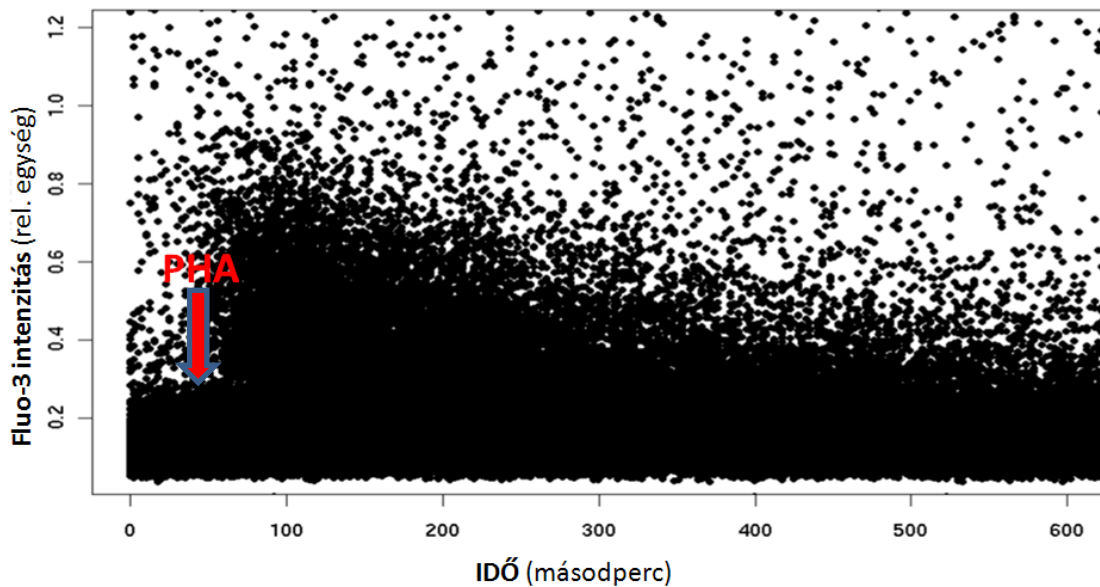
Az egyes sejtelettani folyamatok vizsgálatára alkalmas fluoreszcens festékek kiválasztása során a fluorokrómok excitációs-emissziós tulajdonságai fontos szerepet kaptak. A laboratóriumunkban rendelkezésre álló FCM egyes optikai szűrőinek cseréjével lehetőség nyílt egyszerre több sejtelettani folyamat vizsgálatára azonos mintán.

3.2.1. Citoplazmatikus $[Ca^{2+}]_c$ mérése

A $[Ca^{2+}]_c$ kinetikus mérésre egy korábban kidolgozott módszert használtunk (54). A leggyakrabban használt fluoreszcens molekulák közül (Indo-1, Fluo-3, Fluo-4, Calcium Green) a Fluo-3-at választottuk excitációs és emissziós sajátosságai miatt. A 488 nm-es gerjesztés hatására az 506 nm-es excitációs maximummal rendelkező festék 526 nm-en emittál legjobban. A detektáláshoz 530/30-as BP szűrőt használtunk.

A festékből DMSO-val 10 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk, majd Pluronic-127 hozzáadásával a festék sejtbe való bejutását és kötődését segítettük elő. A sejtekhez 2,6 μ M végkoncentrációban adtuk a festéket, az inkubáció 20 percig, 37°C-on történt (1. táblázat).

A 3. ábrán egy ilyen kinetikus áramlási citométeres mérés látható. Az 1 perces alapvonal-felvételt követően 15 μ g/ml koncentrációjú fitohemagglutininnel aktiváltunk humán T-limfocitákat.



3. ábra: Kinetikus áramlási citometriás $[Ca^{2+}]_c$ mérés. Az 1 perces alapvonal-felvételt követően 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú fitohemagglutininnel aktiváltunk T-limfocitákat.

3.2.2. Membránpotenciál mérés

A membránpotenciál mérésére a fluoreszcens molekulák széles választékban állnak rendelkezésünkre. Az általunk használt fluorokrómok (di-BA-C4-(5) és di-BA-C4-(3)) negatív töltésű molekulák, melyek a Nernst-megoszlás alapján jutnak be a sejtekbe. Az intracelluláris térben különböző membránfelületekhez illetve fehérjékhez kötődnek. A plazmamembrán depolarizációjának hatására a vegyületek nagyobb koncentrációban jutnak a citoplazmába, s ennek hatására az egyes sejtekről kapott fluoreszcens jelintenzitás növekedése tapasztalható. A sejtmembrán hiperpolarizációja ellentétes hatást vált ki, azaz a fluoreszcens jelintenzitás csökken. Ezen fluorokrómok lehetőséget adnak a sejtmembrán-potenciál kvantitatív mérésére is (29). A di-BA-C4-(3) estében 1 mV potenciálváltozás 1%-os intenzitásváltozást jelent. A festék a mitokondriumokhoz negatív töltése miatt nem kötődik. A használt fluorokrómok további előnyei, hogy nem citotoxikusak, nem blokkolják az ioncsatornákat és a glikoprotein efflux pumpák nem pumpálják ki a sejtől.

A mérési módszer beállítása

A festékből DMSO-val 115 μM -os törzsoldat elkészítése után a festési koncentráció beállítása céljából 1 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM, 500 nM és 1 μM végkoncentrációban adtuk a sejtekhez. Az inkubációs idő meghatározásához (a festék megoszlási egyensúlyának kialakulásáig eltelt idő) végzett mérés alapján, 8 perc alatt áll be a stabil egyensúly. A töltést sötétben, 37°C-on végeztük. A legjobbnak a 300 nM-os koncentráció bizonyult. Kihhasználva, hogy a di-BA-C4-(5) emissziós maximuma távol esik a Fluo-3-AM emissziós maximumától, olyan kísérleti rendszert állítottunk be, amelyben a két fluorokróm együtt használható (1. táblázat).

1. táblázat: Egyidejű $[\text{Ca}^{2+}]_c$ és plazmamembrán-potenciál mérés

Lépés	Paraméter	Mennyiség	Leírás
1	Sejtszuszpenzió	0,5 ml	1-2 x 10 ⁶ Jurkat-sejt
2	Töltés Fluo-3-AM- és Pluronic F-127-tel	5 μl	20 perc, 37°C, sötét
3	Mosás	400 g	6 perc, reszuszpendálás módosított RPMI 1640 médiumban
4	Töltés di-BA-C4-(5)-tel	1,3 μl	8 perc, 37 °C, sötét
5	Mérés		
6	Aktiválás	0, 2,5, 5, 10, 15 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban	fitohemagglutinin
7	Mérés	12 perc	37 °C, sötét
8	A jel detektálása: Fluo-3-AM di-BA-C4-(5)	band pass szűrő: 530/30 nm 610/20 nm	BD FACSAria gerjesztés 488 nm-es kék lézerrel
9	A jel specifitásának ellenőrzése	1 μl	ionomycin
Lépés	Megjegyzések		
1	Jurkat-sejtek módosított RPMI 1640 médiumban +10% hőinaktivált borjú szérum, 2 mM L-glutamin és 2 mM CaCl_2		
2	Fluo-3-AM 2.6 μM és Pluronic F-127 0.02% végkoncentrációban, 10 μg Fluo-3-AM feloldva 1 μl DMSO-ban + 4 μl 10% Pluronic F-127		
4	di-BA-C4-(5) 300 nM végkoncentrációban, 115 μM törzsoldat DMSO-ban		
6	1 mg/ml koncentrációjú fitohemagglutinin törzsoldat		
8	Kompenzációs értékek: 6.56% Fluo-3-AM – di-BA-C4-(5) és 17.69% di-BA-C4-(5) – Fluo-3-AM.		
9	1 mg/ml koncentrációjú ionomycin törzsoldat		

3.2.3. Mitokondriális $[Ca^{2+}]_m$ mérése

A $[Ca^{2+}]_m$ mérésre leggyakrabban különböző rodamin-származékokat használnak. Ezek, így a Rhod2/AM is, nettó pozitív töltéssel rendelkező molekulák, amelyeknek a mitokondriumokba való felvétele potenciálfüggő folyamat. Rhod2/AM használata során már sokan leírták, hogy a sejten belüli megoszlása a töltési körülményektől erősen függ. Az egyik lehetséges eljárás a kompartment specificitás növelésére a festékmolekulák redukálása dihidro-Rhod2/AM-é. Erre alkalmas vegyület az acetecetsav. Egy további lehetséges töltési eljárás, ha Pluronic 127-et keverünk a festékkoldathoz, amely segíti az AM észterek sejtbe való bejutását, illetve tárolását. Ha a sejtben lévő dihidro-Rhod2/AM oxidálódik és nem specifikus észterázok segítségével az AM észter lehasad (ez a folyamat a mitokondriumok környezetében gyorsabban zajlik), a festék kalciumot kötve, gerjesztés hatására világít. A töltést követően a minta további inkubációja elősegíti az észterázok hasítását, így a festék mitokondriumokba való felvételét is.

A mérési módszer beállítása

A módszer beállítása során kontroll méréseket végeztünk, egyrészt a megfelelő töltési koncentráció kiválasztásáért, másrészt pedig meg kellett győződnünk a festék sejtben belüli megoszlásáról.

A Rhod2/AM festékből mérés előtt frissen DMSO-val 1 mM-os törzsoldatot készítettünk. Disszociációs konstansa (~500 nM) révén ez a festék az 0,1-10 μ M koncentrációtartományban alkalmas a mitokondriális kalcium mérésére. A festékkoncentráció beállítása, illetve a sejten belüli megoszlás vizsgálata érdekében 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 6 μ M töltési koncentrációkat használtunk, és a 2,5 μ M-os találtuk a legmegfelelőbbnek. A sejten belüli elhelyezkedés vizsgálatára 25 μ g/ml koncentráció digitonint tartalmazó ún. citoszol oldatot használtunk. A digitonin a sejtek plazmamembránjából kioldja a koleszterint, s ennek következtében a membrán az ionok és a festékmolekulák számára átjárható lesz. A töltési, mosási eljárás után a mintát a mérés kezdetén ilyen oldatba helyeztük. Amennyiben jelentős mennyiségű festék van a citoplazmában a jelintenzitás a kezdeti értékhez képest csökkenni kezd a mérés során. E

kísérlet segítségével meggyőződünk arról, hogy a Rhod2 2,5 μM -os koncentrációban használva a mitokondriumokra specifikus jelet ad (2. táblázat).

2. táblázat: $[\text{Ca}^{2+}]_m$ mérése

Lépés	Paraméter	Mennyiség	Leírás
1	Sejtszuszpenzió	0,5 ml	1-2 x 10 ⁶ Jurkat-sejt
2	Töltés Rhod2/AM- és Pluronic F-127-tel	5,25 μl	20 perc, 30°C, sötét
3	Mosás	400 g	6 perc, reszuszpendálás módosított RPMI 1640 médiumban
4	Mérés		
5	Aktiválás	0, 2,5, 5, 10, 15 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban	Aktiválás
6	Mérés	12 perc	37°C, sötét
7	A jel detektálása	band pass szűrő: 575/26 nm	BD FACSAria gerjesztés 488 nm-es kék lézerrel
8	A jel specificitásának ellenőrzése	1 μl	FCCP
Lépés	Megjegyzések		
1	Jurkat-sejtek módosított RPMI 1640 médiumban +10% hőinaktivált borjú szérum, 2 mM L-glutamin és 2 mM CaCl_2		
2	2,5 μM Rhod2/AM és 0,02% Pluronic F-127 végkoncentrációban; 1,25 μl 1 mM Rhod2/AM törzsoldat DMSO-ban feloldva + 4 μl 10% Pluronic F-127		
5	1 mg/ml koncentrációjú fitohemagglutinin törzsoldat		
8	1 mM koncentrációjú FCCP		

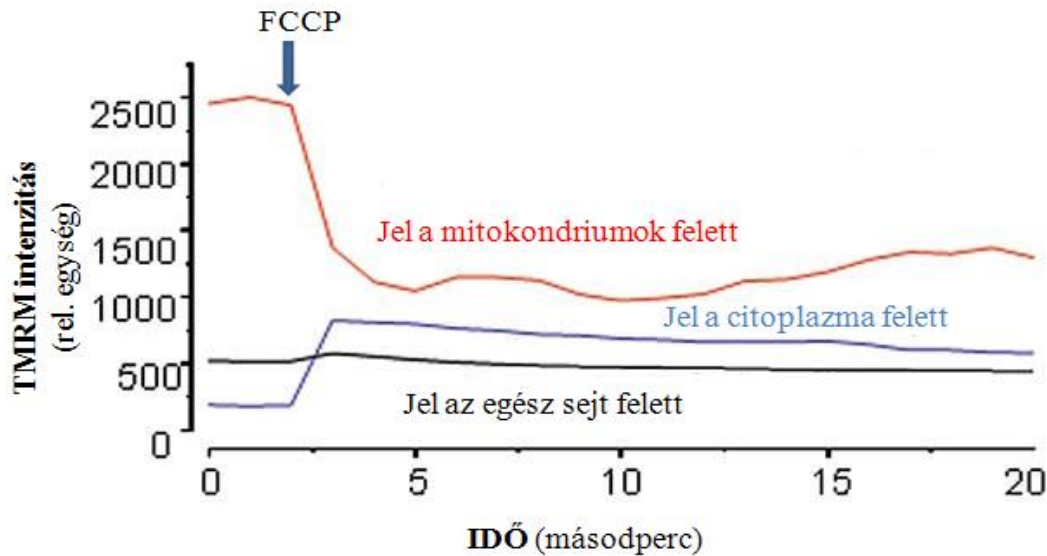
3.2.4. Mitokondriális membránpotenciál mérés

A $\Delta\Psi_m$ mérésére leggyakrabban a membrán permeábilis pozitív töltésű molekulák terjedtek el (pl. DiOC₆, JC1, TMRE és TMRM). Ezen kationok könnyen átjutnak a plazmamembránon és az elektrokémiai potenciáltól függően oszlanak meg az egyes

sejtkompartmentekben. Azonban e festékek további viselkedése nagymértékben függ az intracelluláris koncentrációjuktól.

A „disztribúciós/redisztribúciós-elv”

A fluoreszcens mikroszkópiában a TMRM festéket nagyon alacsony koncentrációban használják (sejttípustól függően 15-40 nM), ami precíz, kvantitatív mérést tesz lehetővé. Ebben a mérési koncentrációtartományban a festék koncentrációja és az emittált fény intenzitása között lineáris összefüggés van. A festék lokális koncentrációja a Nernst-megoszlást követve módosul a kompartmentek elektrokémiai potenciáljától függően. (Az extracelluláris tér és a citoszol $\sim(-65)$ mV-os potenciálkülönbségét figyelembe véve, mintegy 10-szeres koncentrációnövekedés várható az intracelluláris térben.) Továbbá a mitokondriumok mátrixa és a citoplazma közti (-150) - (-180) mV potenciálkülönbség következtében a festék körülbelül 400-800-szor nagyobb koncentrációban dúsul a mitokondriumokban. Ezek együttesen 3-4000-szeres intenzitásnövekedést eredményeznek az extracelluláris térhez képest. Azonban ez a módszer az áramlási citometriában nem használható, mert bármilyen irányú potenciálváltozás következik is be a mitokondriumokban, a sejtek egészéről kapott jelintenzitás nem változik (4. ábra).



4. ábra: Mitokondriális potenciálmérés fluoreszcens mikroszkópon TMRM segítségével („disztribúciós/redisztribúciós-elv”). A vörös görbe a festék mitokondriumok feletti, a kék a citoplazma feletti, a fekete az egész sejt feletti jelintenzitás-változást mutatja. (Az ábrát Prof. Duchen összefoglalójából (36) vettük át és módosítottuk.) FCCP - karbonilcianid-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazone.

A „quench/dequench-elv”

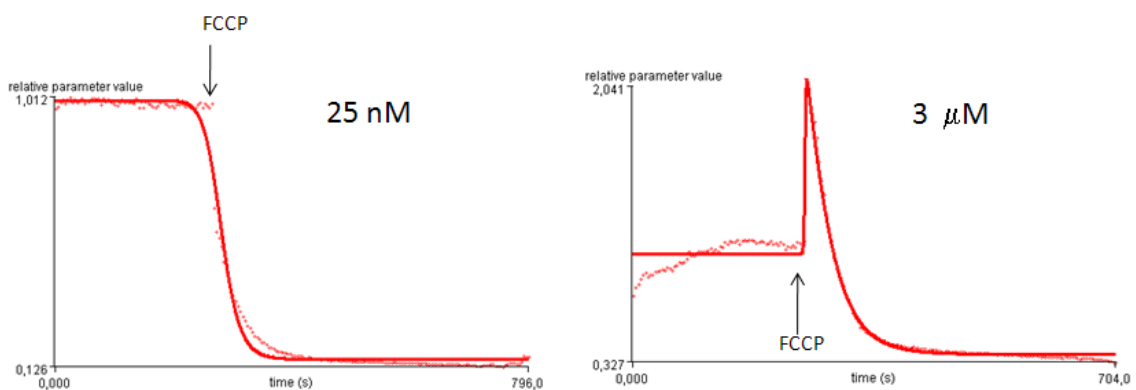
A TMRM festéket nagyobb töltési koncentrációban (1-20 μM) használva, a festék koncentrációja és a kibocsátott fluoreszcens fény intenzitása között nemlineáris összefüggés van. Azaz a festékkoncentráció növekedését nem egyenes arányban követi az emittált fény intenzitásnövekedése. Tehát ez a koncentráció-tartomány csak kvalitatív mérésre ad lehetőséget. A relatív nagy festékkoncentráció következtében a mitokondriumokban olyannyira feldúsulnak a festékmolekulák, hogy egy „autoquenching”-nek nevezett jelenség következik be. Ez azt jelenti, hogy a gerjesztés hatására keletkező fényenergia egyrészt a monomer festékmolekulák egymásnak ütközése következtében elnyelődik, illetve a kialakuló aggregált festékmolekulák elvesztik fluoreszkáló képességüket. Ennek következtében a mitokondriumokat érő depolarizáló hatásra a festékmolekulák a citoplazmába áramlanak, ami egy nettó

fluoreszcens intenzitásnövekedést eredményez. Amiatt, hogy az áramlási citométerek segítségével csak az egész sejtről kaphatunk információt, ez a módszer lehetőséget nyújt a mitokondriumok potenciálváltozásának nyomon követésére.

