

# A rövidtávú limfocita aktiváció vizsgálata áramlási citometriával

Doktori értekezés

*Dr. Toldi Gergely*

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Vásárhelyi Barna, PhD, DSc, egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Andrikovics Hajnalka, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Cervenak László, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szabó András, PhD, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Nagy Gyula Richárd, PhD, egyetemi tanársegéd

Dr. Somogyvári Zsolt, PhD, szakmai vezető

*Budapest, 2012*

**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>2. BEVEZETÉS .....</b>	<b>6</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>7</b>
3.1. A T LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SZABÁLYOZÁSA.....	7
3.2. A LIMFOCITÁK KÁLIUM CSATORNÁINAK SZEREPE A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN .....	10
3.2.1. <i>A Kv1.3 csatorna biofizikai és biokémiai jellemzői.....</i>	<i>10</i>
3.2.2. <i>Az IKCa1 csatorna biofizikai és biokémiai jellemzői .....</i>	<i>13</i>
3.3. A Kv1.3 ÉS IKCa1 CSATORNÁK GÁTLÓSZEREI .....	13
3.4. A GÁTLÓSZEREK POTENCIÁLIS TERÁPIÁS HASZNOSÍTHATÓSÁGA .....	16
3.5. A T LIMFOCITÁK JELLEMZŐI ÚJSZÜLÖTTKORBAN .....	19
3.6. A T LIMFOCITÁK JELLEMZŐI TERHESSÉG SORÁN ÉS PREECLAMPSIÁBAN.....	20
3.7. A T LIMFOCITÁK JELLEMZŐI SCLEROSIS MULTIPLEXBEN .....	22
3.8. A T LIMFOCITÁK JELLEMZŐI 1-ES TÍPUSÚ DIABETESBEN .....	23
<b>4. CÉLKITŰZÉS .....</b>	<b>26</b>
<b>5. ALANYOK ÉS MÓDSZER.....</b>	<b>27</b>
5.1. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ RÖVIDTÁVÚ VIZSGÁLATÁRA..	27
5.2. A VIZSGÁLATOK ALANYAI.....	30
5.3. A MONONUKLEÁRIS SEJTEK IZOLÁLÁSA .....	32
5.4. A SEJTFELSZÍNI MARKEREK ÉS AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUMSZINT MEGHATÁROZÁSA .....	33
5.5. A SEJTEK GÁTLÓSZERES KEZELÉSE.....	34
5.6. STATISZTIKAI ELEMZÉS .....	34
<b>6. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>35</b>
6.1. A KALCIUM HÁZTARTÁS SZABÁLYOZÁSA EGÉSZSÉGEBEN RÖVID TÁVÚ LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SORÁN .....	35
6.2. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGEBEN .....	39
6.3. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK ÚJSZÜLÖTTKORBAN .....	39
6.4. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGES TERHESSÉGBEN ÉS PREECLAMPSIÁBAN .....	41
6.5. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK SCLEROSIS MULTIPLEXBEN.....	44
6.6. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK 1-ES TÍPUSÚ DIABETESBEN.....	46
<b>7. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>49</b>
7.1. A KALCIUM HÁZTARTÁS SZABÁLYOZÁSA EGÉSZSÉGEBEN RÖVID TÁVÚ LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SORÁN .....	49
7.2. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGEBEN .....	51
7.3. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK ÚJSZÜLÖTTKORBAN .....	52
7.4. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGES TERHESSÉGBEN ÉS PREECLAMPSIÁBAN .....	54
7.5. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK SCLEROSIS MULTIPLEXBEN.....	56
7.6. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK 1-ES TÍPUSÚ DIABETESBEN.....	59
7.7. ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS MÓDSZERÜNK ÁLTALÁNOS HASZNOSÍTHATÓSÁGA .....	60

<b>8. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>62</b>
<b>9. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>64</b>
<b>10. SUMMARY.....</b>	<b>66</b>
<b>11. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>68</b>
<b>12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>77</b>
12.1. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK .....	77
12.2. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK .....	78
<b>13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>81</b>

**1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

APC	antigén prezentáló sejt
AUC	görbe alatti terület
$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$	citoplazmatikus szabad kalciumszint
CaM	kalmodulin
CLX	caloxin 2A1
CRAC	calcium release activated calcium channel
DAG	diacil-glicerol
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
ER	endoplazmás retikulum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAD	glutaminsav-dekarboxiláz
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IL	interleukin
IP <sub>3</sub>	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
Max	maximum érték
MCU	mitokondriális kalcium uniporter
MGTX	margatoxin
MHC	major histocompatibility complex
NF-AT	nuclear factor of activated T cells
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NOD	non obese diabetic
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffer saline
PE	preeclampsia
PerCP	peridinin-chlorophyll-protein complex
PHA	fitohemagglutinin
PIP <sub>2</sub>	foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PMCA	plazma membrán kalcium ATPáz

RPMI	Rosewell Park Memorial Institute medium
RR	ruthenium red
SERCA	szarko/endoplazmás retikulum kalcium ATPáz
SM	sclerosis multiplex
T1DM	1-es típusú diabetes mellitus
TCM	centrális memória T sejt
TCR	T sejt receptor
TEM	effektor memória T sejt
TG	thapsigargin
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
$t_{\max}$	a maximum elérésének ideje
TNF- $\alpha$	tumor nekrosis faktor alfa
TRAM	triarilmetán

## 2. BEVEZETÉS

A T limfociták rövidtávú aktivációja döntő jelentőségű az immunválasz hatékonyságának szabályozásában. Ezek a sejtek fontos szerepet játszanak az autoimmun kórképek pathogenezisében is. A rövidtávú limfocita aktiváció kinetikájának vizsgálata ezért nélkülözhetetlen az immunstátusz jellemzésében mind fiziológiás körülmények között, mind autoimmun betegségekben. Az áramlási citometria az egyik legelterjedtebb vizsgálóeljárás az immunológiai kutatások terén. Ez a nagy áteresztőképességű, széles körben használt vizsgálati módszer azonban ezidáig nem volt megbízhatóan alkalmazható kinetikus mérések végzésére, időben változó folyamatok pontos nyomon követésére. A mérések elemzése ugyanis nem volt kellőképpen objektív, ami megnehezítette az eredmények statisztikai értékelését.

Kutatócsoportunk évek óta dolgozik egy olyan eljárás fejlesztésén, mely lehetőséget nyújt a kinetikus áramlási citométeres mérések matematikai alapú, objektív, megbízható értékelésére. Módszerünk lényege, hogy áramlási citométerrel legalább tíz percen keresztül követjük nyomon egy adott folyamat kinetikus változását a vizsgált sejtekben. Ezt követően a folyamatot leíró fluoreszcens jelekre FacsKin elnevezésű szoftverünk ([www.facskin.com](http://www.facskin.com)) előre meghatározott matematikai függvények sorozatát illeszti, melyeknek adott paramétereit is kiszámítja. Az egyes különálló mérések ezen értékei így egymással összehasonlíthatóakká válnak.

