

# Limfocita aktiváció vizsgálata áramlási citométerrel

Doktori tézisek

**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.

## 1. BEVEZETÉS

Kalcium. Membránpotenciál. Mitokondriumműködés. Reaktív oxigéngyökök. Alapvető sejtelettani 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 sejtelettani 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.

## 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 alapkutatásban hasznosítottuk. Azt elemeztük, hogy az újszülötteknél a T-sejtek intracelluláris jelátvittele eltérő lehet-e a felnőttekétől.

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. ÚJ KÍSÉRLETI RENDSZER KIDOLGOZÁSA: INTRACELLULÁRIS FOLYAMATOK MONITOROZÁSA T-LIMFOCITAKBAN

A kiértékeléshez szükséges algoritmus létrehozását követően olyan kísérleti módszereket dolgoztunk ki, amelyekkel egy időben lehet kétféle sejtcsoporton (pl. CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> 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. Citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup>-szint és membránpotenciál-mérés

A  $[Ca^{2+}]_c$  kinetikus méréshez Fluo-3-AM-et használtunk ( $E_m$  526 nm, detektálás 530/30-as BP szűrő segítségével). A sejteket 2,6  $\mu$ M-os koncentrációjú Fluo-3-AM és 0,02% Pluronic F-127-tel töltöttük 30°C-on 30 percig, melyet mosás követett.

A membránpotenciál mérésére di-BA-C4-(5)-öt használtunk ( $E_m$  616 nm, detektálás 610/20-as BP szűrő segítségével). A sejteket 300 nM-os koncentrációjú di-BA-C4-(5)-tel töltöttük 37°C-on 8 percig.

##### 3.1.2. Mitokondriális $[Ca^{2+}]$ mérése

A mitokondriális Ca<sup>2+</sup>-koncentráció változásának nyomon követésére Rhod2/AM-et használtunk ( $E_m$  581 nm, detektálás 575/26-as BP szűrő segítségével). A sejteket 2,5  $\mu$ M-os koncentrációjú Rhod2/AM és 0,02% Pluronic F-127-tel töltöttük 30°C-on 20 percig, melyet mosás követett.

##### 3.1.3. Mitokondriális membránpotenciál mérés

A mitokondriális membránpotenciál változásának nyomon követésére TMRM-et használtunk ( $E_m$  567 nm, detektálás 575/26-as BP szűrő segítségével). A sejteket 1  $\mu$ M-os koncentrációjú TMRM-mel töltöttük 37°C-on 20 percig, melyet mosás követett.

### 3.1.4. Szabadgyök képződés ( $O_2^-$ ) mérése

A dihidroetidium (DHE) a sejtekbe passzívan bejutó molekula, ahol a szuperoxid gyökkel reagálva etidiummá alakul ( $E_m$  605 nm, detektálás 610/20-as BP szűrő segítségével). A sejteket 1  $\mu$ M-os koncentrációjú DHE-vel töltöttük 37°C-on 18 percig.

## 3.2. A KLINIKAI VIZSGÁLATHOZ HASZNÁLT MÓDSZEREK

### 3.2.1. A vizsgálat alanyai

Az újszülöttek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatához 11 egészséges felnőttől vettünk perifériás vérmintát, és 12 érett, egészséges újszülöttől gyűjtöttünk köldökzsinórvért közvetlenül per vias naturales szülés után. Az alanyok adatait az 1. táblázat tartalmazza.

#### 1. 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

### 3.2.2. 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 kézzel festettük, csak azokon a mintákon végeztünk mérést, ahol az élő sejtek aránya 90% felett volt.

### 3.2.3. Sejtfelszíni markerek

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.

### 3.2.4. A sejtek aktivációja

A mérések kezdetén 2 perces alapvonal rögzítését követően fitohemagglutininnal (PHA) 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 fluoreszcens jel változását 12 percig követtük.

### 3.2.5. Kinetikus méréssel nyert FCM adatok jellemzése

A mérések során nyert adatokat a laboratóriumunkban fejlesztett, FacsKin elnevezésű számítógépes program segítségével értékeltük: <http://facskin.bitbucket.org/index.html>. Ennek lényege, hogy egy matematikai algoritmus segítségével lineáris, logisztikus és dupla-logisztikus függvényeket illeszt a mérési adatokra. A lineáris és logisztikus függvények a folyamatosan növekvő fluoreszcens jelintenzitások jellemzésére, míg a dupla-logisztikus függvény olyan mérések jellemzésére használható, ahol a kezdeti intenzitás-növekedést a csúcspont elérése után jelintenzitás-csökkenés követ. A program a függvények következő paramétereit számítja ki: a maximum értékét (Max), a maximum eléréséhez szükséges időt ( $t_{max}$ ), a görbe felszálló ágának meredekségét a maximum értékének 50%-ánál (Slope), a görbe alatti terület értékét (AUC) valamint a végső értéket (End). Az AUC egy egysége (U) egyenlő az egy másodpercre eső relatív intenzitás értékkel.