A mérési módszer beállítása

Az 500 μM koncentrációjú DMSO-ban feloldott TMRM-et a kontroll mérések során 25 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM és 5 μM végkoncentrációban adtuk Jurkat-sejtekhez. A festési eljárás során 20 perces inkubációs időt, 37°C-ot, fénytől védett helyet alkalmaztunk, melyet mosási eljárás követett (6 perc, 400 g). A mérések során FCCP-t használtunk, mely a mitokondriumokban protonofór hatású, depolarizációt okoz. A sejteket 488 nm-en gerjesztettük és az emissziós fényt 576/26 nm-en detektáltuk.

Eredmény: az 5. ábrán látható módon a 25 nM-os töltési koncentrációt követő FCCP hozzáadása, a mitokondriumok depolarizálódását és a festék sejtekből való kiáramlását okozta. Míg a 3 μM -os töltési koncentrációnál az FCCP a festékmolekulák mitokondriumokból való kiáramlását, ennek következtében gyors jelintenzitásnövekedést (spike) okozott, majd a festék ebben az esetben is kiáramlott a sejtekből. A kontroll mérések során a 3 μM -os koncentrációt találtuk a legmegfelelőbbnek (3. táblázat).



5. ábra: A TMRM (Tetrametilrodamin-metil-észter) festék koncentrációjának beállítása. Jurkat-sejtek mitokondriális depolarizációja a protonófor FCCP – (karbonilcianid-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazone) hatására különböző töltési koncentrációk esetén.

3. táblázat: Mitokondriális membránpotenciál mérés

Lépés	Paraméter	Mennyiség	Leírás
1	Sejtszuszpenzió	0,5 ml	1-2 x 10 ⁶ Jurkat-sejt
2	Töltés TMRM-mel	1 µl	20 perc, 37°C, sötét
3	Mosás	400 g	6 perc, reszuszpendálás módosított RPMI 1640 médiumban
4	Mérés		
5	Aktiválás	15 µg/ml végkoncentrációban	Aktiválás
6	Mérés	12 perc	37°C, sötét
7	A jel detektálása	band pass szűrő: 575/26 nm	BD FACSAria gerjesztés 488 nm-es kék lézerrel
8	A jel specificitásának ellenőrzése	1 µl	FCCP
Lépés	Megjegyzések		
1	Jurkat-sejtek módosított RPMI 1640 médiumban +10% hőinaktivált borjú szérum, 2 mM L-glutamin és 2 mM CaCl ₂		
2	1 µM TMRM végkoncentrációban;		
5	1 mg/ml koncentrációjú fitohemagglutinin törzsoldat		
	1 mM koncentrációjú FCCP		

3.2.5. Szabadgyök képződés (O₂⁻) mérése

Az intracellulárisan keletkező szabadgyökök (O₂⁻, H₂O₂ stb.) mérésére leggyakrabban használt fluoreszcens vegyületek közül (Dihidrorodamin 123, DCFHDA, DHE) méréseink során a DHE-t alkalmaztuk.

A DHE a sejtekbe passzívan bejutó molekula, ahol a szuperoxid gyökkel reagálva etidiummá alakul. A festék redukált formája kék fényt emittál, míg az oxidálódott molekula a sejtmagba jut, ahol a DNS-hez kötődik, és gerjesztés hatására vörös fényt emittál. Az oxidált forma kis mértékben a mitokondriumokban is felhalmozódik. A

mérések során a sejteket 488 nm-es hullámhosszal gerjesztettük és az emittált fényt 610/20 nm-es tartományban detektáltuk.

A mérési módszer beállítása

A festékből DMSO-val 500 μM -os törzsoldat elkészítése után az izolált mononukleáris sejtekhez 0,5 μM , 1 μM , 1,5 μM , 2 μM , 2,5 μM , 3 μM végkoncentrációban adtuk a festéket. Az inkubálási idő 0-25 perc között változtattuk. A mérési eredmények alapján az 1 μM -os koncentráció, 18 perces inkubációval, 37°C-on volt a legmegfelelőbb, ami megfelelt az irodalomban leggyakrabban használt töltési körülményeknek. Nagy György és munkatársai szintén Jurkat-sejteket alkalmazva, kontroll méréseket végeztek 300 μM MNTBAP (egy szuperoxid-diszmutáz hatású vegyület) és 300 μM DIPPMPO (egy szabadgyökfogó vegyület) segítségével. Ezen eredményeket felhasználva (50) a szabadgyök képzés gátlására kontroll méréseket nem végeztünk.

4. táblázat: Szabadgyök képződés (O_2^-) mérése

Lépés	Paraméter	Mennyiség	Leírás
1	Sejtszuszpenzió	0,5 ml	1-2 x 10 ⁶ Jurkat-sejt
2	Töltés Dihidroetidiummal	1 μl	18 perc, 37°C, sötét
3	Mérés		
4	Aktiválás vagy gátlás	0, 2,5, 5, 10, 15 $\mu\text{g/ml}$ vagy 0,002, 0,02, 0,2, 2, 20, 200 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban	fitohemagglutinin vagy rotenon
5	Mérés	12 perc	37°C, sötét
6	A jel detektálása	band pass szűrő: 610/20 nm	BD FACSAria gerjesztés 488 nm-es kék lézerrel
Lépés	Megjegyzések		
1	Jurkat-sejtek módosított RPMI 1640 médiumban +10% hőinaktivált borjú szérum, 2 mM L-glutamin és 2 mM CaCl_2		
2	500 μM koncentrációjú Dihidroetidium törzsoldat DMSO-ban feloldva		
4	1 mg/ml koncentrációjú fitohemagglutinin törzsoldat		

3.3. A KLINIKAI VIZSGÁLATHOZ HASZNÁLT MÓDSZEREK

3.3.1. A vizsgálat alanyai

Az újszülöttek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatához 11 egészséges felnőttől vettünk perifériás vérmintát, és 12 érett, egészséges újszülöttről gyűjtöttünk köldökzsinórvért közvetlenül per vias naturales szülés után. Az alanyok adatait az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Az újszülöttek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatunk résztvevői

	Alanyok száma	Alanyok neme (F/N)	Születési tömeg	Gesztációs kor (újszülött) és életkor (felnőtt)
Újszülött	12	10/2	3375 (2510–4040) g	39 (38–40) hét
Felnőtt	11	3/8	N.A.	25 (22–44) év

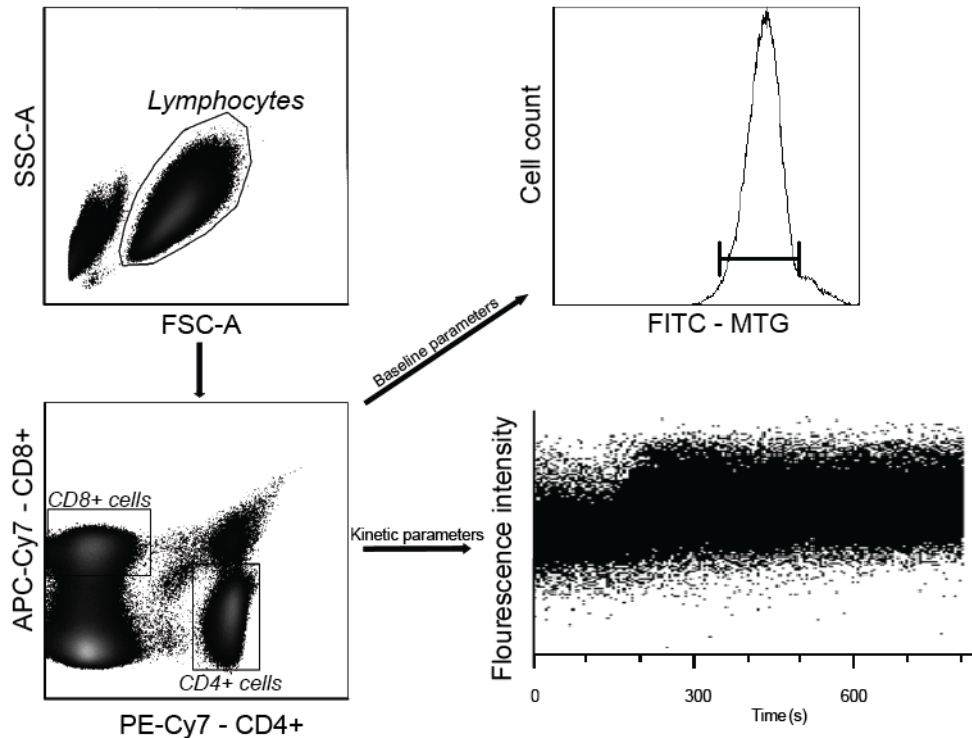
3.3.2. A mononukleáris sejtek izolálása

Heparinnal alvadásgátolt, perifériás vénás vérből, illetve köldökzsinórvérből gradiens centrifugálással Ficoll-Paque Plus segítségével PBMC-t (peripheral blood mononuclear cells) illetve CBMC-t (cord blood mononuclear cells) izoláltunk (27 perc, 2000 RPM), majd mostuk kétszer PBS-ben (7 perc, 1800 RPM). Ezt követően a sejteket reszuszpendáltuk és felvettük 2 mM hozzáadott Ca^{2+} -ot tartalmazó RPMI 1640-médiumban. A mérések előtt a sejteket tripán késsel festettük, csak azokon a mintákon végeztünk mérést, ahol az élő sejtek aránya 90% felett volt.

3.3.3. Sejt felszíni markerek és kapuzás

A sejteket 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk a következő konjugált anti-humán monoklonális antitestek kombinációjával, a gyártó javaslatának megfelelően: anti-CD4 phycoerythrin-Cy7, anti-CD8 allophycocyanin-Cy7.

A CD4⁺ illetve CD8⁺ sejtek elkülönítését az 6. ábrán látható módon végeztük.



6. ábra: Festési és kapuzási eljárás. A limfocita populációt a FSC (Forward Scatter Characteristics) és SSC (Side Scatter Characteristics) tulajdonságaik alapján különítettük el. A CD4⁺ és CD8⁺ sejteket a sejt felszíni markerek segítségével különböztettük meg, majd vizsgáltuk a nyugalmi állapotra jellemző paramétereket, (például a mitokondriális tömeget MitoTracker Green (MTG) segítségével) vagy kinetikus méréshez használtuk őket.

3.3.4. A sejtek aktivációja

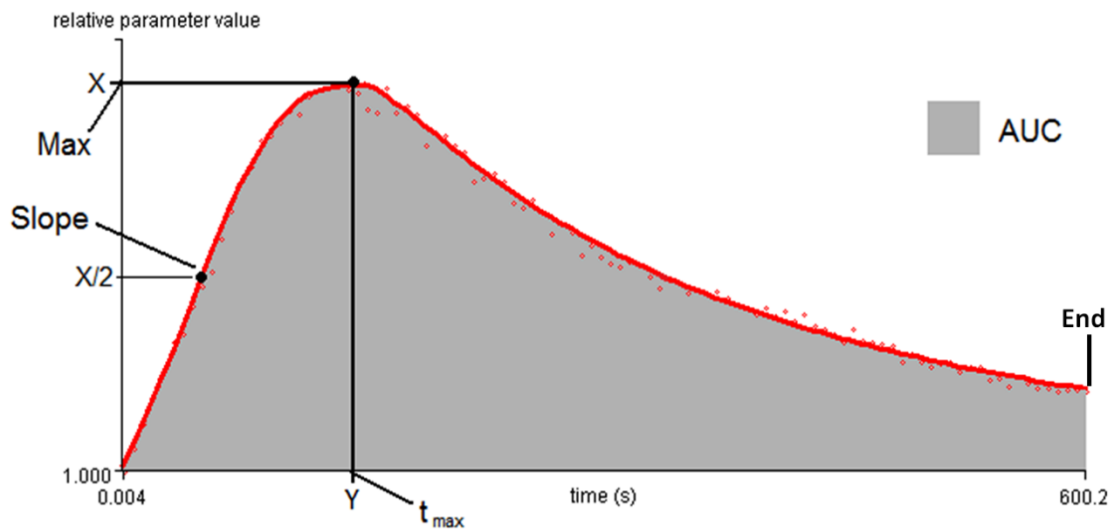
A mérések kezdetén 2 perces alapvonal rögzítését követően PHA-val aktiváltuk mind a Jurkat-sejteket, mind pedig a human mintákat. Az aktiváláshoz, amennyiben az másként nem jelzett a továbbiakban, 15 µg/ml koncentrációt használtunk. Az intracelluláris jel változását 12 percig követtük.

3.3.5. Kinetikus méréssel nyert FCM adatok jellemzése

Az eddigi mérések során az FCM-t használó kutatók többnyire csak egy adott időpontban határozták meg az analit szintjének változását, a kiindulási értékhez képest. Mások ábrázolták ugyan az analit szintjének változását az idő függvényében, azonban nem tudták a kapott mérési adatok kinetikáját összehasonlítani. Ennek oka az volt, hogy nem állt rendelkezésre az az algoritmus, ami lehetővé tette volna, hogy a kapott adatokra függvény(ek)e)t illesszenek és így, objektív módon jellemezni tudják a változást. Munkacsoportunk egy olyan eljárást dolgozott ki, ami lehetővé teszi a sejtekben zajló életfolyamatok valós idejű monitorozása során született adatok értékelését (55).

Folyamatos (akár fél órán keresztül tartó) mintavétel esetén, ezzel az eljárással lehetővé válik a vizsgált sejtszuspenzióban a kérdéses analit szintjének a monitorozása, például sejttaktiváció folyamata során. A módszer egy további előnye, hogy többféle sejtcsoport viselkedését lehet vizsgálni ugyanazon trigger hatására.

A mérések során nyert adatokat a laboratóriumunkban fejlesztett, FacsKin (www.facskin.com) elnevezésű számítógépes program segítségével értékeltük. Ez a matematikai módszer különböző függvényeket illeszt a mérési adatokra. Egy megfelelő algoritmus segítségével úgy állítja be az illesztendő függvény paramétereit, hogy a mérési pontoktól való eltérés lehetőleg minimális legyen. A program minden mérés esetében a lehető legjobban illeszkedő függvényt választotta az álabbi függvénykészletből: konstans függvény, pozitív logisztikus függvény, negatív logisztikus függvény, pozitív dupla logisztikus függvény és negatív dupla logisztikus függvény. Mivel a különböző függvények egyes pontjai jól definiálhatóak és számszerűsíthetőek, lehetőség nyílik különböző mérések kvantitatív összehasonlítására. Az 7. ábra a dupla logisztikus függvény egyes kitüntetett paramétereit mutatja be, melyeket az elemzéseink során is felhasználtunk. A görbe alatti terület (AUC) értéke a kiváltott válasz nagyságát írja le. Egy egysége (U) egyenlő az egy másodpercre eső relatív intenzitás értékkel. A relatív intenzitás érték megegyezik az aktuális intenzitás érték és a nulla másodpercben mért intenzitás érték hányadosával. A módszerről bővebb leírás itt található: <http://facskin.bitbucket.org/index.html>; (56).



7. ábra: A kettős logaritmusos függvény kiszámított paramétereit AUC – görbe alatti terület, Max – maximum érték, Slope – a görbe meredeksége a Max érték felénél ($X/2$), t_{max} – a Max érték elérésének ideje, End – ending value.

3.3.6. Statisztikai elemzés

Az adatok elemzéséhez Microsoft Excel, R software (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) programokat használtunk. Az adatok összehasonlításához Hettmannsperger-Norton trendtesztet, Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztet, valamint kétmintás T-tesztet használtunk. A 0,05-nél kisebb p értékeket vettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A FITOHEMAGGLUTININ ÉS A ROTENON ÁLTAL KIVÁLTOTT VÁLASZ JURKAT-SEJTEKBEN

4.1.1. A fitohemagglutinin által kiváltott aktivációs válasz Jurkat-sejtekben

Méréseink során a PHA okozta korai aktivációs változásokat monitoroztuk 12 percen keresztül Jurkat-sejteken. A bevezetésben leírt, a T-limfociták aktivációját jellemző molekuláris folyamatok következtében létrejövő sejtélettani változásokat elsőként sikerült áramlási citométer segítségével, egy közös rendszerben matematikailag jellemeznünk.