Az elmúlt években kidolgozott eljárásunkat sikerrel alkalmaztuk sejtélettani vizsgálatok során, továbbá különböző, a T limfociták aktivációját érintő megfigyeléseink elemzésére újszülöttkorban, terhességben, preeclampszában, sclerosis multiplexben, valamint 1-es típusú diabetesben. Behatóan tanulmányoztuk továbbá a limfociták kálium csatornáinak a sejtaktiváció folyamatában betöltött szerepét is. Értekezésemben ennek kapcsán nyert eredményeinket ismertetem.

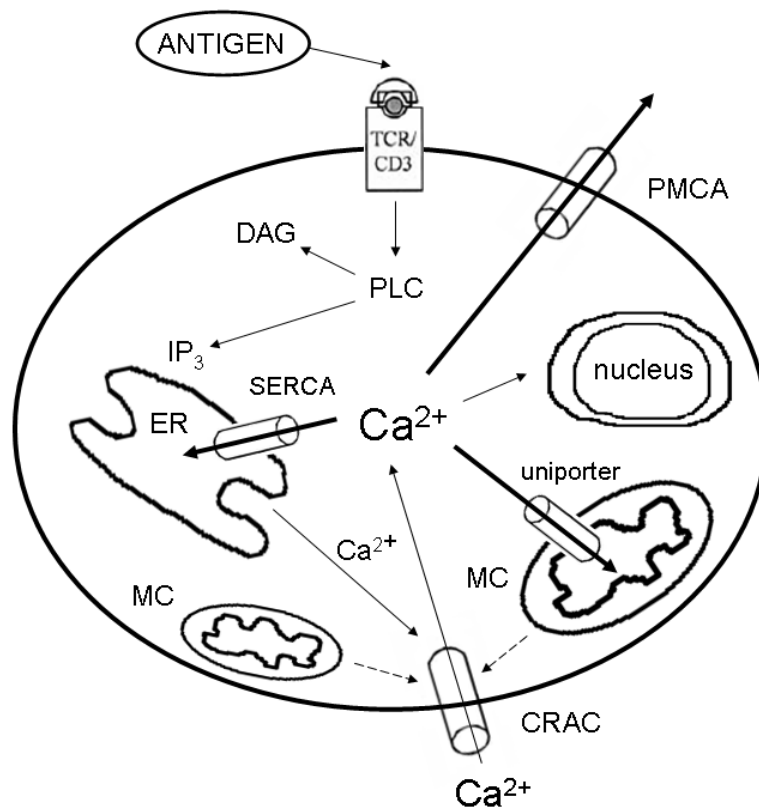
### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A T LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SZABÁLYOZÁSA

A citoplazmatikus szabad kalciumszint ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) megemelkedése létfontosságú szerepet tölt be a limfocita aktivációban, valamint az autoreaktív limfociták kóros működésében. Az antigén prezentáló sejtek (APC-k) feldolgozott antigénekkal töltött major histocompatibility complex (MHC) fehérjéi a T sejteken található T sejt receptor/CD3 (TCR/CD3) komplexhez kötődnek. A bemutatott antigén és a TCR/CD3 komplex közötti specifikus kölcsönhatás számos, sejtmembránon keresztüli jelátviteli útvonalat hoz működésbe. A különböző működésbe lépő foszforilációs kaszkádok többféle kináz enzimet aktiválnak. Bizonyos protein kináz útvonalak, így például a Ras/MAP útvonal, direkt módon járulnak hozzá a T sejt proliferációhoz szükséges géntranszkripció irányításához [1].

Egy másik enzim, a tirozin kináz aktivációja azonban más következménnyel jár, nevezetesen a foszfolipáz C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) aktiválódásával. Ez az enzim egy membránban elhelyezkedő foszfolipidet, a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>) hasítja, melyből diacil-glicerol (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP<sub>3</sub>) keletkezik. Ezen a ponton kettéválk a jelátviteli útvonal. A DAG aktiválja a protein kináz C-t (PKC), ami több lépésen keresztül a nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) transzkripciós faktor aktivációjához vezet – ez számos gén transzkripciójához elengedhetetlen [2].

Ezzel egy időben az IP<sub>3</sub> a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kétfázisú növekedéséhez járul hozzá (**1. ábra**). A kalcium jel egy másik transzkripciós faktor, a nuclear factor of activated T cells (NF-AT) aktivációjához vezet. Ezt a folyamatot a kalcium-kalmodulin komplextől függő foszfátáz, a kalcineurin katalizálja. A kalcineurin defoszforilálja az NF-AT-t, amely ennek következtében felhalmozódik a sejtmagban, ahol az IL-2 gén promoter régiójához kötődik. Az IL-2 gén aktiválódását követően a T sejtek akár antigén jelenléte nélkül is képesek proliferálni. Az említett kétfázisú kalciumszint növekedés az IP<sub>3</sub> keletkezéséhez kapcsolódik, az IP<sub>3</sub> ugyanis az endoplazmás retikulumon (ER) található receptorához kötődve kalciumot szabadít fel e kompartmentből. Az IP<sub>3</sub> receptor tulajdonképpen intracelluláris ligand-vezérelt ionsatornaként is felfogható [3].



### 1. ábra: A citoplazmatikus szabad kalciumszint szabályozásának vázlatja

A vékony nyilak a citoplazmatikus szabad kalciumszint emelkedéséért, míg a vastag nyilak az annak csökkenéséért felelős mechanizmusokat jelzik. A szaggatott nyilak a mitokondriális kalcium felvétel CRAC csatornára kifejtett szabályozó szerepére utalnak. CRAC – calcium release activated calcium csatorna, DAG – diacil-glicerol, ER – endoplazmás retikulum, IP<sub>3</sub> – inozitol-1,4,5-triszfoszfát, MC – mitokondrium, PLC – foszfolipáz-C, PMCA – plazma membrán kalcium ATPáz, SERCA – szarko/endoplazmás retikulum kalcium ATPáz, TCR/CD3 – T sejt receptor/CD3 komplex

A kalciumszint emelkedés második, fenntartott fázisa az extracelluláris térből belépő kalcium ionok következtében jön létre. Ez az ún. calcium release activated calcium (CRAC) csatornán keresztül történik. A CRAC-et a sejten belüli kalcium raktárak kiürülése nyitja, ezért az ún. store-operated csatornák közé tartozik. A csatornát övező tudományos érdeklődés ellenére működési mechanizmusa egyelőre nem ismert egészében. Legfontosabb biofizikai jellemzője, amely a többi kalcium csatornától elkülöníti, hogy extrém mértékben szelektív kalcium ionokra nézve [4]. A CRAC csatornák másik jellegzetessége, hogy aktiváció után az ionáramot elsősorban a kalciumra vonatkozó elektrokémiai hajtóerő határozza meg, a csatorna kapuzása tehát



feszültségtől független, de az ionáram nagysága a sejtek membránpotenciáljára érzékeny lesz. Ez a tulajdonság, a befelé rektifikációval együtt, nagyobb kalcium áramhoz vezet, ha negatívabb a membránpotenciál. A depolarizáló hatású befelé irányuló kalcium áramot ezért kationok kiáramlásával szükséges ellensúlyozni ahhoz, hogy fenntartható legyen az elektrokémiai hajtóerő a kalcium ionok további beáramlásához, és így a transzkripciós folyamatok hatékony működéséhez szükséges kalcium jel fennmaradásához. Ennek jelentőségét alább részletezem.