### 3.2.5. 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 teszteket 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 (egy aspecifikus T-sejt aktiváló) okozta korai aktivációs változásokat monitoroztuk 12 percen keresztül Jurkat-sejteken. 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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.

Vizsgálatunk során PHA hatására nem változott a szuperoxid-termelés Jurkat-sejtekben.

#### 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  $\mu\text{M}$  végkoncentrációban) a szuperoxidtermelés indukálására. Ezen mérések adataira logisztikus függvényt illesztettünk. A Hettmansperger-Norton trendanalízis szignifikáns összefüggést mutatott a rotenon dózisa valamint az AUC, End paraméterek között.

Ezen túlmenően megvizsgáltuk a 15 perces rotenon előkezelés hatását a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvételre. Jurkat-sejtekhez 10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  végkoncentrációjú rotenont adtunk, majd 25  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú fitohemagglutininnel

aktiváltuk a sejteket (n=3 minden koncentrációban). Dózis-hatást összefüggést mutattunk ki a hozzáadott rotenon koncentrációja és a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel között. A rotenon előkezelés csökkentette a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvételt (Max érték  $p < 0,05$ ).

## 4.2. ÚJSZÜLÖTT ÉS FELNŐTT 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 alcsoportban 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.

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

#### 4.2.2.1. Alacsonyabb $[\text{Ca}^{2+}]_c$ újszülött CD4+ T-sejtjeiben

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

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

Mivel a mitokondriumok fontos szerepet játszanak a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  szabályozásában illetve a  $\text{Ca}^{2+}$  jelentősen befolyásolja a mitokondriumok működését, megvizsgáltuk a mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$ -anyagcserét valamint a mitokondriális membránpotenciált (a mitokondrium funkció egyik markere). Nyugalmi CD4+ és CD8+ T-sejtjeik  $\text{Ca}^{2+}$ -szintjei



azonosak voltak az újszülött és felnőtt mintákban. Hasonlóan, a nyugalmi  $\Delta\Psi_m$  is azonos volt a vizsgált minták CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> sejtcsoportjaiban.

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

4.2.3.1. Csökkent citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup>-jel CD8<sup>+</sup> újszülött T-sejtekben

A nyugalmi [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> mérését követően PHA-val stimulált T-sejtekben vizsgáltuk a citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup>-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<sup>2+</sup>-jele az újszülöttek CD8<sup>+</sup> T-sejtjeiben alacsonyabb volt a felnőtt CD8<sup>+</sup> T-sejtekhez képest (az AUC és a Slope paraméterek esetében), míg az újszülött és felnőtt CD4<sup>+</sup> sejtek esetében azonos mértékű volt.

4.2.3.2. Fokozott mitokondriális Ca<sup>2+</sup> felvétel újszülöttek CD4<sup>+</sup> T-sejtjeiben

Újszülöttek T-sejtjeiben a PHA által kiváltott mitokondriális Ca<sup>2+</sup> felvétel mértéke és kinetikája eltérő volt a felnőttek T-sejtjeihez képest. Az újszülött CD4<sup>+</sup> T-sejtek mitokondriumai több (AUC, Slope és End paraméterek), míg a CD8<sup>+</sup> T-sejtek kevesebb (End paraméter) Ca<sup>2+</sup>-ot szekvesztráltak az azonos felnőtt sejtcsoportokhoz képest.

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

A nyugalmi  $\Delta\Psi_m$  azonos volt a vizsgált minták CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> sejtcsoportjaiban. Azonban, hasonlóan a mitokondriális Ca<sup>2+</sup> felvételhez, a PHA indukálta mitokondriális depolarizáció azonos irányba változott az újszülött T-sejtekben a felnőttekhez képest: megnövekedett depolarizáció a CD4<sup>+</sup> T-sejtekben (AUC és Max), illetve csökkent depolarizáció a CD8<sup>+</sup> T-sejtekben (AUC, Slope and Max).

4.2.3.4. Fokozott O<sub>2</sub><sup>-</sup> termelés újszülöttek CD4<sup>+</sup> T-sejtjeiben

A mitokondriumok által termelt szuperoxid fontos jelátviteli funkcióval bír a T-sejt-aktivációban. A megváltozott mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel illetve mitokondriális depolarizáció hátassal lehet a szabadgyök-képződésre. A vizsgált minták  $\text{CD4}^+$  és  $\text{CD8}^+$  sejteit a  $\text{O}_2^-$  specifikus DHE fluoreszcens festékkal töltöttük és mértük a PHA indukálta szuperoxid képződést. Hasonlóan az újszülött  $\text{CD4}^+$  T-sejtekre jellemző emelkedett  $\text{Ca}^{2+}$  felvételre és a nagyobb mértékű depolarizációra, ezen sejtek több  $\text{O}_2^-$  termeltek (az AUC paraméter alapján). Míg a  $\text{CD8}^+$  sejtek szuperoxid termelésében nem volt különbség.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