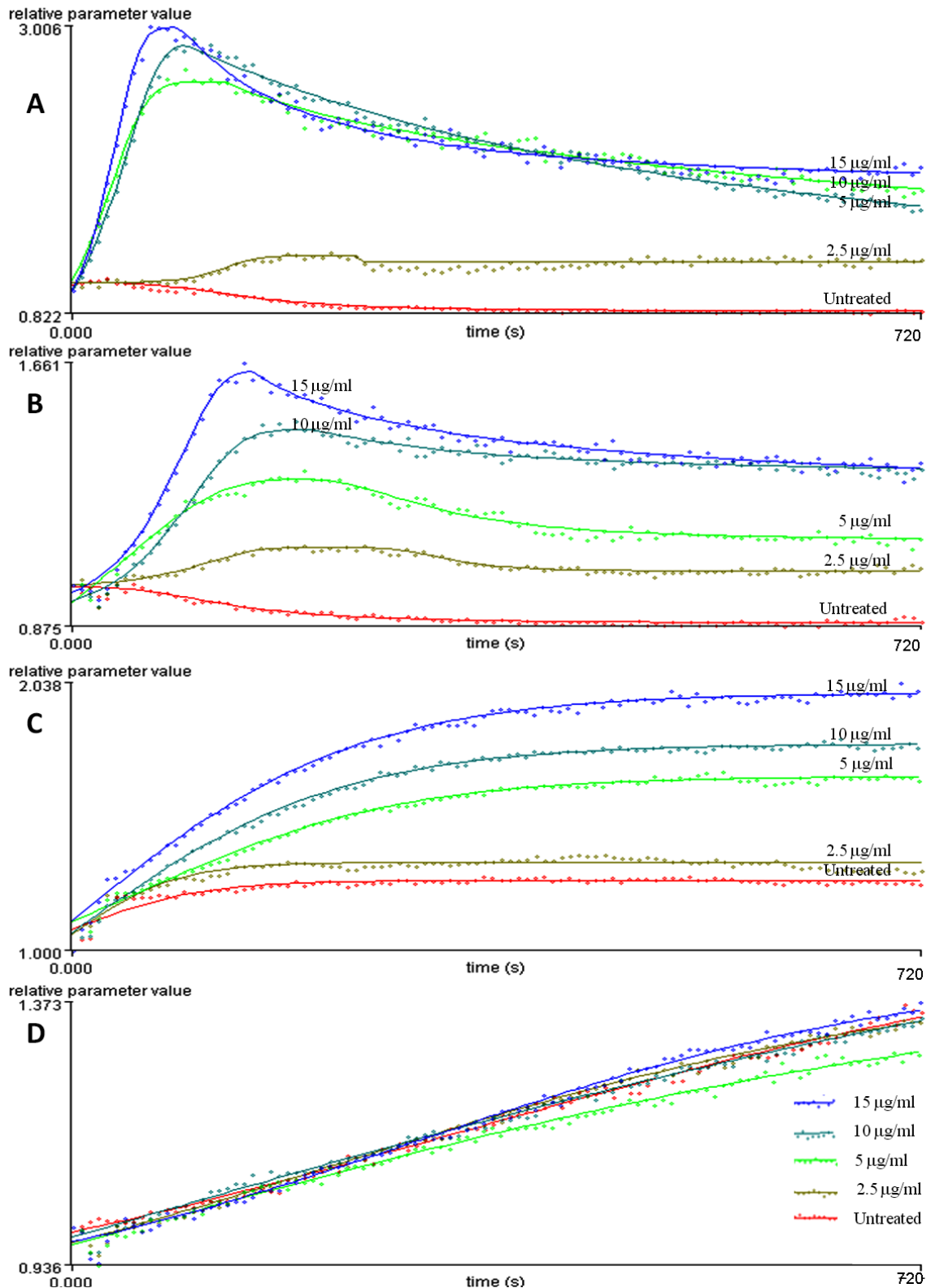
Az első kísérletben Jurkat-sejteket stimuláltunk növekvő (0, 2,5, 5, 10, 15 $\mu\text{g/ml}$) végkoncentrációjú PHA-val és monitoroztuk a szekvenciálisan mért sejtek által kibocsátott fluoreszcens jelintenzitásokat, 12 percen keresztül ($n=5$ minden egyes PHA koncentrációban).

A $[\text{Ca}^{2+}]_c$ és a $[\text{Ca}^{2+}]_m$ változásokra a dupla logisztikus függvény illeszkedett a legjobban (8. ábra A és B). Trendanalízis segítségével szignifikáns összefüggést állapítottunk meg a PHA koncentrációja, valamint a függvények AUC, Max és Slope paraméterei között. A legkisebb koncentrációjú PHA is szignifikáns választ váltott ki mind a citoplazmatikus, mind pedig a mitokondriális Ca^{2+} szint változásában a kezeletlen mintákhoz képest (AUC, Max).

A plazmamembrán-potenciál változások jellemzésére a logisztikus függvényt használtuk. A trendanalízis szignifikáns korrelációt detektált az AUC és End paraméterek, valamint a PHA koncentrációja között. Szignifikáns plazmamembrán depolarizációt az 5 $\mu\text{g/ml}$ -es PHA váltott ki (8. ábra C).

Vizsgálatunk során PHA hatására nem változott a szuperoxid-termelés Jurkat-sejtekben (8. ábra D).

A 6. táblázat foglalja össze eredményeinket.



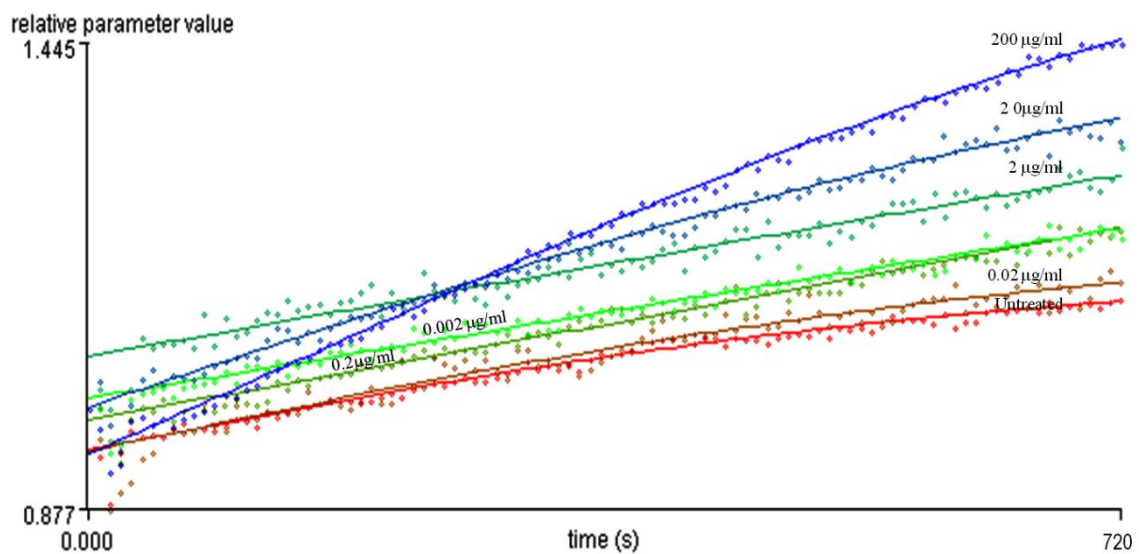
8. ábra: A növekvő koncentrációjú fitohemagglutinin (PHA) hatása Jurkat T-sejtekre: kalcium-jel A), mitokondriális kalciumfelvétel B), plazmamembrán-potenciál C), szabadgyök képződés D). A mérések kezdetén 0, 2,5, 5, 10, és 15 µg/mL végkoncentrációban PHA-t adtunk a sejtekhez.

6. táblázat: A fitohemagglutinin hatása Jurkat-sejtekben fluoreszcens festékek jelintenzitására, melyek specifikusak A) Citoplazmatikus Ca^{2+} -ra, B) Mitokondriális Ca^{2+} -ra, C) Plazmamembrán-potenciálra és D) szuperoxidra. A számított függvény-paraméterek: AUC—görbe alatti terület, Unit (U), Max—Maximum érték, relative parameter value (rpv), tmax —A maximum elérésének ideje, másodperc (s), Slope—Meredekség az 50%-os értéknél, End—Végső érték. (l=lineáris trend, q=kvadratikus trend). Az adatok átlag értékek (95%-konfidencia intervallummal). *PHA stimulált minták összehasonlítva kezeletlen mintákkal. $p < 0,05$, NS—nem szignifikáns

PHA konc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Függvény paraméter			
	AUC (U)	Slope	Max (rpv)	t _{max} (s)
A) Citoplazmatikus Ca^{2+}-jel (illesztett függvény: dupla logisztikus)				
0	637,1 [531,4 - 742,7]	0,161 [0,005 - 0,993]	1,094 [0,816 - 1,373]	45,5 [11,4 - 185,0]
2,5	959,5* [853,8 - 1065,1]	0,006 [0,002 - 0,020]	1,626* [1,347 - 1,904]	286,2* [146,7 - 425,7]
5	1390,8* [1285,1 - 1496,4]	0,016 [0,005 - 0,050]	2,414* [2,135 - 2,693]	267,4 [127,9 - 406,9]
10	1500,4* [1394,8 - 1606,0]	0,022* [0,008 - 0,090]	2,593* [2,314 - 2,871]	177,9 [38,4 - 317,3]
15	1506,8 [1401,2 - 1612,5]	0,025 [0,007 - 0,080]	2,658* [2,379 - 2,937]	125,0 [14,5 - 264,5]
Trendanalízis (p érték)	1 < 0,01	q < 0,01	1 < 0,01	NS
B) Mitokondriális Ca^{2+}-szint (illesztett függvény: dupla logisztikus)				
0	623,0 [566,6 - 679,3]	0,289 [-0,013 - 0,591]	0,911 [0,772 - 1,050]	241,7 [109,8 - 532,0]
2,5	703,1* [641,4 - 764,8]	0,175 [-0,128 - 0,477]	1,049* [0,910 - 1,188]	149,8 [68,1 - 329,6]
5	803,2* [741,6 - 864,9]	0,027 [-0,275 - 0,329]	1,192* [1,053 - 1,331]	159,9 [72,7 - 351,9]
10	860,5* [798,8 - 922,2]	0,005 [-0,298 - 0,307]	1,358* [1,219 - 1,497]	206,2 [93,7 - 453,7]
15	938,72* [869,8 - 1007,7]	0,006 [-0,325 - 0,337]	1,521* [1,368 - 1,673]	199,3 [84,0 - 472,9]
Trendanalízis (p érték)	1 < 0,01	NS	1 < 0,01	NS
C) Plazmamembrán-potenciál ($\Delta\psi$) (illesztett függvény: logisztikus)				
	AUC (U)	End (rpv)		
0	843,0 [675,6 - 1010,4]	1,341 [1,102 - 1,580]		
2,5	1084,8 [917,4 - 1252,2]	1,723 [1,491 - 1,968]		
5	1157,4 [990,0 - 1324,8] *	1,561 [1,323 - 1,800]		
10	1159,9 [992,5 - 1327,3] *	1,747 [1,508 - 1,985] *		
15	1286,5 [1119,1 - 1453,0] *	1,907 [1,668 - 2,146] *		
Trendanalízis (p érték)	q < 0,01	l=0,02		
D) Szuperoxid keletkezés (O_2^-) (illesztett függvény: logisztikus)				
0	875,6 [841,3 - 909,9]	2,090 [1,560 - 2,621]		
2,5	867,0 [832,7 - 901,3]	1,945 [1,415 - 2,475]		
5	872,4 [838,0 - 906,7]	1,878 [1,348 - 2,408]		
10	884,4 [850,1 - 918,8]	1,955 [1,425 - 2,486]		
15	881,3 [847,0 - 915,7]	2,217 [1,687 - 2,747]		
Trendanalízis (p érték)	NS	NS		

4.1.2. A rotenon mitokondriális hatásai

A módszerünk validálásának érdekében egy ismert mitokondriális I-es komplex inhibitor, rotenont használtunk (0, 0,002, 0,02, 0,2, 2, 20, és 200 μM végkoncentrációban) a szuperoxidtermelés indukálására. Ezen mérések adataira logisztikus függvényt illesztettünk. Hettmansperger-Norton trendanalízis szignifikáns összefüggést mutatott a rotenon dózisa, valamint az AUC, End paraméterek között (9. ábra és 7. táblázat).

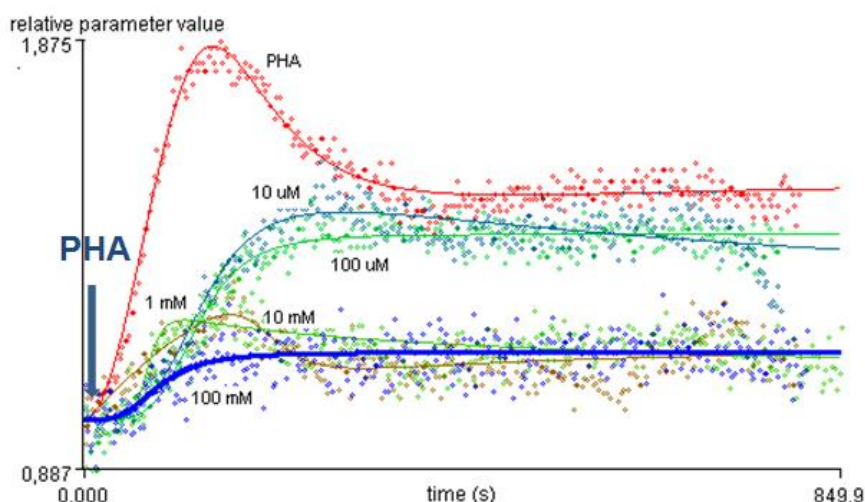


9. ábra: A növekvő koncentrációjú rotenon hatása Jurkat T-sejtek szuperoxid (O_2^-) képzésére. A mérések kezdetén 0, 0,002, 0,02, 0,2, 2, 20, 200 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban rotenont adtunk a sejtekhez.

7. táblázat: A rotenon hatása a szuperoxid (O_2^-) keletkezésre Jurkat-sejtekben. A számított függvényparaméterek: AUC—görbe alatti terület, Unit (U), End—Végső érték, relative parameter value (rpv), (l=lineáris trend). Illesztett függvény: logisztikus. Az adatok átlag értékek (95%-konfidencia intervallummal).*Rotenon stimulált minták összehasonlítva kezeletlen mintákkal. $p < 0.05$

Szuperoxid keletkezés (O_2^-) rotenon kezeléssel (illesztett függvény: logisztikus)		
Függvény-paraméter	AUC (U)	End (rpv)
Rotenon koncentráció ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		
0	583,6 [580,9-607,0]	1,192 [1,185-1,266]
0,002	576,6 [573,4-577,1]	1,150 [1,140-1,660]
0,02	593,6 [585,4-594,3]	1,206 [1,199-1,216]
0,2	595,9 [591,2-597,7]	1,308 [1,226-1,339]*
2	623,2 [597,7-633,7]*	1,308 [1,226-1,339]*
20	619,9 [617,9-629,8]*	1,295 [1,292-1,325]*
200	654,9 [652, 9-665,9]*	1,464 [1,425-1,469]*
Trendanalízis (p érték)	$l < 0,01$	$l < 0,01$

Ezen túlmenően megvizsgáltuk a 15 perces rotenon előkezelés hatását a mitokondriális Ca^{2+} felvételre. Jurkat-sejtekhez 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM végkoncentrációjú rotenont adtunk, majd 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú fitohemagglutininnel aktiváltuk a sejteket ($n=3$ minden koncentrációban). Dózis-hatás összefüggést mutattunk ki a hozzáadott rotenon koncentrációja és a mitokondriális Ca^{2+} felvétel között (10. ábra). A rotenon előkezelés csökkentette a mitokondriális Ca^{2+} felvételt. A maximum érték esetében $p < 0,05$. A statisztikai összehasonlításhoz Hettmannsperger-Norton trendesztet használtunk (8. táblázat).



10. ábra: 15 perces rotenon előkezelés hatása a mitokondriális Ca^{2+} felvételre. Jurkat-sejteket 0 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM végkoncentrációjú rotenonnal, 15 percig előinkubáltunk majd 25 $\mu\text{g/ml}$ PHA-t adtunk a sejtekhez a mérés kezdetén.