A kalcium eloszlását a sejten belül olyan finoman szabályozott mechanizmusok összjátéka szabja meg, melyek a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelkedéséért és csökkenéséért felelősek. A  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelkedését biztosító fő mechanizmusok az ER-ból való kalcium felszabadulás [5], a kalcium belépése az extracelluláris térből a CRAC csatornán keresztül [6], és a mitokondriális kalcium felvétel. A mitokondriumoknak kettős szerepük van a kalcium jel alakításában. A sejthártya alatt, a CRAC csatornák közelében elhelyezkedve a mitokondriumok belső membránján található mitokondriális kalcium uniporter (MCU) segítségével lokálisan kalciumot szekvesztrálnak a CRAC csatornák működése során. Így megakadályozzák a CRAC csatornák kalciumfüggő negatív feedback gátlását, és hozzájárulnak az extracelluláris kalcium beáramlásának fenntartásához [7-9]. A limfocita aktiváció egy későbbi fázisában azonban a citoplazmában bárhol elhelyezkedő mitokondriumok képesek nagy mennyiségű kalciumot felvenni és tárolni, és így a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  szintet csökkenteni [10]. A fő mechanizmusok, amelyek limfocitákban az emelkedett  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  csökkentésében részt vesznek: a szarko/endoplazmás retikulum kalcium ATPáz (SERCA) [5] és a plazma membrán kalcium ATPáz (PMCA) [11]. A mitokondriális kalcium felvételnek kisebb szerep jut, elsősorban igen magas  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  szint esetén lép működésbe [10] (**1. ábra**).

A limfocita aktiváció lépései mind Th1, mind Th2 sejtekben a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  megemelkedésével kezdődnek. Annak ellenére, hogy aktivációjuk ugyanolyan hatásokra következik be, a Th1 és Th2 sejtek eltérő citokineket termelnek. Mivel egyes citokinek génjeinek az expresszióját a kalcium beáramlás kinetikájának sajátosságai eltérő mértékben befolyásolják, a Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának különbségei nagyban hozzájárulhatnak az eltérő típusú citokinek termelődéséhez [12].

Fanger és mtsai. korábban leírták, hogy egér eredetű Th1 és Th2 limfociták eltérést mutatnak a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kinetikáját illetően [13]. Kimutatták, hogy a kalcium beáramlást

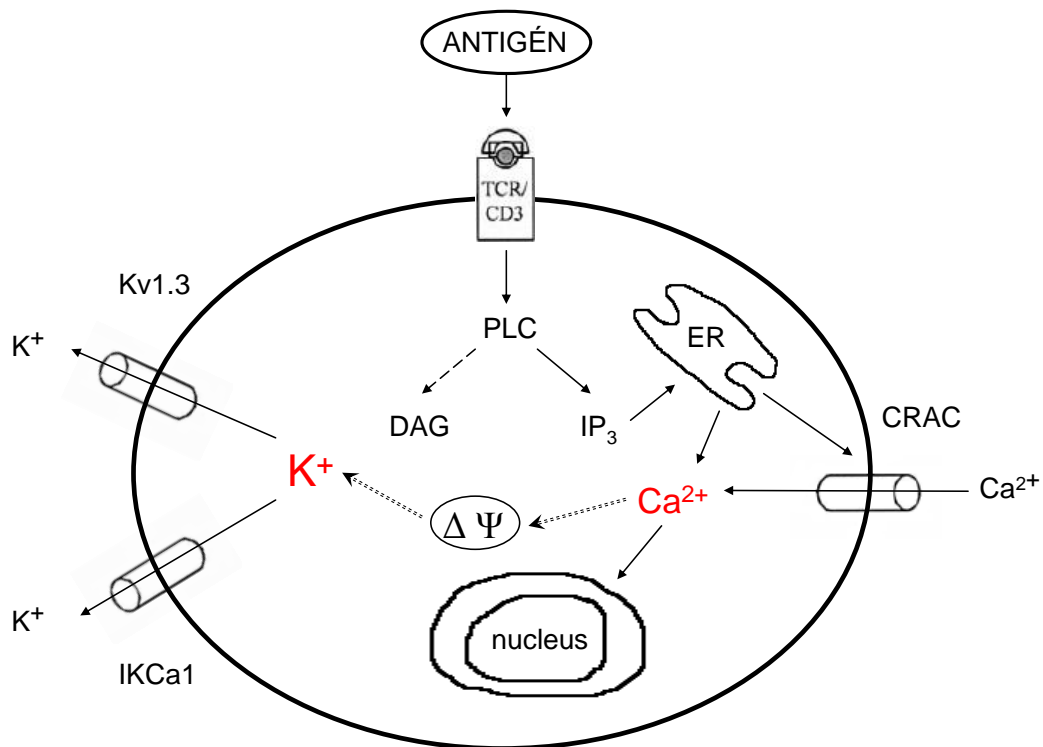
szabályozó mechanizmusok, mint például a limfociták kálium csatornáinak működése (ld. alább) különbözik a két sejttípusban: a kalciumdependens IKCa1 csatornák aktívabban működnek Th1 sejtekben. Leírták továbbá, hogy a Th2 sejtekben gyorsabban csökken a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , mint Th1 sejtekben. Arra a következtetésre jutottak, hogy a gyorsabb kalcium ürítés és a kisebb mértékű kalciumfüggő kálium kiáramlás együttesen felelősek a Th2 sejtekben tapasztalható alacsonyabb kalcium válaszáért. Felvetették, hogy a limfociták kalcium jelének kinetikáját szabályozó mechanizmusok feltehetőleg eltérőek Th1 és Th2 sejtekben. Vizsgálataik azonban nem szolgáltak további részletekkel a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelkedéséért és csökkenéséért felelős mechanizmusok specifikus szerepét illetően.

### 3.2. A LIMFOCITÁK KÁLIUM CSATORNÁINAK SZEREPE A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN

A kalcium jel fenntartásához szükséges, intra- és extracelluláris terek közötti elektorkémiai potenciálkülönbséget ( $\Delta \Psi$ ) a kálium ionok kiáramlása biztosítja. Ez a limfociták esetében alapvetően kétfajta kálium csatornán keresztül valósul meg: a feszültségfüggő Kv1.3 jelzésű [14] és a kalciumdependens IKCa1 jelzésű [15] csatornákon keresztül. A CRAC csatornákon keresztüli ionáram és a kálium csatornák működése közötti kapcsolat ezért érzékenyvé teszi a limfociták proliferációját a kálium csatornák aktivitásának farmakológiai befolyásolására, és specifikus immunmoduláció lehetőségét is felveti (**2. ábra**).