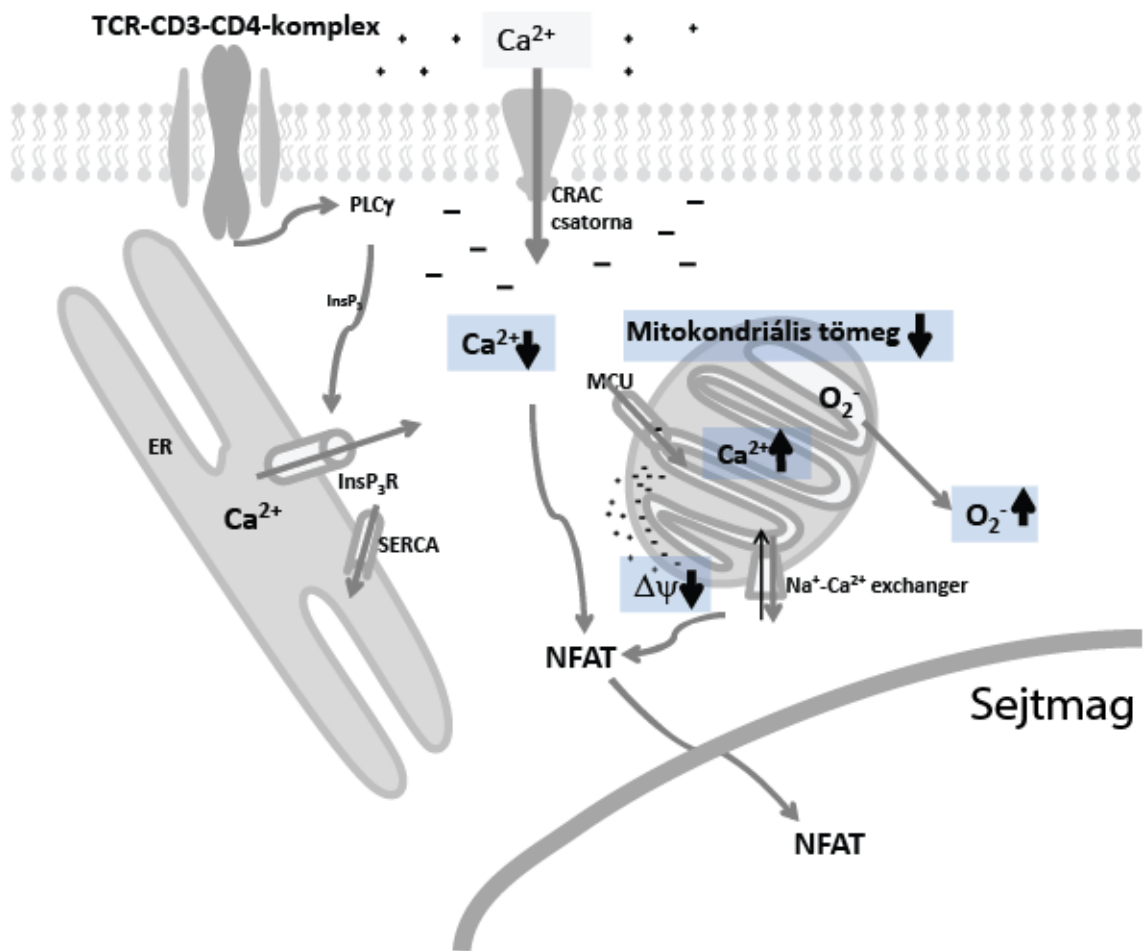
1. Az áramlási citométerek egyik nagy előnye a „single-cell” technikákkal szemben, hogy lehetővé teszik több különböző, nagyszámú sejtet tartalmazó sejtcsoport egyidejű vizsgálatát. A disszertáció módszertannal kapcsolatban végzett kísérletei igazolják, hogy az általunk kifejlesztett mérési eljárás alkalmas 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 háttérében 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 újszülött  $CD4^+$  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 (1. ábra), melyek szerepet játszhatnak az újszülöttek adaptív immunrendszerének éretlenségében.



**1. ábra:** Az újszülött CD4<sup>+</sup> T-sejtek aktivációjának sematikus ábrázolása. Az ábra bemutatja a fithemagglutinin okozta aktiváció során általunk megfigyelt változásokat felnőtt CD4<sup>+</sup> T-sejtekhez képest. A csökkent nyugalmi citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup>-szint mellett alacsonyabb mitokondriális tömeg jellemző. Az alacsonyabb mitokondriális tömeg fokozott Ca<sup>2+</sup>-felvételre képes, mely hozzájárul a nagyobb mitokondriális depolarizációhoz valamint az emelkedett szintű szuperoxidképzéshez.

## 5. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 5.1. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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  $\beta$ . *J Neuroimmunol*, 237:80-86.

## 5.2. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

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.
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.
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.
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.
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.