8. táblázat: 15 perces rotenon előkezelés hatása a mitokondriális Ca^{2+} felvételre. Jurkat-sejteket 0 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM végkoncentrációjú rotenonnal 15 percig előinkubáltunk, majd 25 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációjú fitohemagglutinint (PHA) adtunk a sejtekhez a mérés kezdetén.

	kontroll	10 nM	100 nM	1 μM	10 μM	100 μM	p érték
Maximum érték [medián (min-max)]	[1,653 (1,563-1,861)]	[1,463 (1,330-1,515)]	[1,479 (1,416-1,480)]	[1,428 (1,387-1,452)]	[1,227 (1,189-1,302)]	[1,369 (1,242-1,446)]	< 0,05
Meredekség [medián (min-max)]	[0,008 (0,006-0,010)]	[0,008 (0,007-0,009)]	[0,004 (0,002-0,005)]	[0,005 (0,003-0,006)]	[0,005 (0,004-0,006)]	[0,004 (0,002-0,005)]	0,1

4.2. ÚJSZÜLÖTT ÉS FELNÖTT T-LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA

4.2.1. Kisebb mitokondriális tömeg újszülöttek T-sejtjeiben

A mitokondriumtömeg vizsgálatára CD4⁺ és CD8⁺ T-sejteket izoláltunk újszülöttek köldökzsinór és felnőtt kontrollok perifériás vénás véréből. A MitoTracker Green, potenciál-inszenzitív, mitokondrium specifikus fluoreszcens festék segítségével mértük ezen T-sejt alcsoportok mitokondriumtömegét. Az újszülött CD4⁺ T-limfocita

alcsoporthoz szignifikánsan alacsonyabb mitokondriumtömeget mértünk, a felnőttek azonos sejtcsoportjához képest. A CD8+ sejtek esetében hasonló irányú eltérést figyeltünk meg, bár a különbség nem érte el a szignifikancia határát (11. ábra A).

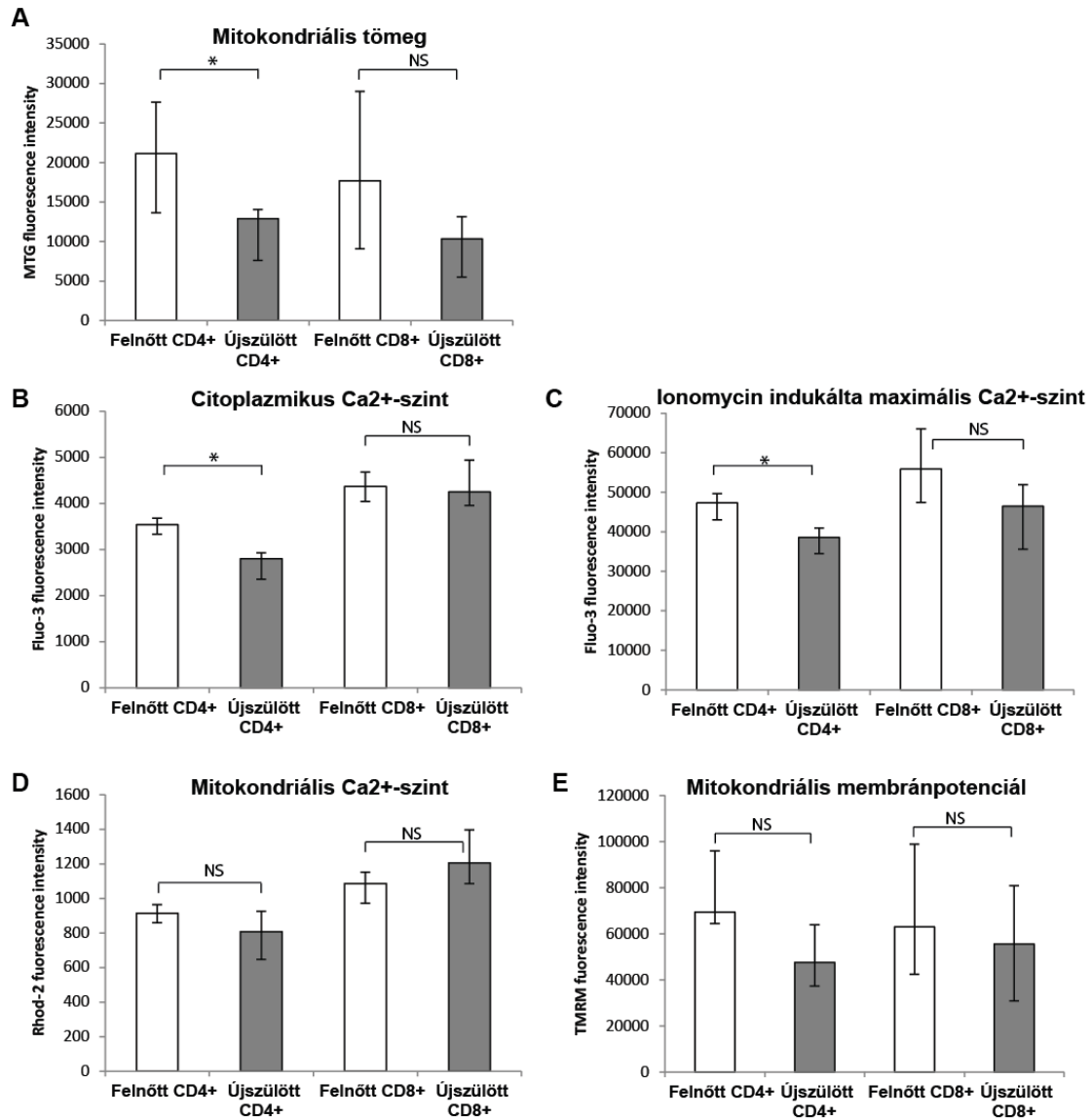
4.2.2. Nyugalmi $[Ca^{2+}]_c$, $[Ca^{2+}]_m$ és nyugalmi $\Delta\Psi_m$

4.2.2.1. Alacsonyabb $[Ca^{2+}]_c$ újszülött CD4+ T-sejtekben

A $[Ca^{2+}]_c$ összehasonlításához, nyugvó CD4+ és CD8+ sejteket Fluo-3-AM-mel, egy citoplazmatikus Ca^{2+} -ra specifikus fluoreszcens festékkel töltöttünk. A stimulálatlan újszülött CD4+ sejtek $[Ca^{2+}]_c$ alacsonyabb volt a felnőtt CD4+ sejtekhez képest, míg a két csoport CD8+ sejtjei között nem volt különbség (11. ábra B). Hasonlóan a nyugalmi $[Ca^{2+}]_c$ -hoz, az újszülöttek CD4+ sejtjeiben a maximális, farmakológiailag (ionomycin hozzáadásával) kiváltható Ca^{2+} -válasz is alacsonyabb volt a felnőttek azonos sejtcsoportjához képest (11. ábra C). Ezzel szemben a két csoport CD8+ T-sejtjeiben kiváltott Ca^{2+} -válasz nagysága azonos volt.

4.2.2.2. Hasonló $[Ca^{2+}]_m$ és $\Delta\Psi_m$ újszülött és felnőtt CD4+ és CD8+ T-sejtekben

Mivel a mitokondriumok fontos szerepet játszanak a $[Ca^{2+}]_c$ szabályozásában illetve a Ca^{2+} jelentősen befolyásolja a mitokondriumok működését, megvizsgáltuk a mitokondriális Ca^{2+} anyagcserét, valamint a mitokondriális membránpotenciált (a mitokondrium funkció egyik markere). Nyugalmi CD4+ és CD8+ T-sejtek Ca^{2+} szintjei azonosak voltak az újszülött és a felnőtt mintákban (11. ábra D). Hasonlóan, a nyugalmi $\Delta\Psi_m$ is azonos volt a vizsgált minták CD4+ és CD8+ sejtcsoportjaiban (11. ábra E).

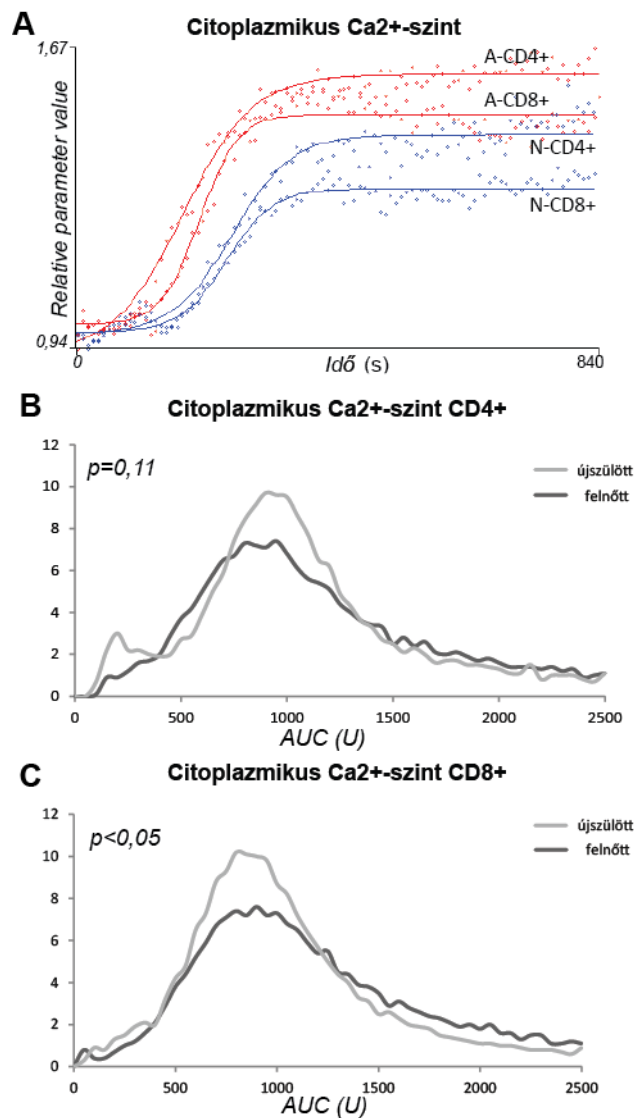


11. ábra: Nyugalmi állapotú újszülött (n=12) és felnőtt (n=11) CD4+ valamint CD8+ T-sejtek sejtélettani paramétereinek összehasonlítása. A mitokondriális tömeg vizsgálatára specifikus MitoTracker Green (MTG) medián fluoreszcens értékei (A); alapvonalis és ionomycin indukálta citoplazmatikus Ca²⁺-szint (Fluo-3 AM) (B és C); mitokondriális Ca²⁺ szint Rhod-2-vel mérve (D); mitokondriális membránpotenciál TMRM-mel mérve (E). Az adatok medián értékek, a hibásávok interkvartilist jeleznek. * p < 0,05

4.2.3. A fitohemagglutinin által kiváltott aktivációs válasz újszülött és felnőtt T-sejtekben

4.2.3.1. Csökkent citoplazmatikus Ca²⁺-jel CD8+ újszülött T-sejtekben

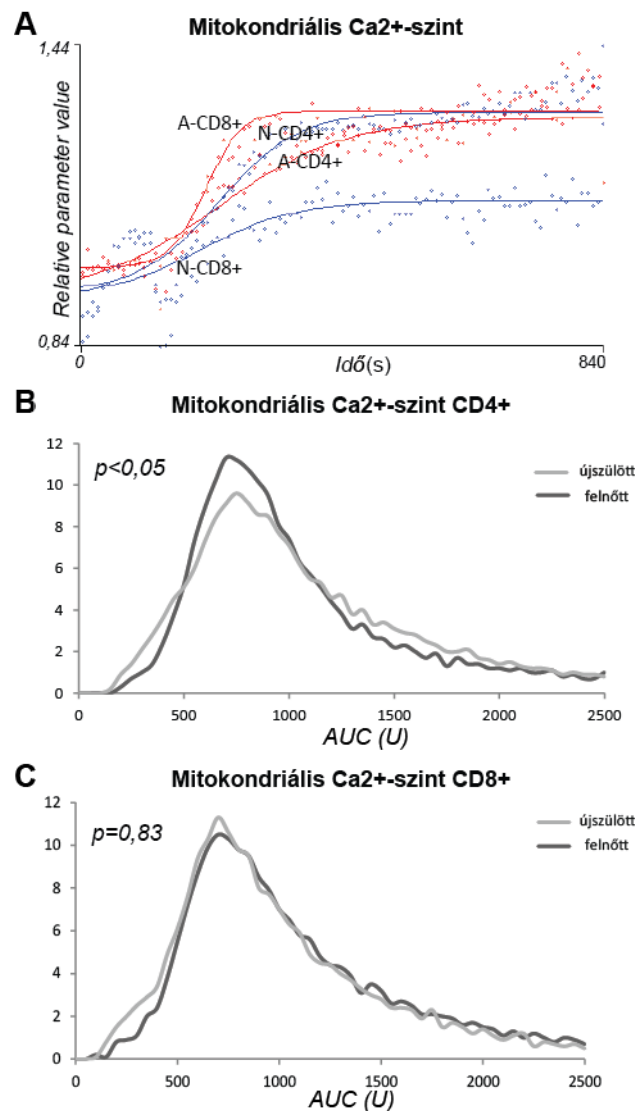
A nyugalmi $[Ca^{2+}]_c$ mérését követően PHA-val stimulált T-sejtekben vizsgáltuk a citoplazmatikus Ca^{2+} szintek kezdeti változását. A mérések adataira illesztett függvények AUC, Max vagy End és Slope paramétereit hasonlítottuk össze a két csoportban. A T-limfocita aktiváció kezdeti fázisának Ca^{2+} -jele az újszülöttek CD8+ T-sejtjeiben alacsonyabb volt a felnőtt CD8+ T-sejtekhez képest (az AUC és a Slope paraméterek esetében), míg az újszülött és felnőtt CD4+ sejtek esetében azonos mértékű volt (12. ábra és 9. táblázat).



12. ábra: A fitohemagglutinin indukálta kinetikus változások a $[Ca^{2+}]_c$ újszülött és felnőtt CD4+ és CD8+ T-sejtekben. A) Reprezentatív mérések medián-függvényei. A hisztogramok az újszülött és felnőtt mérésekre illesztett függvények görbe alatti területének (AUC) megoszlását mutatják a CD4+ (B) és a CD8+ (C) T-sejtek esetében. Rövidítések: A-CD4+ - felnőtt CD4+ T-sejt; A-CD8+ - felnőtt CD8+ T-sejt; N-CD4+ - újszülött CD4+ T-sejt, N-CD8+ - újszülött CD8+ T-sejt.

4.2.3.2. Fokozott mitokondriális Ca^{2+} felvétel újszülöttek CD4^+ T-sejtjeiben

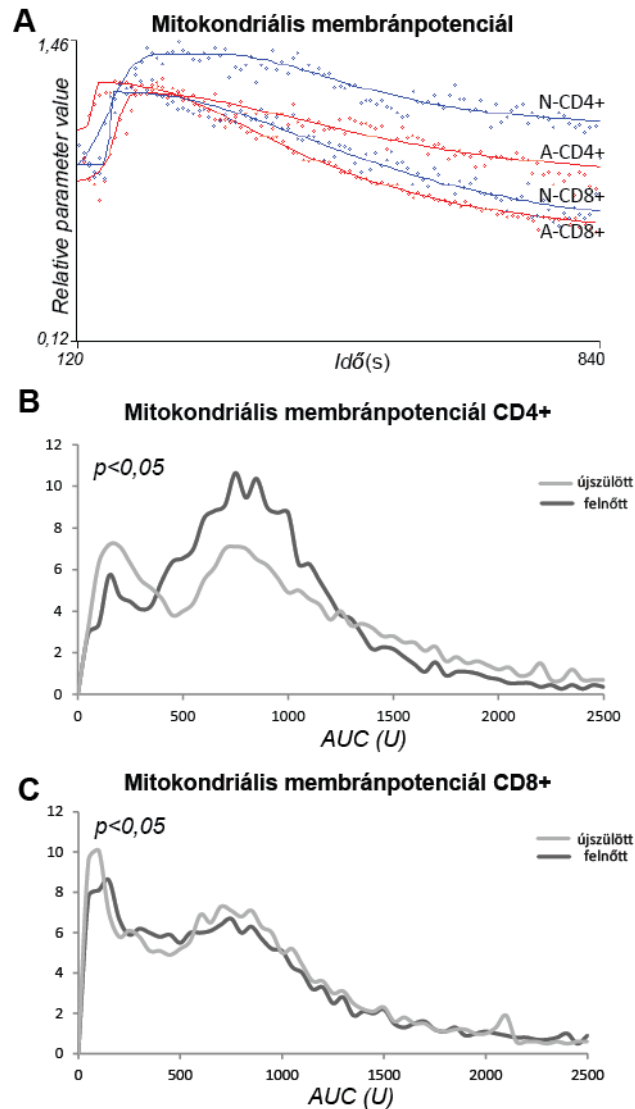
Újszülöttek T-sejtjeiben a PHA által kiváltott mitokondriális Ca^{2+} felvétel mértéke és kinetikája eltérő volt a felnőttek T-sejtjeihez képest (13. ábra A). Az újszülött CD4^+ T-sejtek mitokondriumai több (AUC, Slope és End paraméterek), míg a CD8^+ T-sejtek kevesebb (End paraméter) Ca^{2+} -ot szekvesztráltak az azonos felnőtt sejtcsoportokhoz képest (13. ábra B és C valamint 9. táblázat).



13. ábra: A fitohemagglutinin indukálta kinetikus változások a $[\text{Ca}^{2+}]_m$ -ban újszülött és felnőtt CD4^+ és CD8^+ T-sejtjeiben. A) Reprezentatív mérések mediánfüggvényei. A hisztogramok az újszülött és felnőtt mérésekre illesztett függvények görbe alatti területének (AUC) megoszlását mutatják a CD4^+ (B) és a CD8^+ (C) T-sejtek esetében. Rövidítések: A- CD4^+ - felnőtt CD4^+ T-sejt; A- CD8^+ - felnőtt CD8^+ T-sejt; N- CD4^+ - újszülött CD4^+ T-sejt, N- CD8^+ - újszülött CD8^+ T-sejt.