#### 3.2.1. A Kv1.3 csatorna biofizikai és biokémiai jellemzői

A feszültségfüggő kálium csatornák jelenlétét humán T sejteken először több mint két évtizede igazolták elektrofiziológiai módszerekkel [14]. Az akkor leírt csatornát n-típusú (normal) kálium csatornaként osztályozták. A csatorna génjének klónozása [16] lehetővé tette, hogy a csatornát a feszültségfüggő csatornák Shaker családjába sorolják (Kv1), és Kv1.3 jelzéssel kezdtek rá hivatkozni [17].



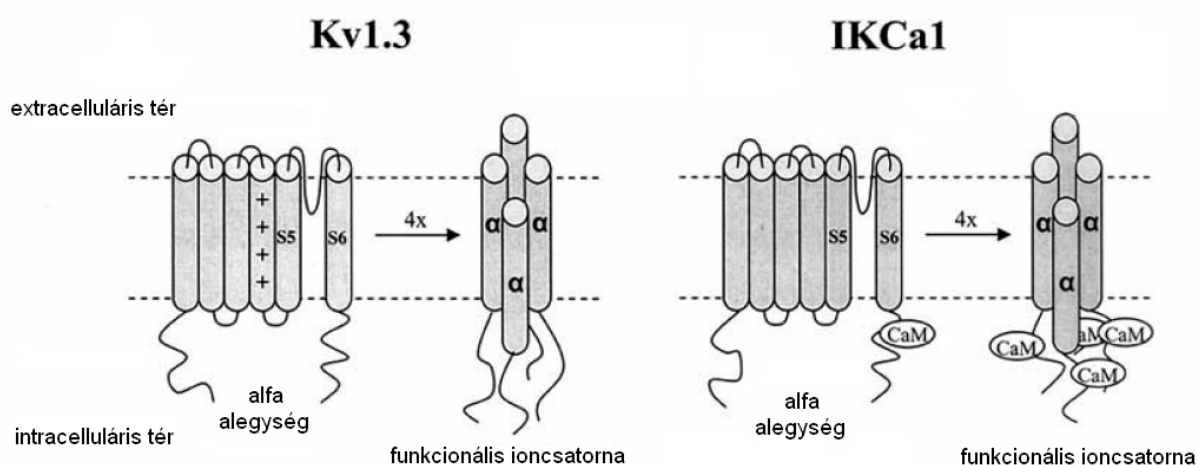
## 2. ábra: A limfociták kálium csatornáinak szerepe a limfocita aktiváció mechanizmusában

CRAC – calcium release activated calcium csatorna, DAG – diacil-glicerol,  $\Delta \Psi$  – elektrokémiai potenciálkülönbség, ER – endoplazmás retikulum, IP<sub>3</sub> – inozitol-1,4,5-triszfoszfát, PLC – foszfolipáz-C, TCR/CD3 – T sejt receptor/CD3 komplex

Ezt a csatornát négy azonos, pórusképző alfa alegység alkotja (**3. ábra**). Minden alegység hat transzmembrán  $\alpha$ -hélixből áll, melyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnék össze. Minden alegységből az ötödik és hatodik (S5 és S6) transzmembrán szakasz közötti extracelluláris hurok, valamint az S6 alegység alkotják a pórust, amelyen keresztül a kálium ionok átjutnak a sejtmembránon. A pórus fő strukturális elemei közül a legfontosabb a szelektivitásért felelős filter, ami a permeáció irányát figyelembe véve legkívül helyezkedik el. A filter kritikus helyein található aminosavak karbonil oxigénjei a vízmolekulát helyettesítve segítik elő a kálium ionok átjutását a csatorna legszűkebb pontján [18]. Kv1.3 csatornák esetében az alábbi ionszelektivitási sorrenddel számolhatunk:  $K^+ > Rb^+ \gg NH_4^+ \gg Cs^+ \gg Na^+$ . Összességében a Kv1.3 csatorna kb. ezerszer szelektívebb kálium ionokra nézve, mint a nátriumra.

Egy másik fontos strukturális elem az S4 hélix, ami pozitív töltésű aminosav-oldalláncokat tartalmaz és feszültség-szenzorként működik. A Kv1.3 csatornák aktivációs tartománya -50 és -60 mV között van, és a nyitási valószínűség meredeken nő a depolarizációval arányosan. A Kv1.3 biofizikai tulajdonságai tehát olyan membránpotenciál-tartományt határoznak meg, ahol a csatorna steady-state állapotban nyitva lehet [19]. Ez a tartomány átfedésben van a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljával, ami -50 és -70 mV közé esik. Ez a tény is kiemeli a Kv1.3 csatornák fontosságát a T sejtek membránpotenciáljának fenntartásában. Depolarizáció hatására a Kv1.3 csatornák gyorsan kinyílnak.

A kálium csatornák Shaker családjának tagjai két különböző inaktivációs mechanizmussal képesek inaktiválódni: az N-típusú gyors és az ún. „lassú” inaktivációval. Az előbbi mechanizmus nevét arról kapta, hogy a pórust egy N-terminálison elhelyezkedő citoplazmatikus „golyó” zárja el, míg az utóbbi annak a következménye, hogy a pórus extracelluláris oldalának közelében a filter összeszűkül vagy kollabál. A Kv1.3 csatornák esetében azonban az N-típusú inaktiváció hiányzik, és csak a „lassú” típusú működik, melynek időkonstansa kb. 200 ms [20]. Több tényezőről is bebizonyosodott, hogy befolyásolja a Kv1.3 inaktivációs kinetikáját, így a hőmérsékletéről [21], a tirozin-kinázok általi foszforilációról [22], a gátlószerekkel való kölcsönhatásokról [23], és az extracelluláris tér ionos összetételéről [24], valamint az extracelluláris pH-ról [25].



**3. ábra: A Kv1.3 és IKCa1 csatornák szerkezete [2]**

CaM – kalmodulin

### 3.2.2. Az IKCa1 csatorna biofizikai és biokémiai jellemzői

A humán T sejteken fellelhető IKCa1 csatornát a hKCa4 gén kódolja [26]. A csatorna felépítése hasonló a feszültségfüggő kálium csatornáéhoz (**3. ábra**): négy, nem kovalensen kötött alegységből áll, és minden alegység hat transzmembrán régióval rendelkezik. A pórus szerkezete is hasonló a Kv1.3 csatorna pórusához. Az ionok szelektivitási sorrendje a következő:  $K^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+$  [15]. Bár az ionáram befelé rektifikáló, a csatorna aktivációja nem feszültségfüggő. Az utóbbi tulajdonság összhangban áll azzal a ténnyel, hogy a feszültség-szenzorként működő S4 hélixnek megfelelő helyen kevesebb pozitív töltésű aminosav található [26].