4.2.3.3. Nagyobb mértékű mitokondriális depolarizáció újszülött CD4+ T-sejtekben, míg csökkent mértékű újszülött CD8+ sejtekben

A nyugalmi $\Delta\Psi_m$ azonos volt a vizsgált minták CD4+ és CD8+ sejtcsoportjaiban. Azonban, hasonlóan a mitokondriális Ca^{2+} felvételhez, a PHA indukálta mitokondriális depolarizáció azonos irányba változott az újszülött T-sejtekben a felnőttekhez képest (14. ábra A): megnövekedett depolarizáció a CD4+ T-sejtekben (AUC és Max), illetve csökkent depolarizáció a CD8+ T-sejtekben (AUC, Slope és Max) (14. ábra B, C és 9. táblázat).

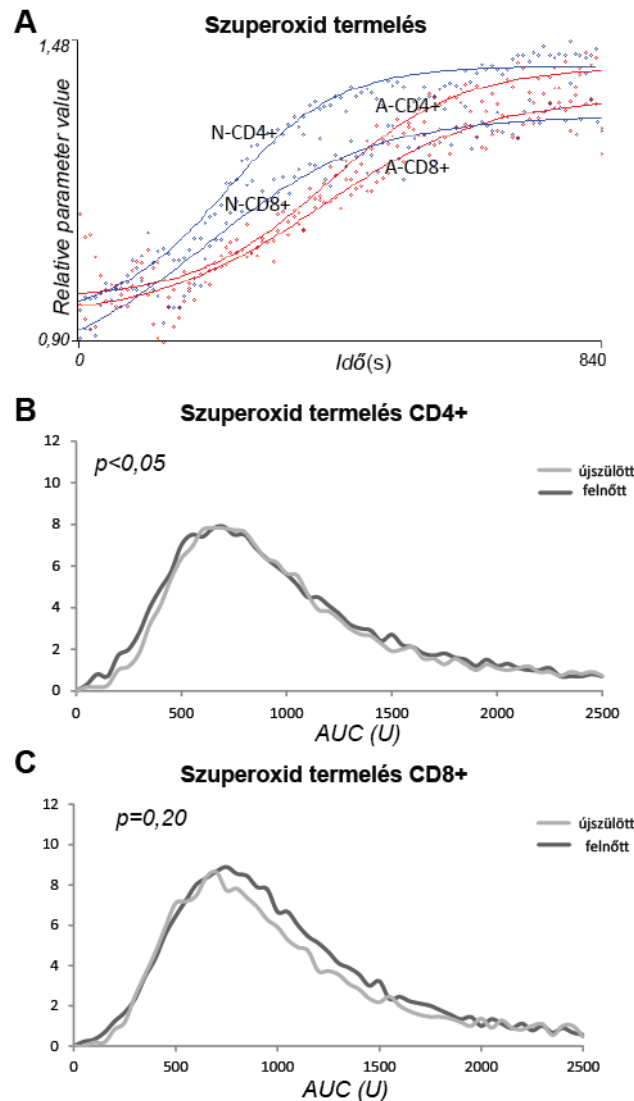


14. ábra: A fitohemagglutinin indukálta kinetikus változások a mitokondriális membránpotenciálban újszülött és felnőtt CD4+ és CD8+ T-sejtekben. A) Reprezentatív mérések medián-függvényei. A hisztogramok az újszülött és felnőtt mérésekre illesztett függvények görbe alatti területének (AUC) megoszlását mutatják a CD4+ (B) és a CD8+ (C) T-sejtek esetében. Rövidítések: A-CD4+ - felnőtt CD4+ T-sejt; A-CD8+ - felnőtt CD8+ T-sejt; N-CD4+ - újszülött CD4+ T-sejt, N-CD8+ - újszülött CD8+ T-sejt.

4.2.3.4. Fokozott O_2^- -termelés újszülöttek CD4+ T-sejtjeiben

A mitokondriumok által termelt szuperoxid fontos jelátviteli funkcióval bír a T-sejt aktivációban. A megváltozott mitokondriális Ca^{2+} felvétel, illetve mitokondriális

depolarizáció háttal lehet a szabadgyök-képződésre. A vizsgált minták CD4⁺ és CD8⁺ sejtjeit az O₂⁻ specifikus DHE fluoreszcens festékkel töltöttük és mértük a PHA indukálta szuperoxid képződést. Hasonlóan az újszülött CD4⁺ T-sejtekre jellemző emelkedett Ca²⁺ felvételre és a nagyobb mértékű depolarizációra, ezen sejtek több O₂⁻-ot termeltek (az AUC paraméter alapján) (15. ábra). Míg a CD8⁺ sejtek szuperoxid termelésében nem volt különbség (15. ábra valamint 9. táblázat).



15. ábra: A fitohemagglutinin indukálta kinetikus változások a szuperoxid termelésben újszülött és felnőtt CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtekben. A) Reprezentatív mérések medián-függvényei. A hisztogramok az újszülött és felnőtt mérésekre illesztett függvények görbe alatti területének (AUC) megoszlását mutatják a CD4⁺ (B) és a CD8⁺ (C) T-sejtek esetében. Rövidítések: A-CD4⁺ - felnőtt CD4⁺ T-sejt; A-CD8⁺ - felnőtt CD8⁺ T-sejt; N-CD4⁺ - újszülött CD4⁺ T-sejt, N-CD8⁺ - újszülött CD8⁺ T-sejt.

9. táblázat: A fitohemagglutinin hatása az újszülött és felnőtt CD4+ és CD8+ T-sejt alcsoportokra.

A számított függvényparaméterek: AUC—görbe alatti terület (U), Max—Maximum érték, relative parameter value (rpv), Slope—Meredekség az 50%-os értéknél, End—Végso érték. Az adatok medián [interkvartilis] formában kifejezve.

^a Újszülött köldökzsínor minták felnőtt mintákkal összehasonlítva (CD4+ T-sejtek), $p < 0.05$.

^b Újszülött köldökzsínor minták felnőtt mintákkal összehasonlítva (CD8+ T-sejtek), $p < 0.05$.

Függvényparaméter	T-sejt alcsoport			
	Felnőtt CD4+ (n=10)	Újszülött CD4+ (n=11)	Felnőtt CD8+ (n=10)	Újszülött CD8+ (n=11)
Citoplazmatikus Ca²⁺-szint [Ca²⁺]_c (CD4+- dupla logisztikus függvény; CD8+ logisztikus függvény)				
AUC	1193 [799-2263]	1059 [789-1760]	1155 [791-1881]	982 ^b [726-1445]
Slope	0,0046 [0,0016-0,0177]	0,0030 [0,0014-0,0136]	0,0022 [0,0010-0,0080]	0,0015 ^b [0,0006-0,0073]
Max or End	1,62 [1,06-3,26]	1,39 [1,02-2,53]	1,62 [1,16-2,58]	1,32 [0,96-2,01]
Mitokondriális Ca²⁺-szint [Ca²⁺]_m (logisztikus függvény)				
AUC	939 [691-1541]	989 ^a [693-1582]	960 [687-1497]	899 [645-1377]
Slope	0,0009 [0,0004-0,0041]	0,0018 ^a [0,0009-0,0043]	0,0008 [0,0004-0,0060]	0,0024 ^b [0,0007-0,0260]
End	1,37 [1,02-2,19]	1,46 ^a [0,94-2,43]	1,46 [1,04-2,11]	1,19 ^b [0,85-1,79]
Mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) (dupla logisztikus függvény)				
AUC	797 [518-1101]	880 ^a [465-1507]	773 [358-1415]	767 ^b [357-1270]
Slope	0,0245 [0,0029-0,2203]	0,0061 [0,0010-0,0255]	0,0326 [0,0037-0,1707]	0,0289 ^b [0,0036-0,1460]
Max	1,15 [0,78-1,53]	1,27 ^a [0,69-2,13]	1,13 [0,52-2,01]	1,10 ^b [0,60-1,77]
Szuperoxid keletkezés (O₂⁻) (logisztikus függvény)				
AUC	1001 [634-1909]	1058 ^a [676-2412]	955 [652-1474]	1008 [656-1960]
Slope	0,0010 [0,0006-0,0023]	0,0022 [0,0007-0,0082]	0,0008 [0,0005-0,0013]	0,0029 [0,0008-0,0175]
End	1,51 [0,99-2,89]	1,49 [0,96-3,68]	1,36 [0,94-2,06]	1,39 [0,89-2,94]

5. MEGBESZÉLÉS

A doktori képzésem keretében arra kerestem a választ kísérletes módszereket felhasználva, hogy a T-limfociták aktiválódásában milyen funkcionális eltérések tapasztalhatóak, amelyek hozzájárulhatnak az újszülöttek gyakoribb fertőzőes megbetegedéséhez. Munkám első szakaszában egy olyan áramlási citométeres módszer kifejlesztésén dolgoztam, amely lehetővé teszi a plazmamembrán-potenciál, a $[Ca^{2+}]_c$, a $\Delta\Psi_m$, a mitokondriális Ca^{2+} -anyagcsere és a szabadgyök-képződés vizsgálatát különböző sejtcsoportokon. A munkám második szakaszában a kifejlesztett módszer segítségével összehasonlítottam az újszülöttek és felnőttek CD4+ és CD8+ T-sejt szubpopulációiban a fenti paramétereket.

5.1. AZ ÁRAMLÁSI CITOMÉTERES VIZSGÁLATOK: MÓDSZERTANI MEGFONTOLÁSOK

5.1.1. Az áramlási citometria és a felhasználható fluoreszcens vegyületek

Az áramlási citométert a klinikai gyakorlatban és a kutatásban elsősorban sejtfelszíni markerek vizsgálatára, illetve egyes intracelluláris fehérjék azonosítására használják leggyakrabban (57). Emellett azonban lehetőség van FCM segítségével egyes sejtleletani folyamatok „real-time” jellemzésére is. Ennek lényege, hogy a specifikus fluoreszcens festékekkel kezelt sejtszuszpenzió sejtjei FCM segítségével szekvenciálisan mérhetők, a sejtek által kibocsátott fluoreszcens jelek rögzíthetők és a vizsgált paraméter(ek) változása jellemezhető az idő függvényében.

Bár a technika adott volt, ezek az eljárások eddig nem terjedtek el sem a kutatásban, sem a klinikai gyakorlatban, mivel nem állt rendelkezésre olyan algoritmus, ami alkalmas lett volna a mérési adatok objektív kiértékelésére. Nemrégiben munkacsoportunk kidolgozott egy olyan eljárást, amelynek segítségével az egyes mérések során kapott több millió mérési adat megoszlása és időbeli változása jellemezhető. Ez lehetővé teszi különböző intracelluláris folyamatok egyidejű, „real-time” monitorozását.

Az áramlási citometriás vizsgálatok lényege, hogy a vizsgálandó részecske egy mikroszkópikus méretű vízszugárban áthalad a gerjesztő fényforrás fénynyalábján, ennek során fényszórási jelek, valamint különböző hullámhosszú (a jelöléstől függően) fluoreszcens emissziós jelek keletkeznek. A jeleket erősítés, majd analóg-digitális konverzió után számítógép gyűjti és dolgozza fel. Így tehát a mérések során a teljes sejtet jellemző információt nyerünk. Egyes paraméterek esetében, mint pl. a $[Ca^{2+}]_c$ és a membránpotenciál ez előnyös tulajdonság. Azonban más folyamatok esetében, pl. $[Ca^{2+}]_m$, ahol az egyes mitokondriumok között lokalizációból, méretből, polarizáltságából eredően különbségek adódhatnak, az információ egy része elveszik. Az áramlási citométer a vizsgált sejtpopulációk statisztikus leírására ad lehetőséget. Ezért e folyamatok precíz, szubcelluláris szinten való vizsgálatára a fluoreszcens mikroszkópia javasolt.

Az FCM alkalmazása a sejtfelszíni, vagy intracelluláris antigének meghatározásában, a diagnosztikában és a kutatásban több évtizedes múltra tekint vissza (58). Az intracelluláris fluoreszcens jelforrás lehet intrinsic, vagy extrinsic fluoreszcenciájú molekula. A sejtekben intrinsic fluoreszcenciával rendelkező anyagok (pl. NADPH) a megfelelő hullámhosszúságú lézerrel való megvilágítás hatására jelet adnak. Specifikus festékanyagok alkalmazása, pl. ionophor festékek használata, lehetővé teszi egyébként autofluoreszcenciát nem mutató intracelluláris anyagok szintjének vizsgálatát. A 10. táblázat az általunk tesztelt, illetve méréseink során is alkalmazott fluoreszcens vegyületeket foglalja össze.

10. táblázat: Az intracelluláris folyamatok jellemzésére általunk használt festékek összességére.

NÉV	Excitációs max. (nm)	Emissiós max. (nm)	Gerjesztő hullámhossz (nm)	Alkalmazás
Kation mérők				
Fluo-3	506	526	488	Ca ²⁺ szint mérés
Fura Red	436	655	488	
Membránpotenciál mérők				
di-BA-C4-(3)	494	516	488	Membránpotenciál mérés
di-BA-C4-(5)	590	616	488	
Mitokondrium vizsgálata				
DiOC6(3)	484	501	488	Mitokondrium és plazma-membránpotenciál mérés
JC-1	520	530, 590	488	Mitokondriális membránpotenciál mérés
TMRM	543	567	488	
Rhod-2, AM	552	581	488	Mitokondriális Ca ²⁺ mérés
MitoTracker Green	490	513	488	Mitokondriumtömeg
MitoTracker Deep Red	644	665	633	
ROS mérők				
DAF-FM diacetát	495	515	488	NO mérés
DHE	518	605	488	Oxidatív metabolizmus, O ₂ ⁻ mérés
Dihidrorodamine 123	507	529	488	

5.1.2. A Jurkat-sejtek

A kísérleti módszer beállítása során human leukémiás eredetű Jurkat T-sejteket használtunk. Ez egy immortalizált, CD4+ sejtvonal, mely széles körben használt például

a T-sejt jelátviteli folyamatok vizsgálatára és modellrendszerül szolgál akut T-sejtes leukémia tanulmányozásához is (59). Ideális modellsejtnak tűnt stabilitása, PHA-ra való érzékenysége miatt. A TCR-signalingról szerzett ismereteink nagy része, a PHA indukálta kalcium-jel leírása e sejtvonal vizsgálatán alapul. Az általunk is vizsgált, PHA indukálta sejtelettani változások reprodukálhatósága miatt szerencsés választásnak bizonyult.

5.1.3. A $[Ca^{2+}]_c$ és a membránpotenciál

A PHA okozta T-limfocita aktiváció korai szakaszára jellemző kalcium-influx FCM-vizsgálatára az 1990-es évek elején dolgoztak ki egy módszert (54). Az ebben a módszerben felhasznált Fluo3-AM és Fura Red-AM a $[Ca^{2+}]_c$ változásait képesek követni (a Fluo3-AM Ca^{2+} -hoz kötődése következtében növekszik, míg a Fura Red-AM esetében csökken a kibocsátott fluoreszcens intenzitás). A két molekula által kibocsátott jel hányadosa megfeleltethető a $[Ca^{2+}]_c$ -nak. A kidolgozott módszerben a Fura Red-AM-et nem alkalmaztuk, hanem felcseréltük a membránpotenciál mérésére alkalmas di-BA-C4-(5)-re. Így a kalcium-jel elemzése fejlesztésünknek köszönhetően együttesen végezhető a membránpotenciál méréssel. A módszerünk érzékenységét mutatja, hogy az általunk használt legalacsonyabb PHA koncentráció (2,5 $\mu\text{g/ml}$) okozta $[Ca^{2+}]_c$ – emelkedést is kimutatta (általánosan ilyen jellegű publikált kísérletekben 2-10-szer magasabb PHA koncentrációt használtak). A PHA magasabb koncentrációban való hozzáadása egyértelműen növelte a Ca^{2+} -jel nagyságát és gyorsaságát. A görbe alatti terület (AUC) és a maximum érték (Max) lineáris, míg a meredekség (Slope) négyzetes emelkedést mutatott (8. ábra A és 6. táblázat).

A membránpotenciál meghatározása során az aranystandard a patch-clamp technika, ami nemcsak a potenciálkülönbség mérésére, hanem ionáramok, ioncsatornák, ezen keresztül pedig farmakológiai vegyületek hatásainak vizsgálatára is alkalmas (60). A módszer korlátai közé tartozik, hogy egyszerre csak egyetlen sejten lehet mérést végezni, nagyszámú, különböző sejtípusokat tartalmazó sejtcsoportok vizsgálata vele nem lehetséges. Előnye azonban, hogy segítségével meghatározható a membránpotenciál szabályozásában résztvevő egyes ioncsatornák szelektív működése.

A T-limfocitákban a PHA okozta depolarizációt már az 1960-as évek végén vizsgálták áramlási citométerrel (32), mára már fejlesztettek olyan módszert áramlási citométerre, ami lehetőséget ad kvantitatív vizsgálatokra (29). Az általunk használt fluoreszcens molekulák (di-BA-C4-(3) és di-BA-C4-(5)) előnyei, hogy nem citotoxikusak, nem blokkolják az ioncsatornákat és a glikoprotein efflux pumpák nem pumpálják ki a sejtből.