Az IKCa1 csatornát a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  100 nM érték felé emelkedése aktiválja [15]. Ez azt jelenti, hogy ezek a csatornák nem működnek a sejtek nyugalmi állapotában, a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  változására azonban aktiválódnak. 1  $\mu$ M-os  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  már teljesen aktiválja a csatornákat. Több bizonyíték szól amellett, hogy az IKCa1 csatorna kalcium szenzora a kalmodulin (CaM) [27]. Érdekes módon a csatorna és a CaM közötti kölcsönhatáshoz nem szükséges kalcium jelenléte, ami arra utal, hogy a CaM permanensen a csatornához kötött. Minden alegységhez egy CaM molekula kötődik az S6 helikális szakaszon. Mivel ez a szakasz a pórus alkotásában is részt vesz, a CaM/IKCa1 csatorna komplexben a kalcium kötődése által létrehozott konformációváltozás direkt módon járulhat hozzá a csatorna nyílásához [27].

Az IKCa1 biofizikai tulajdonságai alátámasztják a feltételezést, mely szerint a T sejtekben ezek a csatornák egy fontos pozitív feedback mechanizmus elengedhetetlen részei, melyet a kalcium jel irányít. A CRAC csatornán keresztül kalcium beáramlás aktiválja az IKCa1 csatornát, és a megnövekedett kálium kiáramlás további kalcium ionok belépését segíti elő az extracelluláris térből.

### 3.3. A Kv1.3 ÉS IKCa1 CSATORNÁK GÁTLÓSZEREI

Kémiai szerkezetük alapján a Kv1.3 és IKCa1 csatornákat gátló molekulák három osztályba sorolhatók: szervetlen ionok, kismolekulájú inhibitorok, és peptid szerkezetű gátlószerek. Más ioncsatornához hasonlóan e két csatorna gátló peptidjeit is állatokból, elsősorban skorpió venomból izolálták. A kálium csatornát felismerő skorpiótoxinok

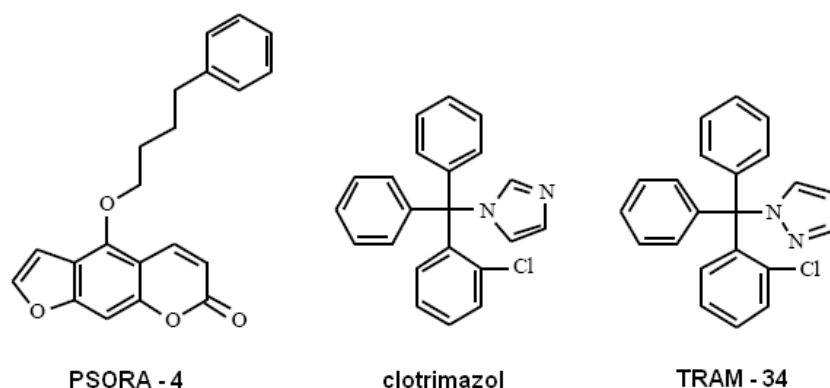
23-64 aminosavból állnak. Szerkezeti jellegzetességük a cisztein által stabilizált  $\alpha/\beta$  motívum, melyben diszulfid-hidak kötik össze kovalensen a toxin csatornával kapcsolatba kerülő felszínén elhelyezkedő antiparallel  $\beta$ -redőket a molekula ellentétes oldalán található  $\alpha$ -helikális szakasszal [28]. A skorpiótoxinok által kifejtett gátló mechanizmus igen egyszerű: a peptidek szorosan kötődnek a csatorna külső járatába, és elzárják az ionok elől a pórust.

A Kv1.3 csatorna leghatásosabb természetes eredetű gátlószereit a nano- és pikomoláros tartományba eső disszociációs konstansok ( $K_d$ ) jellemzik. Közéjük tartozik a charybdotoxin (CHTX, 0,5-1 nM), a noxiustoxin (NTX, 1 nM), a margatoxin (MGTX, 50 pM), a kaliotoxin (KTX, 650 pM), a *Pandinus imperator* toxinjai (Pi1, 11nM; Pi2, 44 pM; Pi3, 795 pM), a hongotoxin (HGTX, 86 pM), és a nemrég leírt anurotoxin (730 pM). Az egyik leghatásosabb és legtöbbet vizsgált toxin azonban nem skorpió eredetű, hanem egy tengeri anemónából, a *Stichodactyla helianthus*ból izolálták (ShK, 11 pM). Bár ennek szerkezete eltér a skorpiótoxinokétól, hatásmechanizmusa nagyon hasonló.

A peptid szerkezetű gátlószerek köréből az imént felsoroltak közül több az IKCa1 csatornát is képes gátolni. Természetesen egy-egy gátlószer esetében a kétfajta kálium csatorna iránti affinitás jelentősen eltérhet.

A peptid szerkezetű gátlószerek általánosan rossz orális biohasznosulása miatt a nagy affinitású és szelektivitású, kis molekulájú, nem peptid inhibitorok is a kutatás középpontjában állnak. Számos eltérő kémiai szerkezetű ilyen gátlószert azonosítottak. Ezek a molekulák általában kisebb felszínen és kevésbé specifikus módon lépnek kapcsolatba a csatornákkal, mint a peptid szerkezetű gátlószerek, minek következtében általánosságban véve azokénál kisebb az affinitásuk és szelektivitásuk. A klasszikus kis molekulájú gátlószer, a tetraetil-ammónium (TEA), több fajta kálium csatornát képes az extracelluláris oldal felől blokkolni. Affinitása kicsi, és gyors kinetikával gátolja a csatornákat. A kalcium csatorna gátlók közül a nifedipin, a diltiazem és a verapamil a limfociták kálium csatornáit is blokkolják kis affinitással és szelektivitással.

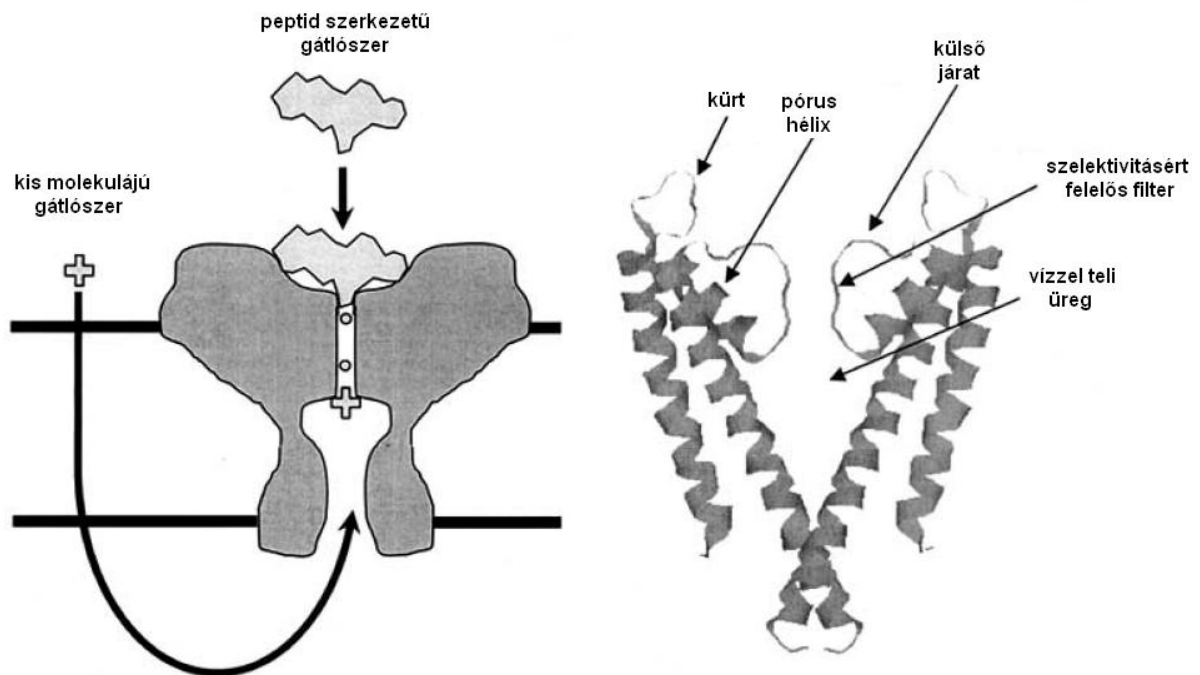
A Kv1.3 csatorna eddigi leghatásosabb kis molekulájú inhibitorát, a PSORA-4-et az 5-fenilalkoxi-pszoralének egy sorozatának a vizsgálata során fedezték fel (**4. ábra**). Rendkívüli hatásosságán kívül ( $K_d = 3$  nM) másik előnyös tulajdonsága, hogy patkányokon való alkalmazása során nem mutatatta akut toxicitás jeleit, még napi öt subcutan adag esetében sem [29].



**4. ábra: A limfocita kálium csatornák kis molekulájú gátlószereinek kémiai szerkezete [2]**

A gombaellenes clotrimazol hatékonyan gátolja a T sejtek IKCa1 csatornáit. A gombák citokróm P450 enzimeinek gátlása mellett azonban emberben is blokkolja ezeket az enzimeket, így terápiás hasznosíthatósága korlátozott [30]. Ezért olyan triarilmetán molekulákat kezdtek tervezni, amelyek imidazol gyűrűjét szubsztituálva elvesz a citokróm P450-et gátló hatás. E vegyületek közül a pirazol-szubsztituált triarilmetánt, a TRAM-34-et találták a humán IKCa1 csatornák leghatásosabb gátlószereinek ( $K_d = 20\text{--}25$  nM). A clotrimazol és más triarilmetán vegyületek (**4. ábra**), így a TRAM-34 is egy, az intracelluláris tér felől megközelíthető helyen fejtik ki hatásukat [31]. Ezek a molekulák egy olyan hidrofób zsebbe kötődnek, amit a csatorna vízzel teli üregének oldalláncai alkotnak. A nagy affinitású kötődés abból következik, hogy a ligand alakja az üreg falának komplementere [32].

Összefoglalva tehát a kálium csatornák gátlószerei – néhány kivételtől eltekintve – az alábbi közös tulajdonságokkal jellemezhetőek (**5. ábra**): a peptid szerkezetű gátlószerek általában a külső járathoz, míg a legtöbb kis molekulájú inhibitor a szelektivitásért felelős filter alá, a vízzel teli üregbe kötődik. A peptid toxinok nagy felületen érintkeznek a csatornákkal, és több helyen alakítanak ki kölcsönhatást, ami nagy affinitáshoz vezet. A kis molekulájú inhibitorok átjutnak a sejtmembránon, és az intracelluláris oldal felől tömítik el a szelektivitásért felelős filtert. Ebben jóval kisebb számú kölcsönhatásnak van szerepe, mint a peptid toxinok esetében, így e molekulák affinitása lényegesen alacsonyabb.



**5. ábra: A kálium csatornák gátlószereinek hatásmechanizmusa a kálium csatornák főbb strukturális elemeinek tükrében [18]**

A peptid szerkezetű gátlószerek a külső járatot eltömítve fejtik ki hatásukat, míg a kis molekulájú gátlószerek a sejtmembránon átjutva, az intracelluláris tér felől zárják el a szelektivitásért felelős filtert.

### 3.4. A GÁTLÓSZEREK POTENCIÁLIS TERÁPIÁS HASZNOSÍTHATÓSÁGA

Mivel kétfajta kálium csatorna is található a T sejtek plazmamembránján, egyéni szerepük elkülönítéséhez olyan gátlószerekre volt szükség, amelyek specifikusan gátolják a feszültségfüggő (Kv1.3), illetve a kalciumdependens (IKCa1) csatornát. A természetes eredetű toxinok egyik nagy hátránya, hogy – bár igen nagy mértékben szelektívek vagy a feszültségfüggő, vagy a kalciumdependens csatornákra – nem kizárólagosan specifikusak a Kv1.3 vagy az IKCa1 típusokra. Más, szintén a Kv1 családba tartozó, illetve az IKCa1-től eltérő kalciumfüggő kálium csatornát is képesek gátolni különböző, de számottevő mértékben. A pórusok szerkezetét alapul véve a közelmúltban szintetikus úton előállították e két csatornatípus abszolút specifikus inhibitorait. Az IKCa1 csatorna esetében ilyen módon jutottak a fentebb ismertetett TRAM-34 nevű molekulához. A Kv1.3 esetében az ShK toxin szerkezetét módosították: egy lizin (Lys22) molekulát cseréltek le egy rövidebb, pozitív töltésű, nem természetes