A $[Ca^{2+}]_c$ -val párhuzamosan mért membránpotenciál-változásokhoz használt di-BA-C4-(5) fluoreszcens intenzitás változása az 5 $\mu\text{g/ml}$ -es PHA koncentrációnál haladta meg a statisztikai szingifikancia szintjét. A plazmamembrán depolarizációjának következtében a negatív töltésű fluoreszcens molekulák nagyobb mértékben akkumulálódnak a citoplazmában, ami az egyes sejtekre lebontva nettó jelintenzitás-növekedéshez vezet (8. ábra C). Az illetett logisztikus függvény görbe alatti területe (AUC) négyzetes, míg a végső érték (End) lineáris dózis-hatás összefüggést mutatott a PHA-koncentrációval (9. táblázat).

A T-sejtek aktivációs válasza során, azonnali $[Ca^{2+}]_c$ növekedés, majd a csúcs elérése után csökkenés figyelhető meg. A legfontosabb mechanizmusok, melyek hozzájárulnak e folyamathoz 1) az ER Ca^{2+} raktáraiból való Ca^{2+} felszabadulás, 2) a CRAC csatorna kinyitása, 3) a Kv1.3 és IKCa1 K^+ csatornák nyitása és 4) a különböző Ca^{2+} eltávolító mechanizmusok (pl. plazmamembrán Ca^{2+} -ATPáz, szarko-endoplazmás retikulum ATPáz) (25). Módszerünk segítségével lehetőség van egyes ionáramokat befolyásoló vegyületek (csatornagátló szerek, receptor blokkolók) membránpotenciál-változás, illetve kalcium-jelmoduláló hatásainak együttes vizsgálatára sejtpopulációs szinten. Az áramlási citométer további előnye, hogy a vizsgálatok heterogén sejtkeverékben történnek, így ugyanannak a hatásnak kitett és egymással potenciálisan interakcióba lépő sejtcsoportok egyidejű vizsgálata is lehetővé válik. Ennek köszönhetően akár a T-limfocita szubpopulációk aktivációs karakterisztikái közötti különbségek jellemzésére is mód nyílik. Ezt a lehetőséget egyidejűleg, egy másik kutatási téma során mi magunk is kihasználtuk. (Diabeteses betegek $CD4^+$ és $CD8^+$ sejtjein a PHA indukálta kalcium-influx karakterisztika eltért az egészséges kontroll személyektől nyert sejtekhez képest).

5.1.4. Mitokondriális kalcium-anyagcsere

A mitokondriumok kalciumháztartásának vizsgálatára több módszert is kifejlesztettek, így fluoreszcens kalciumszenzitív fehérjéken (aequorinok) (61, 62), valamint kalciumszenzitív fluoreszcens származékok alkalmazásán alapuló technikákat (63, 64). Intakt sejtben a pozitív töltésű, mitokondriumban dúsuló, Ca^{2+} érzékeny fluoreszcens festékekkel, Rhod2/AM-mel mértük a $[\text{Ca}^{2+}]_m$ -t (65). Ez a fluoreszcens festék alkalmas a $[\text{Ca}^{2+}]_m$ relatív szelektív mérésére, hiszen nagyrészt a mitokondriumban dúsul, pH érzékenysége minimális és 500-1000 nM körüli K_d értékének köszönhetően a 0,1-10 μM -os $[\text{Ca}^{2+}]$ tartományban fluoreszcenciája arányos a $[\text{Ca}^{2+}]$ -val (66).

A PHA kiváltotta kalcium-influx a mitokondriumok Ca^{2+} felvételét fokozza T-limfocitákban (67). A Rhod2/AM-et már korábban is használták mitokondriumok szerepének vizsgálatára T-sejtek kalcium-anyagcseréjével összefüggésben (50). Fluoreszcens mikroszkóp segítségével Jurkat-sejteket valamint human T-sejteket felhasználva kimutatták a mitokondriumok Ca^{2+} pufferelő hatását a citoplazmatikus kalcium-jel alatt (68). Az általunk használt módszerrel más sejtek mitokondriális kalcium jeléhez hasonló kinetikájú mitokondriális kalciumjelet mértünk (69-71). A kísérlet során továbbá megfigyelhető volt az is, hogy a nagyobb koncentrációjú PHA hatására a $[\text{Ca}^{2+}]_m$ maximuma valamelyest késésben van a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ maximumához képest (8. ábra B). Rotenon előkezelés hatására csökkent a mitokondriumok Ca^{2+} felvétele. Ez rávilágít a mitokondriális Ca^{2+} felvétel potenciálfüggő szabályozására. A rotenon depolarizálta a mitokondriumokat, melynek következtében a MCU nyitási valószínűsége lecsökkent, s ez a Ca^{2+} csökkent beáramlását eredményezte.

A mitokondriumok mikromoláris koncentrációban tartalmaznak Ca^{2+} -ot, azonban ennek nagy része komplexet képez foszfáttal és ATP-vel, vagy mátrix proteinekhez kötődik. Így nyugalmi körülmények között a szabad $[\text{Ca}^{2+}]_m$ összemérhető a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -val (~0,1 μM). A mitokondriumokban tárolt Ca^{2+} mennyisége azonban viszonylag kevés az ER-ban tárolt, illetve aktiváció során az extracelluláris térből beáramló Ca^{2+} -hoz képest. Így bármely változás a mitokondriális Ca^{2+} raktárakban sejtaktiváció során gyorsan érzékelhetővé válik. A folyamat gyorsaságát elősegíti a mitokondriumok áthelyeződése az immunológiai szinapszis közelébe (39). Ennek a mitokondriális transzlokációnak további fontos szerepe, hogy késlelteti a CRAC/Orai1 csatornák inaktiválódását (47).

Következésképpen befolyásolja a kalcium-dependens transzkripciós faktorok (pl. NFAT) aktiválódását.

5.1.5. Mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$)

A $\Delta\Psi_m$ mérésére használt vegyületek karakterisztikája és biofizikai jellemzői alapvetően különböznek, alkalmazásuk nagymértékben függ az adott kísérleti rendszertől (72). A méréseink során ezért több vegyületet is kipróbáltunk kísérleti rendszerünk beállításához. Kiderült, hogy a mitokondriális membránpotenciál vizsgálatára ezek közül a TMRM (73) a leginkább megfelelő. A TMRM előnyei: a mérés során csak egy emissziós maximuma van (míg a JC1-nek kettő), így kombinálható egyéb fluoreszcens indikátorokkal, mikromoláris koncentrációban is alkalmazható (szemben a DiOC₆-vel) és kevésbé citotoxikus (szemben a Rhodamin123-mal). Hátránya, hogy áramlási citométeren kvalitatív méréseket nem lehet vele végezni, pontos feszültségérték meghatározására alkalmatlan.

A PHA által kiváltott kalcium-influx a mitokondriumok Ca²⁺ felvételét fokozza T-limfocitákban. Ennek rövidtávon mitokondriális membránpolarizáció a következménye, később azonban a T-limfocita mitokondriumok hiperpolarizációja figyelhető meg (50).

5.1.6. Szabadgyökök

Az intracelluláris szabadgyök-képződés mérésére is léteznek fluoreszcens technikák (74). A H₂O₂ termelés meghatározására legelterjedtebben használt vegyület a diklorodihidro-fluorescein (DCFH) (75). Ezt a fluoreszcens mikroszkópiában és az áramlási citometriában egyaránt alkalmazzák. Az intracelluláris O₂⁻ képződésének mérésre a klinikumban az nitroblue-tetrazolium redukcióján alapuló eljárást használják, míg a kutatásban a DHE terjedt el (53, 76). A DHE az O₂⁻-dal reagálva etídiummá (E⁺) alakul és a DNS-hez kötődve 605 nm körüli hullámhosszú fényt emittál (77). Meg kell azonban jegyezni, hogy a legújabb eredmények alapján a HPLC alapú 2-OH-E⁺ detektálása precízebb mérést tesz lehetővé (78). A molekula kvantitatív mérésre

azonban két ok miatt nem alkalmazható: egyrészt nagyon gyors a $O_2^- > H_2O_2$ átalakulás, másrészt egyéb molekulák is reagálhatnak a DHE-vel (79). Kifejezetten a mitokondriális O_2^- termelés vizsgálatára fejlesztették ki a MitoSOX Red-et, ami tulajdonképpen a DHE egy származéka. A foszfonium csoport negatív töltése révén a MitoSOX Red szelektív mitokondriális dúsulását eredményezi a mitokondriális membránpotenciál függvényében. Itt oxidációt követően a mitokondriális DNS-hez kötődik és gerjesztés hatására fluoreszcens fényt emittál (80).

Kimutatták, hogy a TCR stimulálása azonnali ROS termeléshez vezet eger T-sejt blastokban, valamint (52), hogy human T-limfociták aktivációja során az O_2^- képződés Ca^{2+} -függő (53). Ez az azonnali ROS képződés azonban a NADPH-oxidáztól független folyamat. A növekvő koncentrációjú PHA nem váltott ki azonnali fokozott mértékű O_2^- képződést Jurkat T-sejtekben (ez nem zárja ki, hogy hosszabb távon nem fokozódik a O_2^- termelés, ahogy azt korábban is kimutatták (50)). Ennek magyarázata lehet, hogy a PHA okozta Ca^{2+} -jel nem elégséges a ROS-termelés fokozásához (81).

Hogy a módszert validáljuk, egy általánosan használt mitokondriális I-es komplex inhibitor, rotenont használtunk. Jól ismert a rotenon szabadgyök-képző hatása. A kísérlet során megfigyeltük a rotenon azonnali hatását a O_2^- képződésre. Áramlási citométeres kísérleti rendszerünk segítségével dózis-hatás összefüggést tudtunk kimutatni a hozzáadott rotenon koncentrációja és a szabadgyök-képződés között (7. táblázat). A folyamat kinetikáját a logisztikus függvény jellemezte legjobban, a csúcserték azonban a 12 perces mérési tartományunkon kívül esett. Ami jelzi, hogy a rotenon szabadgyök-képző hatását a sejt nem tudja antioxidánsokkal kompenzálni. Ez is hozzájárul ahhoz, hogy a rotenon kezelés apoptózishoz vezet.

5.2. A LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÚJSZÜLÖTT- ÉS FELNŐTTKORBAN

5.2.1. A vizsgált paraméterek klinikai jelentősége

A kidolgozott áramlási citometriás technika kutatási célra (pl. a vegyületek immunmoduláns hatására), illetve diagnosztikus vizsgálatokra (pl. különböző betegségekben a limfocitaaktiváció változásának a jellemzésére) használható, mivel a

kiválasztott analitok mindegyike jelentős szerepet játszik a sejtek fiziológiai és patológiai folyamataiban.

5.2.1.1. Intracelluláris Ca^{2+} és membránpotenciál

A T-limfocitákban másodlagos hírvivőként, egyes enzimek kofaktoraként is szereplő Ca^{2+} ion citoplazmatikus szintjének változása kiemelt jelentőségű az aktivációban (24). Az APC-k feldolgozott antigénekkal töltött MHC fehérjéi a T-sejteken található TCR/CD3 komplexhez kötődnek. A bemutatott antigén és a TCR/CD3 komplex közötti specifikus kölcsönhatás számos sejtmembránon keresztüli jelátviteli útvonalat hoz működésbe. PLC- γ egy membránban elhelyezkedő foszfolipidet, a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot hasítja, melyből DAG és IP3 keletkezik. Az IP3 az intracelluláris tér szabad Ca^{2+} ion koncentrációjának kétfázisú növekedéséhez járul hozzá. Az IP3 az ER-on található receptorához kötődve Ca^{2+} -ot szabadít fel e kompartment Ca^{2+} raktáraiból. A Ca^{2+} szint emelkedés második, fenntartott fázisa az extracelluláris térből belépő Ca^{2+} ionok következtében jön létre. Ez az ún. CRAC-en keresztül történik. A CRAC-et a sejten belüli Ca^{2+} raktárak kiürülése nyitja, így az ún. „store-operated” csatornák közé tartozik.

Az újszülöttek köldökzsínór mintáin végzett méréseink, hasonlóan egy korábbi vizsgálatunkhoz (82), arra mutatott rá, hogy CD8⁺ T-sejtek kalcium-jelének nagysága elmarad a felnőtt kontrollokhoz képest. A globálisan vett CD4⁺ T-limfocita populációban nem volt különbség az újszülött és felnőtt csoport között. Azonban korábban már kimutattuk, hogy a helper T-sejt alcsoportok eltérő kinetikát mutatnak (83). Hasonló eredményre jutottak a köldökzsínór naive CD4⁺ T-sejtjei esetében is. A TCR-keresztükötése specifikus antitest (OKT3) hatására csökkent $[\text{Ca}^{2+}]_c$ detektáltak áramlási citométerrel (84). Habár ugyanezen csoport egy későbbi vizsgálat során, ezzel ellentétes megállapítást tett; naive köldökzsínór T-sejtekben emelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_c$ mértek aktiváció hatására (ugyancsak anti-CD3 antitesttel való keresztükötés) (85). Ezen tanulmány a mikroRNS miR-181a-t teszi felelőssé az fokozott citoplazmatikus kalcium-beáramlásért.

Kutatócsoportunk megvizsgálta a membránpotenciál szabályozásában, így indirekt a kalcium-jel kialakításában is résztvevő K^+ csatornák funkcionális működését újszülött, illetve felnőtt korban (82). Az eredmények arra utalnak, hogy a tanulmányozott T-sejt altcsoportokban (Th1, Th2, CD4+, CD8+) a K^+ csatornák funkcionálisan éretlenek és ennek hatására csökken ezen sejtek Ca^{2+} felvétele.

A kalcium mérés potenciális diagnosztikus értékét az adja, hogy a Ca^{2+} szignál normálistól való eltérését, stimulált T-limfocitákban számos veleszületett és szerzett immunbetegségben bizonyították (24). Különböző vizsgálatok keretében korábban, különböző betegpopulációkon mi is számos eltérésre rávilágítottunk, illetve a Ca^{2+} szignál modulációját, a különböző terápiás kezelések hatását kutatócsoportunk is tesztelte. [1) Egészséges várandós nőkben a limfociták kalcium-jelének kinetikája és a kálium csatornák gátlószereire való érzékenysége specifikus mintázattal bír, amely hiányzik preeclampsziában. 2) Sclerosis multiplexben (SM) elérhető a CD8+ T-limfociták szelektív immunmodulációja a Kv1.3 csatornák gátlásával. SM-ben az IFN β kezelés elsősorban a Th1 sejt típus kalcium-beáramlási kinetikájában létrejövő kompenzatorikus változásokkal és e sejtek kálium csatornáinak működésével áll összefüggésben. 3) A Kv1.3 csatornák gátlásával befolyásolható a limfocita aktiváció 1-es típusú diabetesben, ahol a T-sejtek fokozott reaktivitását találtuk. 4) Bechterew-kórban infliximab (IFX) terápia hatására a citoplazmatikus Ca^{2+} -jel kialakulása lassabb volt. 5) Frissen diagnosztizált reumatoid arthritiszes betegek CD4+ sejtjeiben a PHA indukálta Ca^{2+} -jel megegyezik az egészséges kontrollokéval, azonban 4 hét glükokortikoid terápia hatására jelentős csökkenés figyelhető meg. A terápia metotrexáttal (MTX) való kiegészítése viszont a Ca^{2+} -jel normalizálódásához vezet.]

5.2.1.2. Mitokondriumok

Az újszülöttek T-sejtjeinek citoplazmatikus Ca^{2+} -jelében megfigyelt változásokat követően a mitokondriumok szerepét kezdtük vizsgálni a rövidtávú T-sejt aktivációban. Ennek oka, hogy a mitokondriumoknak fontos szerepe van a T-sejt aktivációban és az intracelluláris Ca^{2+} anyagcserében (38, 39, 47). A Ca^{2+} ionnak nemcsak a citoplazmatikus folyamatok szabályozásában, hanem a mitokondriális működés befolyásolásában is fontos szerepe van. Ezek között említhetjük a sejt anyagcsere

folyamatait és az apoptózist. A sejt anyagcseréje során a glükóz katabolizmusának két része kötődik a mitokondriumhoz; a Szentgyörgyi-Krebs ciklus a mátrixban, a terminális oxidáció a belső membránhoz kötődő enzimek részvételével zajlik. A Szentgyörgyi-Krebs ciklusban szereplő enzimek közül a piruvát-, α -ketoglutarát- és az izocitrát-dehidrogenáz enzimek szabályozásában van jelentősége a Ca^{2+} ionnak (48). A Ca^{2+} ezen enzimek aktivitását fokozza, vagyis az ATP szintézis pozitív regulátorának tekinthető, mivel az előbb említett dehidrogenázokról kerülnek az elektronok az elektron-transzportláncba.

A citoplazmatikus és az intramitokondriális Ca^{2+} szint változás a sejt apoptotikus elhalása során is megfigyelhető. Túl nagyfokú mitokondriális kalciumbeáramlás esetén a mitokondrium szétesik, ami apoptózishoz vezethet (86).

Szignifikánsan alacsonyabb mitokondriumtömeget mértünk újszülöttek CD4^+ T-sejtjeiben és hasonló tendencia volt megfigyelhető a CD8^+ sejtek esetében is. Egy korábbi vizsgálat is rámutatott már arra, hogy a CD8^+ memória T-sejtek több mitokondriumot tartalmaznak a naive CD8^+ T-sejtekhez képest (a CD4^+ T-sejtek esetében erre még nincsenek adatok) (87). Az újszülöttek T-sejtjei között magasabb a naiv T-sejtek aránya a felnőttekhez képest (~90% és 55%). Habár mi nem különítettük el a naiv és memória T-sejteket, a naiv sejtek magas aránya hozzájárulhat az alacsonyabb mitokondriumtömeghez.