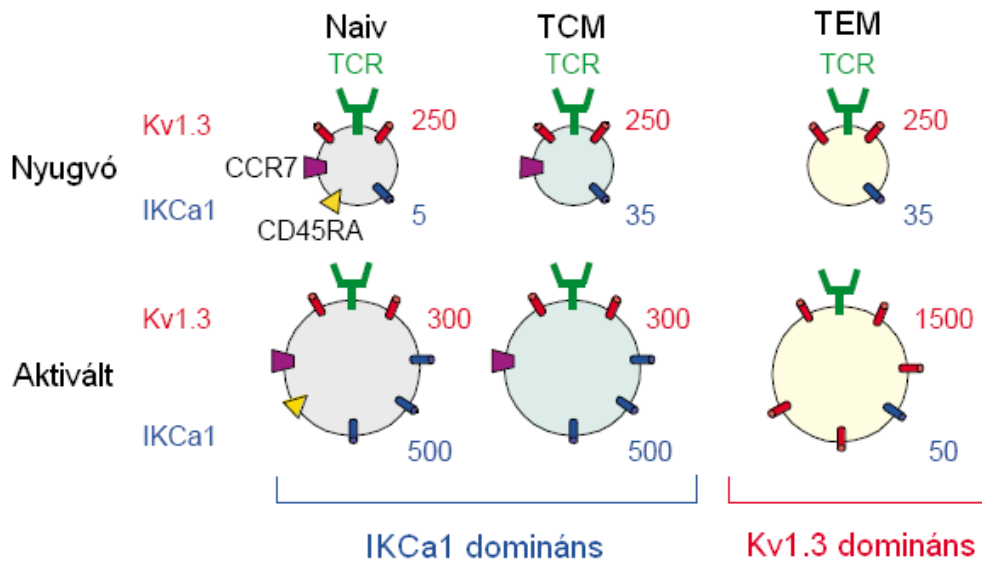


eredetű aminosavval, a diamino-propionsavval (ShK-Dap22), s ez óriási mértékben megnövelte a ligand specificitását a Kv1 család más tagjaival és az IKCa1 csatornával szemben [3].

Miért vált oly szükségessé a Kv1.3 csatorna inhibitorok szelektivitásának és affinitásának növelése? Erre a kérdésre az a felfedezés adott választ, amely leírta, hogy a T sejtek egyik alpopulációjának, a CCR7- CD45RA- effektor memória T sejteknek (TEM) a proliferációja elsősorban a Kv1.3 csatorna aktivitásától függ, illetve, hogy ez a limfocita alpopuláció fontos szerepet játszik az autoimmun kórképek patogenezisében [33].

A CCR7+ CD45RA+ naiv (tehát antigénnel még nem találkozott) és a differenciáció közbenső szakaszában lévő, az effektor állapot elérése előtti CCR7+ CD45RA- centrális memória T sejtekkel (TCM) szemben a TEM sejtek nem vándorolnak a lymphoid szervekbe, hogy ott APC-k aktiválják őket. Ezzel szemben azonnali effektor funkciót fejtenek ki a perifériás szervekben, nagy mennyiségű citokint (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) termelnek, és azonnali citotoxicitást mutatnak. Kiderült, hogy specifikus antigénnel történő aktiváció hatására a TEM sejtek megnövelik a Kv1.3 csatornák expresszióját (sejtenként 250-ről 1500 csatornára), míg az IKCa1 csatornák expressziója nem változik számottevően. Így a TEM sejtek Kv1.3<sup>high</sup> IKCa1<sup>low</sup> csatorna fenotípusúak lesznek [33]. Ezzel szemben a naiv és TCM sejtek az antigénstimulációra az IKCa1 csatornák expressziójának fokozásával válaszolnak (sejtenként 30-ről 500 csatornára), míg a Kv1.3 csatornák expressziója csak szerény mértékben nő. Ez az IKCa1 csatorna upreguláció legnagyobb valószínűség szerint transzkripciós szinten következik be, és gyorsan, akár a TCR ingerlését követő három órán belül lejátszódik. Ilyen módon e sejtek csatorna fenotípusa Kv1.3<sup>low</sup> IKCa1<sup>high</sup> lesz (**6. ábra**).

A Kv1.3 és IKCa1 csatornák arányában észlelhető különbség feltehetőleg hozzájárul a limfocitákban kialakuló kalcium jel amplitúdójának és alakjának variabilitásához [34]. A  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  megnőhet átmenetileg, oszcillálhat, és tartósan is emelkedett lehet. Azokban a limfocitákban, ahol az IKCa1 csatorna domináns, az ingerlés hatására létrejövő kalcium áram inkább oszcilláló jellegű. A kalcium jelek mintázatában látható különbségek, melyek az egyik vagy másik fajta kálium csatorna nagyobb arányából adódnak, fontos funkcionális következményekkel járhatnak, hiszen az antigénstimulációra adott választ erősen befolyásolja a kalcium jel természete [35].



**6. ábra: Az egyes limfocita altípusok sejtfelszínén megtalálható Kv1.3 és IKCa1 csatornák mennyisége [33 alapján módosítva]**

TCM – centrális memória T sejt , TCR – T sejt receptor, TEM – effektor memória T sejt

A Kv1.3 csatorna gátlásának terápiás hatásait elsősorban sclerosis multiplexben vizsgálták, ezért az ezzel kapcsolatos irodalmi adatokat a sclerosis multiplex jellegzetességeit bemutató részben (6.5. fejezet) ismertetem.

Az IKCa1 csatorna gátlása a naiv és TCM sejtek esetében lehet hatásos. Ezek a sejtek részt vesznek a transzplantált szervek ellen induló akut immunreakcióban és a graft-versus-host reakció patomechanizmusában is. Az IKCa1 csatorna inhibitorai tehát a klinikumban elsősorban ezen a területen kerülhetnének alkalmazásra. Bebizonyosodott, hogy a széles körben használt immunszuppresszáns, a cyclosporin A a T sejtek proliferációjának gátlásában szinergista módon viselkedik a TRAM-34-el [36]. Így ezek kombinálásával csökkenteni lehetne a cyclosporin A terápiában jelentkező mellékhatások súlyosságát. Ezen túlmenően a TRAM-34 mellett más kis molekulájú IKCa1 csatornagátlók is Fázis II. klinikai vizsgálatok részét képezik a sarlósejtes anémia terápiájában [37].

### 3.5. A T LIMFOCITÁK JELLEMZŐI ÚJSZÜLÖTTKORBAN

Az újszülöttek immunválaszát magasabb fokú plaszticitás jellemzi a felnőttekével összehasonlítva. A fertőző ágensek ellen szükséges protektív immunválaszok kifejlődése mellett azonban az újszülött olyan új környezeti antigének széles spektrumával is találkozik, amelyek ellen nem szükséges immunológiai válaszreakciót indítani, ehelyett a megfelelő toleranciának kell kialakulnia. Ebben az életszakaszban kell továbbá kialakítani a saját perifériás szöveti antigének elleni immuntoleranciát az autoimmun reakciók elkerülésének érdekében. Ennek megfelelően a T limfociták funkcióinak a felnőttétől eltérőknek kell lenniük, hogy meg tudjanak felelni a korai életszakasz kihívásainak.