A mitokondriumtömegnek fontos szerepe van T-sejtek Ca^{2+} anyagcseréjében. A mitokondriumok nem csak pufferelik a citoplazmatikus Ca^{2+} -ot, de Ca^{2+} csatornamoduláló hatásuk is van (47). A mitokondriális Ca^{2+} felvétel csökkenti a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ csúcsát és késlelteti a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ alapvonalis értékhez való visszatérését. Ebben a tekintetben jelentős különbséget figyeltünk meg az újszülött és felnőtt CD4^+ , CD8^+ T-sejtek között. A CD4^+ T-sejtek alacsonyabb mitokondriális tömegének ellenére több Ca^{2+} szekvesztráltak, míg a CD8^+ T-sejtek kevesebbet a felnőtt kontrollokhoz képest. Ezen eredmények jól magyarázzák a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ esetében leírt folyamatokat. További vizsgálatok szükségesek azonban e folyamatok részletes felderítésére. A mitokondriumok sejten belüli elhelyezkedése, aktiváció hatására történő transzlokációja, csatorna-expressziós mintázata hozzájárulhat az általunk leírt változásokhoz. Ennek nagy jelentősége lehet az immunmodulációban, mivel a csökkent $[\text{Ca}^{2+}]_c$ felelős a NFAT-hez kapcsolt génexpresszióért.

A PHA indukálta mitokondriális Ca^{2+} felvétel a mitokondriumok depolarizációjához (a $\Delta\Psi_m$ csökkenéséhez) vezet (49). Újszülött CD4^+ T-sejtekben a fokozott mitokondriális Ca^{2+} felvételhez társulóan a depolarizáció is nagyobb mértékű volt. Másrészt a CD8^+ T-sejtek mitokondriális depolarizációja alacsonyabb volt a felnőttekéhez képest, mely a csökkent Ca^{2+} felvétellel magyarázható.

A T-sejt mitokondriumok szerepét több különböző kórképben, a legrészletesebben a szisztémás lupus erythematosusban (SLE), vizsgálták (88). Az SLE egy krónikus, gyulladásszerű autoimmun betegség, melynek főbb jellemzői a T- és B-sejt diszfunkció és sejtmag ellenes antitestek. SLE-ben a T-sejtek nagyobb mitokondriumtömeget, hiperpolarizált mitokondriummal, magasabb $[\text{Ca}^{2+}]_c$ és $[\text{Ca}^{2+}]_m$ -val rendelkeznek az egészséges kontrollokhoz képest. A nitrogén-monoxid (NO), mint a mitokondriális légzés és biogenezis szabályozója, szerepet játszhat a betegség patogenezisében.

[Egy másik autoimmun betegségben, Bechterew-kórban, mi is megfigyeltük a mitokondriumok megváltozott működését. Aktiváció hatására a CD8^+ T-sejtek Ca^{2+} felvétele lassabb volt. Emellett mind a CD4^+ mind pedig a CD8^+ T-sejtek fokozott NO termeléssel reagáltak PHA-aktivációt követően egészséges kontrollokhoz képest.]

5.2.1.3. Szabadgyökök

A TCR stimuláció hatására bekövetkező korai ROS-termelés három szakaszra bontható. Az első, a TCR-stimulálást követő 2. perc körül kezdődik és a 4. percig tart. Erre a szakaszra jellemző, hogy DPI-vel (difenilén iodonium; falvin-függő oxigenáz gátló) nem gátolható és Fas valamint NADPH-oxidáz független mechanizmus révén hidrogénperoxid keletkezik. A második szakaszban termelt H_2O_2 NADPH-oxidáz függő, DPI-vel gátolható és FasL-Fas függő. A harmadik fázisban, az aktivációt követő 8-10. perc körül, a O_2^- képződés DPI-szenzitív, FasL-Fas függő, azonban NADPH-oxidáztól független (52).

T-sejt aktiváció során megfigyelték a ROS részben Ca^{2+} -függő képződését (53). A mitokondriális Ca^{2+} felvétel fokozza a ROS-képződést. A keletkezett szabadgyökök serkentik az oxidációfüggő NF- κ B és AP-1 transzkripciós faktorok expresszióját (40). Genetikailag módosított egérben ($\text{Uqc}rfs^{-/-}$) a T-sejtek mitokondriális ROS-termelése

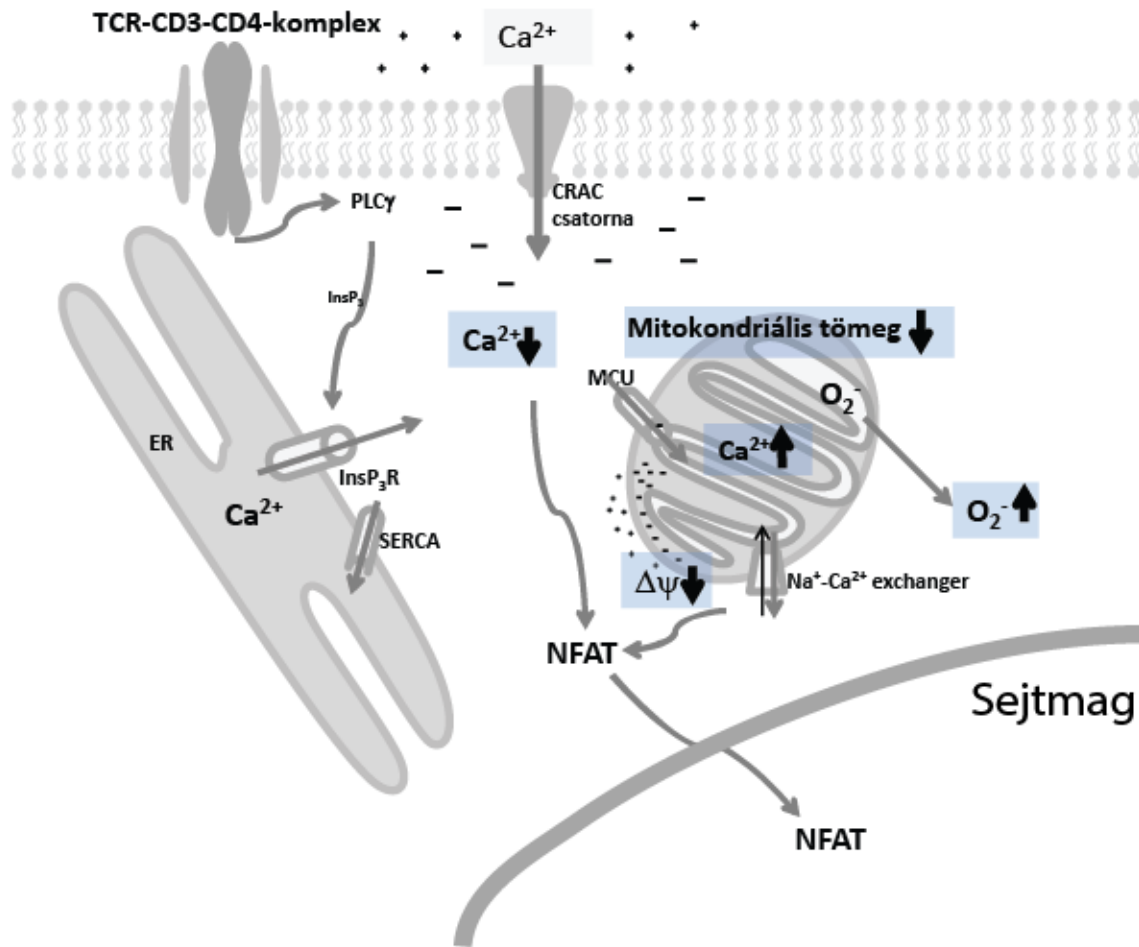
csökkent (35). Ezen egérmodell T-sejtjeiben kimutatták, hogy a mitokondriális ROS-termelés szükséges az NFAT aktiválásához és a következményes IL-2 termeléshez.

A csökkent mitokondriumtömeg ellenére az újszülött CD4⁺ T-sejtekben, fokozott ROS-termelést figyeltünk meg (15. ábra). Mindez a mitokondriumok ROS-termelésének megváltozott szabályozására utal a köldökzsinór CD4⁺ T-sejtjeiben, illetve ezen sejtek elégtelen intracelluláris antioxidáns kapacitása is szerepet játszhat. Továbbá, korábban kimutatták, hogy újszülöttek T-sejt aktiválását követő 15. és 75. perc között fokozott a ROS-képződés (ebben a kísérletben ionomycin + forbol-dibutirátot használtak az aktiváláshoz) (89). Ezzel szemben, anti-CD3 és anti-CD28 antitestekkel történő aktiválás csökkent ROS-képződéshez vezetett ugyanebben a tanulmányban. Mi azt gondoljuk, hogy a fokozott kezdeti ROS-képződés is hozzájárul az újszülött T-sejtek megváltozott aktivációs tulajdonságaihoz.

A reumatoid arthritises (RA) betegeken végzett tanulmányunk során is vizsgáltuk a T-sejtek szabadgyök termelését. Míg a kezelést nem kapott betegek ROS termelése hasonló kinetikát mutatott az egészséges kontrollokhöz képest PHA-aktivációt követően, addig mind a 4 ill. 8 hetes glükokortikoid mind pedig a 4 hetes anti-TNF- α kezelés (adalimumab, etanercept, infliximab) jelentősen csökkentette a ROS képződést. Ezzel szemben nem figyeltünk meg változást a Bechterew-kórban szenvedő betegek ROS termelésében az infliximab-terápia 2. és 6. hetében.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az áramlási citométerek egyik nagy előnye a „single-cell” technikákkal szemben, hogy lehetővé teszik több különböző, nagyszámú sejtet tartalmazó sejtcsoport egyidejű vizsgálatát. A disszertáció módszertannal kapcsolatban végzett kísérletei igazolják, hogy az általunk kifejlesztett mérési eljárás alkalmas az eddigi is alkalmazott $[Ca^{2+}]_c$ vizsgálata (Flou-3 AM) mellett a mitokondriális Ca^{2+} -anyagcsere (Rhod2/AM), a plazmamembrán potenciál (di-BA-C4-(5)), a mitokondriális potenciál (TMRM) és a szabadgyökök (DHE) képződésének vizsgálatára.
2. A módszer beállítására modellrendszerként Jurkat-sejteket használtunk, melyben leírtuk a PHA okozta limfocita aktiváció korai szakaszában bekövetkező változások kinetikáját a fenti paraméterekben.
3. A O_2^- képződés további vizsgálatára rotenont, egy jól ismert mitokondriális I-es komplex inhibitor is felhasználtunk, amely dóziszfüggő növekedést okozott a mitokondriális O_2^- képződésben.
4. A módszert felhasználva vizsgáltuk, hogy vajon e sejtélettani folyamatokban van-e különbség az újszülöttek és a felnőttek $CD4^+$ valamint $CD8^+$ sejtcsoportjai között. Ennek hátterében az újszülöttek adaptív immunválaszára jellemző éretlenség, ennek következtében pedig a fertőzéseknek való kitettség áll. A kisebb mértékű citoplazmatikus Ca^{2+} -jel mellett alacsonyabb mitokondriális tömeget mértünk $CD4^+$ T-sejtekben.
5. A PHA okozta mitokondriális Ca^{2+} felvétel illetve mitokondriális depolarizáció fokozott volt az újszülött $CD4^+$, míg csökkent $CD8^+$ T-sejtekben. Valószínűleg ezen változások a mitokondriális Ca^{2+} anyagcserében, illetve funkcióban hozzájárulnak a $CD4^+$ sejtekre jellemző fokozott O_2^- képződéshez. Adataink azt sugallják, hogy a T-sejt aktiváció bonyolult szabályozása jelentős különbségeket mutat felnőttek és újszülöttek között (16. ábra), melyek szerepet játszhatnak az újszülöttek adaptív immunrendszerének éretlenségében.



16. ábra: Az újszülött CD4⁺ T-sejtek aktivációjának sematikus ábrázolása. Az ábra bemutatja a fitohemagglutinin okozta aktiváció során általunk megfigyelt változásokat felnőtt CD4⁺ T-sejtekhez képest. A csökkent nyugalmi citoplazmatikus Ca²⁺ szint mellett alacsonyabb mitokondriális tömeg jellemző. Az alacsonyabb mitokondriális tömeg fokozott Ca²⁺ felvételre képes, mely hozzájárul a nagyobb mitokondriális depolarizációhoz valamint az emelkedett szintű szuperoxidképzéshez.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Háttér: klinikai tapasztalatok és kísérletes adatok egyaránt arra utalnak, hogy az újszülöttek T-sejtjei funkciójukban elmaradnak a felnőttekéihez képest. Az aktivációt követő gyulladáshoz szükséges citokin termelés kisebb mértékű újszülöttekben, mint felnőttekben. A mitokondriumoknak meghatározó szerepe van a T-sejtek aktivációjában. Kísérleteink során tanulmányoztuk, hogy vajon a mitokondriális funkció az újszülött T-sejtekben különbözik-e a felnőttekétől. Ehhez egy olyan áramlási citométeres módszert dolgoztunk ki, amellyel vizsgálható a rövidtávú T-sejt aktiváció.

Módszerek: hogy validáljuk az áramlási citométeres módszerünket, elsőként a PHA által indukált T-sejt aktivációt vizsgáltuk. 10 percen keresztül követtük a citoplazmatikus kalcium koncentráció mellett a plazmamembrán-potenciálban, a mitokondriális kalcium koncentrációban, a mitokondriális membránpotenciálban és a szuperoxid-termelésben bekövetkező változásokat a fitohemagglutinin indukálta aktiváció során Jurkat-sejtekben. Ezt követően ugyanezen folyamatokat hasonlítottuk össze 12 újszülött és 11 egészséges felnőtt CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtjeiben.

Eredmények: 1) Bemutattuk, hogy a citoplazmatikus kalcium-jel, a plazmamembrán-potenciál változása, a mitokondriális kalcium-jel, a mitokondriális depolarizáció valamint a mitokondriális szuperoxid-képződés sikeresen vizsgálható áramlási citométer segítségével T-sejtekben. 2) A nyugalmi mitokondriális tömeg alacsonyabb volt újszülöttek CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtjeiben. A felnőttekhez képest, újszülöttek CD4⁺ T-sejtjeiben a nyugalmi Ca²⁺-szint alacsonyabb volt, mely normális aktiváció indukálta Ca²⁺-jellel társult. Míg, az újszülött CD8⁺ T-sejtek nyugalmi Ca²⁺ szintje megegyezett a felnőttekével, az aktiválás hatására kialakult Ca²⁺-jel alacsonyabb volt. A mitokondriumok Ca²⁺ felvétele fokozott volt az újszülött CD4⁺, csökkent a CD8⁺ T-sejtekben a felnőttek azonos sejtcsoportjaihoz képest. Ezzel párhuzamosan nagyobb mértékű volt az újszülött CD4⁺ sejtek és kisebb a CD8⁺ T-sejtek mitokondriális depolarizációja a felnőtt T-sejtekhez képest. A CD4⁺ T-sejtek mitokondriális szuperoxid-képződése fokozott volt az újszülöttben a felnőttekhez képest.

Következtetések: kísérleteink igazolják, hogy az általunk kifejlesztett áramlási citométeres mérési eljárás alkalmas az eddig is alkalmazott citoplazmatikus kalcium jel vizsgálata mellett a plazmamembrán potenciál, a mitokondriális kalcium-anyagszere, a mitokondriális potenciál és a szabadgyökök képződésének vizsgálatára. Adataink azt

sugallják, hogy az újszülött T-sejtek markáns különbséget mutatnak a mitokondriális funkcióban, valamint a szuperoxid-képződésben. A különbségek azonban eltérőek a CD4+ valamint CD8+ sejtek között.

8. SUMMARY

Background: Clinical experience and experimental data support that neonatal T-cells are immunologically less competent than those in the adult. Upon activation the production of inflammatory cytokines in CD3+ T-cells is lower in the neonate than in the adult. Mitochondrial functions have a major impact on T-cell functionality. We characterized whether mitochondrial function in the neonatal T-cells differs from that in the adult T-cells during short T-cell activation. In order to perform the experiments kinetic flow cytometry methods were established for the characterization of short term T-cell activation.

Methods: To validate our methods first we described the kinetic alterations upon PHA induced activation in Jurkat-cells. We monitored plasma membrane potential, mitochondrial Ca^{2+} levels, mitochondrial membrane potential and superoxide generation in parallel with cytoplasmic Ca^{2+} levels during 10 minutes of phytohaemagglutinine-induced activation of Jurkat-cells. This was followed by the comparison of the same parameters in CD4+ and CD8+ T cells of 12 term neonates (cord blood mononuclear cells) and 11 healthy adults (peripheral blood mononuclear cells).

Results: 1) We demonstrated that the cytoplasmic Ca^{2+} signal, the kinetics of membrane potential, mitochondrial Ca^{2+} -levels, mitochondrial potential and superoxide generation can also be successfully analyzed using flow cytometry. 2) Baseline mitochondrial mass of CD4+ and CD8+ cells was lower in the neonate than in the adult. In comparison with the adult, neonatal resting CD4+ T-cells had lower cytoplasmic Ca^{2+} - levels and this was associated with normal activation induced Ca^{2+} -response. While, CD8+ neonatal T cells showed similar baseline Ca^{2+} - levels than adults' and during short-term activation cytoplasmic Ca^{2+} -response was lower in neonatal than in adult CD8+ T-cells. Mitochondrial Ca^{2+} -uptake was increased in CD4+ neonatal T cells while decreased in CD8+ T-cells. Mitochondrial depolarization was increased in CD4+ and decreased in CD8+ neonatal T-cells compared to adults. Superoxide generation was higher and equal in neonatal CD4+ and CD8+ cells, respectively, compared to the adult.

Conclusion: The present methodology provides an opportunity for monitoring and characterizing cytoplasmic calcium levels, plasma membrane potential, mitochondrial Ca^{2+} -levels, mitochondrial membrane potential and superoxide generation in PHA-

activated T-cells with flow cytometry. Our data suggest that neonatal T-cells exhibit marked differences in mitochondrial function and superoxide generation compared to adult T-cells. The differences are not consistent in CD4+ and CD8+ cells.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adkins B. (2013) Neonatal immunology: responses to pathogenic microorganisms and epigenetics reveal an "immunodiverse" developmental state. *Immunol Res*, 57:246-257.
2. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. (2004) Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*, 4:553-564.
3. Basha S, Surendran N, Pichichero M. (2014) Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*, 10:1171-1184.
4. Garcia AM, Fadel SA, Cao S, Sarzotti M. (2000) T cell immunity in neonates. *Immunol Res*, 22:177-190.
5. García Vela JA, Delgado I, Bornstein R, Alvarez B, Auray MC, Martin I, Oña F, Gilsanz F. (2000) Comparative intracellular cytokine production by in vitro stimulated T lymphocytes from human umbilical cord blood (HUCB) and adult peripheral blood (APB). *Anal Cell Pathol*, 20:93-98.
6. Kaminski BA, Kadereit S, Miller RE, Leahy P, Stein KR, Topa DA, Radivoyevitch T, Veigl ML, Laughlin MJ. (2003) Reduced expression of NFAT-associated genes in UCB versus adult CD4+ T lymphocytes during primary stimulation. *Blood*, 102:4608-4617.
7. Adkins B. (2003) Peripheral CD4+ lymphocytes derived from fetal versus adult thymic precursors differ phenotypically and functionally. *J Immunol*, 171:5157-5164.
8. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG. (1998) Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol*, 160:4730-4737.
9. Adkins B. (2000) Development of neonatal Th1/Th2 function. *Int Rev Immunol*, 19:157-171.
10. Siegrist CA. (2000) Vaccination in the neonatal period and early infancy. *Int Rev Immunol*, 19:195-219.
11. Hassan J, Reen DJ. (1997) Cord blood CD4+ CD45RA+ T cells achieve a lower magnitude of activation when compared with their adult counterparts. *Immunology*, 90:397-401.

12. Piguet PF, Irlle C, Kollatte E, Vassalli P. (1981) Post-thymic T lymphocyte maturation during ontogenesis. *J Exp Med*, 154:581-593.
13. Kidd P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*, 8:223-246.
14. Mosmann TR, Sad S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 17:138-146.
15. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. (1996) Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med*, 184:539-548.
16. Siiteri PK, Stites DP. (1982) Immunologic and endocrine interrelationships in pregnancy. *Biol Reprod*, 26:1-14.
17. White GP, Watt PM, Holt BJ, Holt PG. (2002) Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO- T cells. *J Immunol*, 168:2820-2827.
18. Berrington JE, Barge D, Fenton AC, Cant AJ, Spickett GP. (2005) Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clin Exp Immunol*, 140:289-292.
19. Bains I, Antia R, Callard R, Yates AJ. (2009) Quantifying the development of the peripheral naive CD4+ T-cell pool in humans. *Blood*, 113:5480-5487.
20. Elahi S, Ertelt JM, Kinder JM, Jiang TT, Zhang X, Xin L, Chaturvedi V, Strong BS, Qualls JE, Steinbrecher KA, Kalfa TA, Shaaban AF, Way SS. (2013) Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*, 504:158-162.
21. Brownlie RJ, Zamoyska R. (2013) T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol*, 13:257-269.
22. Vig M, Kinet JP. (2009) Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol*, 10:21-27.
23. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. (2009) T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27:591-619.
24. Feske S. (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*, 7:690-702.

25. Lewis RS. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 19:497-521.
26. Clipstone NA, Crabtree GR. (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 357:695-697.
27. Fanger CM, Hoth M, Crabtree GR, Lewis RS. (1995) Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J Cell Biol*, 131:655-667.
28. Parekh AB. (2007) Functional consequences of activating store-operated CRAC channels. *Cell Calcium*, 42:111-121.
29. Mello de Queiroz F, Ponte CG, Bonomo A, Vianna-Jorge R, Suarez-Kurtz G. (2008) Study of membrane potential in T lymphocytes subpopulations using flow cytometry. *BMC Immunol*, 9:63.
30. Panyi G, Varga Z, Gaspar R. (2004) Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett*, 92:55-66.
31. Leonard RJ, Garcia ML, Slaughter RS, Reuben JP. (1992) Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:10094-10098.
32. Shapiro HM, Natale PJ, Kamensky LA. (1979) Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76:5728-5730.
33. Krauss S, Brand MD, Buttgerit F. (2001) Signaling takes a breath--new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction. *Immunity*, 15:497-502.
34. Wang R, Green DR. (2012) Metabolic checkpoints in activated T cells. *Nat Immunol*, 13:907-915.
35. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, Wang CR, Schumacker PT, Licht JD, Perlman H, Bryce PJ, Chandel NS. (2013) Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*, 38:225-236.
36. Duchon MR. (2000) Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*, 529Pt1:57-68.
37. Poburko D, Demarex N. (2012) Regulation of the mitochondrial proton gradient by cytosolic Ca²⁺(+) signals. *Pflugers Arch*, 464:19-26.

38. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. (2013) Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*, 342:1242454.
39. Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, Hoth M. (2007) T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:14418-14423.
40. Quintana A, Griesemer D, Schwarz EC, Hoth M. (2005) Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflugers Arch*, 450:1-12.
41. Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R. (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:13807-13812.
42. Gunter TE, Sheu SS. (2009) Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1787:1291-1308.
43. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, 567:96-102.
44. Santo-Domingo J, Demaurex N. (2010) Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1797:907-912.
45. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. (2012) Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13:566-578.
46. Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K. (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*, 28:285-296.
47. Hoth M, Button DC, Lewis RS. (2000) Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:10607-10612.
48. Denton RM. (2009) Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta*, 1787:1309-1316.
49. Loew LM, Carrington W, Tuft RA, Fay FS. (1994) Physiological cytosolic Ca²⁺ transients evoke concurrent mitochondrial depolarizations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:12579-12583.
50. Nagy G, Koncz A, Perl A. (2003) T cell activation-induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca²⁺- and redox-dependent production of nitric oxide. *J Immunol*, 171:5188-5197.

51. Williams MS, Kwon J. (2004) T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radic Biol Med*, 37:1144-1151.
52. Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. (2004) T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol*, 5:818-827.
53. Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. (2002) Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med*, 195:59-70.
54. June CH, Rabinovitch PS. (1990) Flow Cytometric Measurement of Intracellular Ionized Calcium in Single Cells with Indo-1 and Fluo-3. *Methods Cell Biol*, 33:37-58.
55. Kaposi A, Veress G, Vásárhelyi B, Macardle P, Bailey S, Tulassay T, Treszl A. (2008) Cytometry-acquired calcium-flux data analysis in activated lymphocytes. *Cytometry A*, 73:246-253.
56. Kaposi A, Toldi G, Mészáros G, Szalay B, Veress G, Vásárhelyi B. (2012) Experimental Conditions and Mathematical Analysis of Kinetic Measurements Using Flow Cytometry – The FacsKin Method. In Schmid I (szerk.): *Flow Cytometry - Recent Perspectives*. InTech (2012). ISBN 979-953-307-355-1.
57. Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. (2001) Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56:350-360.
58. McCurley TL, Larson R. (1996) Clinical applications of flow cytometry in hematology and immunology. *Clin Lab Sci*, 9:358-362.
59. Abraham RT, Weiss A. (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol*, 4:301-308.
60. Sakmann B, Neher E. (1984) Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*, 46:455-472.
61. Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T. (1992) Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358:325-327.
62. Magalhaes PJ, Rizzuto R. (2001) Mitochondria and calcium homeostasis: a tale of three luminescent proteins. *Luminescence*, 16:67-71.

63. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev*, 79:1089-1125.
64. Davidson SM, Duchen MR. (2012) Imaging mitochondrial calcium signalling with fluorescent probes and single or two photon confocal microscopy. *Methods Mol Biol*, 810:219-234.
65. Minta A, Kao JP, Tsien RY. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem*, 264:8171-8178.
66. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. (2010) Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta*, 1797:607-618.
67. Lichtman AH, Segel GB, Lichtman MA. (1983) The role of calcium in lymphocyte proliferation. *Blood* 61:413-422.
68. Hoth M, Fanger CM, Lewis RS. (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol*, 137:633-648.
69. Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. (1995) Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, 82:415-424.
70. Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B. (1997) Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J Cell Biol*, 136:833-844.
71. Rutter GA, Burnett P, Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T, Tavares JM, Denton RM. (1996) Subcellular imaging of intramitochondrial Ca²⁺ with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:5489-5494.
72. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. (1997) JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*, 411:77-82.
73. Scaduto RC, Grotyohann LW. (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*, 76:469-477.
74. Gomes A, Fernandes E, Lima JL. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods*, 65:45-80.
75. Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. (2010) 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species

- measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res*, 44:587-604.
76. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, Huang SC, van der Windt GJ, Blagih J, Qiu J, Weber JD, Pearce EJ, Jones RG, Pearce EL. (2013) Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*, 153:1239-1251.
 77. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med*, 34:1359-1368.
 78. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, Ischiropoulos H. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*, 52:1-6.
 79. Benov L, Sztejnberg L, Fridovich I. (1998) Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med*, 25:826-831.
 80. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Hasko G, Hawkins BJ, Madesh M, Pacher P. (2007) Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc*, 2:2295-2301.
 81. Koncz A. (2008) Nitrogén-monoxid szerepe T limfocita aktivációban. In *Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola*. PhD, Semmelweis Egyetem.
 82. Toldi G, Treszl A, Pongor V, Gyarmati B, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2010) T-lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in the neonate. *Int Immunol*, 22:769-774.
 83. Orban C, Bajnok A, Vasárhelyi B, Tulassay T, Toldi G. (2014) Different calcium influx characteristics upon Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition in T helper subsets. *Cytometry A*, 85:636-641.
 84. Jullien P, Cron RQ, Dabbagh K, Cleary A, Chen L, Tran P, Stepick-Biek P, Lewis DB. (2003) Decreased CD154 expression by neonatal CD4⁺ T cells is due to limitations in both proximal and distal events of T cell activation. *Int Immunol*, 15:1461-1472.

85. Palin AC, Ramachandran V, Acharya S, Lewis DB. (2013) Human neonatal naive CD4+ T cells have enhanced activation-dependent signaling regulated by the microRNA miR-181a. *J Immunol*, 190:2682-2691.
86. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:552-565.
87. van der Windt GJ, Everts B, Chang CH, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, Pearce EJ, Pearce EL. (2012) Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity*, 36:68-78.
88. Nagy G, Barcza M, Gonchoroff N, Phillips PE, Perl A. (2004) Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca²⁺ signaling profile of lupus T cells. *J Immunol*, 173:3676-3683.
89. Kilpinen S, Hurme M. (1998) Low CD3+CD28-induced interleukin-2 production correlates with decreased reactive oxygen intermediate formation in neonatal T cells. *Immunology*, 94:167-172.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Összesített impakt faktor: 13,795, első szerzőként: 1,727.

1. **Mészáros G**, Szalay B, Toldi G, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A. (2012) Kinetic measurements using flow cytometry: new methods for monitoring intracellular processes. *Assay Drug Dev Technol*, 10:97-104.
I.f.: 1,727
2. **Mészáros G**, Rónai K, Toldi G, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A. (2008) Sejtélettani folyamatok jellemzése „real-time” áramlási citometriás módszerrel. *Magyar Immunológia*, 7:22-29.
I.f.: -
3. Kaposi A, Toldi G, **Mészáros G**, Szalay B, Veress G, Vásárhelyi B. (2012) Experimental Conditions and Mathematical Analysis of Kinetic Measurements Using Flow Cytometry – The FacsKin Method. In Schmid I (szerk.): *Flow Cytometry - Recent Perspectives*. InTech. ISBN 979-953-307-355-1, 2012: 299-324.
I.f.: -
4. Szalay B, **Mészáros G**, Cseh Á, Ács L, Deák M, Kovács L, Vásárhelyi B, Balog A. (2012) Adaptive immunity in ankylosing spondylitis: phenotype and functional alterations of T-cells before and during infliximab therapy. *Clin Dev Immunol*, 2012:808724.
I.f.: 3,064
5. Szalay B, Cseh Á, **Mészáros G**, Kovács L, Balog A, Vásárhelyi B. (2014) The Impact of DMARD and Anti-TNF Therapy on Functional Characterization of Short-Term T-Cell Activation in Patients with Rheumatoid Arthritis - A Follow-Up Study. *PloS One* 9:e104298.
I.f.: 3,534
6. Toldi G, Vásárhelyi B, Kaposi A, **Mészáros G**, Pánczél P, Hosszúfalusi N, Tulassay T, Treszl A. (2010) Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: the increased significance of Kv1.3 potassium channels. *Immunol Lett*, 133:35-41.
I.f.: 2,511
7. Toldi G, Folyovich A, Simon Z, Zsiga K, Kaposi A, **Mészáros G**, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2011) Lymphocyte calcium influx kinetics in multiple sclerosis treated without or with interferon β . *J Neuroimmunol*, 237:80-86.
I.f.: 2,959

10.2. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Összesített impakt faktor: 5,002, első szerzőként: 1,189.

1. Dunai G, Vásárhelyi B, Szabó M, Hajdú J, **Mészáros G**, Tulassay T, Treszl A. (2008) Published genetic variants in retinopathy of prematurity: Random forest analysis suggests a negligible contribution to risk and severity. *Curr Eye Res*, 33:501-505.
I.f.: 1,519
2. Mácsai E, Cseh Á, Budai G, **Mészáros G**, Vásárhelyi B, Fischer K, Szabó A, Treszl A. (2009) Effect of 3 Months of Doxazosin Therapy on T-cell Subsets in Type 2 Diabetic Patients. *J Int Med Res*, 37:1982-1987.
I.f.:0,938
3. **Mészáros G**, Szalay B, Toldi G, Mezei G, Tamási L, Vásárhelyi B, Cserhádi E, Treszl A. (2009) FoxP3(+) Regulatory T cells in Childhood Allergic Rhinitis and Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 19:238-240.
I.f.: 1,189
4. Toldi G, Svec P, Vásárhelyi B, **Mészáros G**, Rigó J, Tulassay T, Treszl A. (2008) Decreased number of FoxP3+regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87:1229-1233.
I.f.: 1,356
5. Treszl A, **Mészáros G**, Toldi G, Vásárhelyi B. Histone deacetylases and autoimmunity. In *The Epigenetics of Autoimmune Diseases* (Zouali, M., ed), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2009: 385-402.
I.f.: -

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönöm Vásárhelyi Barna professzor úrnak, hogy egyetemi hallgató koromban bizalmat adott és az együtt végzett munka során emberileg és szakmailag mindig támogatott. Remélem, hogy a munkacsoportjában eltöltött évek alatt átvett kutatási szemléletet tovább tudom majd adni. Köszönetet mondok konzulensemnek, Dr. Treszl Andrásnak, hogy megismertetett az áramlási citometriával és az adatok statisztikai összehasonlításában nyújtott segítségéért.

Köszönöm Tulassay Tivadar professzor úrnak, hogy az általa vezetett MTA-SE Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoportban dolgozhattam, lehetőséget adott munkatervem és kísérleteim megvalósítására. Személyes bátorításával, támogatásával nagyban hozzájárult e munka létrejöttéhez.

Szerencsésnek érzem magam, hogy olyan csapatban dolgozhattam, ahol hosszútávú szakmai és baráti kapcsolatokat szerezhettem. Hálás vagyok ezért hallgatótársaimnak, Toldi Gergelynek, Kaposi Ambrusnak és Szalay Balázsnak. Az ő munkájuk és segítségük nélkül e munka nem jöhetett volna létre.

Az alkotómunkához, így a tudományos kutatáshoz is biztos háttérre és szilárd alapokra van szükség. A doktori képzés sok lemondással jár, amihez a család és a barátok türelme, megértése nagyon fontos. Ezúton köszönöm meg mindnyájuknak az elmúlt évek folyamatos támogatását, az általam választott úton való előrehaladáshoz nyújtott segítségüket. Egyedül minden sokkal nehezebb lett volna.

Végül hálával tartozom vizsgálatokban részt vevő betegeknek és önkénteseknek a vérmintákért, valamint az újszülöttek szüleinek, akik hozzájárultak a köldökzsínórvér felhasználásához.