Az újszülöttek T limfocitáinak csökkent funkciója kétségtelenül klinikailag és kísérletes körülmények között is gyakran tapasztalt jelenség. Ezt a csökkent működést a citokinek alacsonyabb szintű termelése jellemzi a felnőtt T sejtekhez képest. Különösen a pro-inflammatorikus citokinek szintje (pl. IFN- $\gamma$ ) alacsonyabb újszülöttekben, amiért számos tényező lehet felelős. Újszülöttek limfocitáiban alacsonyabb az IL-2 és IL-4 citokinek termelése is felnőtt limfocitákkal összehasonlítva. Ez a jelenség részben magyarázhatja azt a tényt, hogy hematológiai megbetegedésekben humán köldökzsínórvér (HUCB) transzplantációja esetén jóval kisebb a graft-versus-host reakció (GVHD) előfordulása, mint csontvelő transzplantációjakor [38, 39].

Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy az újszülött T sejtek csak gyengén reagálnak fiziológiás stimulusra, például APC-k általi aktivációra a TCR/CD3 komplexen keresztül. Mindazonáltal képesek felnőtt szintű IL-2 termelésére és proliferációra a TCR/CD3 komplex kikerülése esetén, TCR-független hatásokra, így valószínűleg nincs intrinsic csökkenés az újszülött T sejtek ezen képességében [40]. Továbbá az újszülött T sejtek képesek felnőtt mennyiségű citokin termelésére egyes TCR-dependens stimulusok hatására is, amennyiben fokozzuk a Th1 sejtfunkciót elősegítő kostimuláló faktorok számát [41]. Felnőtt APC-k jelenlétében az újszülött T sejtek proliferációja szintén eléri a felnőtt szintet [42]. Következésképpen az újszülött T sejteknek fokozott a kostimuláló faktorok iránti igénye a felnőtt T sejtekhez képest. Amint a megfelelő kostimuláció biztosított, az újszülött T sejtek felnőtt szinten kezdenek funkcionálni. Ez, legalábbis részben, az újszülött T sejtek felszínén kifejeződő TCR/CD3 komplexek

számának csökkenésére vezethető vissza, ami valószínűleg kisebb intenzitású szignál transzdukciót eredményez. Továbbá, celluláris adhéziós molekulák, többek között a leukocita funkcionális antigén-1 (LFA-1) és a CD2 kisebb mennyiségben expresszálódnak az újszülött T sejtek felszínén, hozzájárulva ezzel a kisebb mértékű aktivációhoz [43].

Újszülöttekben a kisebb mértékű citokin termelés részben a korábbi antigén expozíció hiányának, és így a legtöbb sejt éretlenségének tudható be. A sejtek döntő többsége naiv (CD45RA+) limfocita, szemben a felnőttekkel, ahol a memória (CD45RO+) sejtek dominálnak [39]. Továbbá egy érdekes vizsgálat során Hassan és mtsai. felvetették, hogy a köldökzsinórvérből illetve felnőttől nyert perifériás vérből izolált CD45RA+ populációk citokintermelése különbözik, mivel a köldökzsinórvérből származó, tisztított CD4+ CD45RA+ sejtek stimuláló hatásra nem termelnek IL-2-t, míg a tisztított felnőtt CD4+ CD45RA+ sejtek igen, tehát felmerül, hogy a köldökzsinórvérből nyert naiv CD45RA+ sejtek éretlenebbek a felnőtt sejteknél [44].

### 3.6. A T LIMFOCITÁK JELLEMZŐI TERHESSÉG SORÁN ÉS PREECLAMPSIÁBAN

Az egészséges terhesség biztosítása érdekében az anyai immunrendszernek alkalmazkodnia kell azokhoz az új élettani szükségletekhez, amelyeket a fejlődő magzat jelenléte támaszt. Mivel a magzat félig idegen eredetű, hiszen apai antigéneket is prezentál, az anyai szervezetre nézve immunológiai szempontból félig allograft. Következésképpen egyfajta immuntoleranciának kell kialakulnia a foetus immunológiai rejekciójának elkerülése érdekében. Az egészséges terhesség során, 40 héten keresztül az anyai immunrendszer kiterjeszti a „saját”-ról alkotott fogalmát a magzat idegen antigénjeire is. Ezen tolerancia károsodása kóros immunválasz kifejlődéséhez vezethet, és így döntő szerepet játszik a terhesség során fellépő szövődmények, többek között a preeclampsia (PE) kialakulásában [45].

Ezt a rendellenességet hipertenzió, proteinuria, ödéma és endotél diszfunkció jellemzi, és általában a terhesség harmadik trimeszterében alakul ki, bár korábban is megjelenhet. Annak ellenére, hogy a PE gyakorisága 5-8% világszerte, a pontos ok és a mechanizmusok, amelyek az immunológiai eltérések kialakulásához vezetnek, még

tisztázásra várnak. A PE évente megközelítőleg 70 000 anyai halálozásért felelős világszerte [46]. A HELLP szindróma (amely a hemolysis, emelkedett májenzimek, alacsony thrombocytaszám rövidítése) és az eclampsia ugyanezen eltérés további megnyilvánulási formái. Bár ezek az állapotok általában számos egyéb tünettel társulnak (úgy mint fejfájás, hasi fájdalom, hányinger, hányás, látászavarok, légszomj, szorongás, zavartság, rohamok), ezek a manifesztációk klinikailag nem feltétlenül jelentenek súlyosabb állapotot a preeclamsiánál. Az anyai szisztémás gyulladással szemben a szisztémás vasoconstrictio jelei is megfigyelhetők ezekben a terhességre jellemző kórképekben [47].

A terhesség-specifikus immuntolerancia kialakulásának számos lépését írták le az utóbbi időben. Kezdetben az anyai és magzati sejtek között kialakuló kapcsolat helyi szinten zajlik és a deciduára korlátozódik, majd a második trimeszter során az anya teljes szervezetére kiterjed. Mind a veleszületett és szerzett, mind pedig a celluláris és humorális immunrendszer részt vesz ezekben a folyamatokban.

Sok éven keresztül azt feltételezték, hogy az egészséges terhesség során az anti-inflammatorikus, Th2-típusú immunitás felé való eltolódás figyelhető meg. Mára azonban bebizonyították, hogy egyes Th1 specifikus citokinek szintje nem csökken, hanem megemelkedik egészséges terhesség során a nem terhes állapothoz képest. A jelenlegi eredmények alapján a terhesség egyszerre pro-inflammatorikus és anti-inflammatorikus állapot, a gestáció stádiumától függően. A terhesség durván három különálló immunológiai fázisra osztható. A beágyazódás és az első trimeszter erős inflammatorikus választ igényel a méhnyálkahártya megfelelő átalakulásához és a beágyazódást követően a sejtörmelék eltakarításához. Az első trimeszterben tehát a gyulladással szemben dominálnak. A terhesség második immunológiai fázisa a második és harmadik trimesztert jelenti. Ebben a szakaszban következik be a magzati növekedés, fejlődés, amikor anti-inflammatorikus állapot, Th2 túlsúly alakul ki. Végül a szülés alkotja a legrövidebb, harmadik immunológiai fázist, amikor ismét a pro-inflammatorikus folyamatok kerülnek túlsúlyba, megindítva a méhkontrakciókat [48, 49]. Egészséges várandósságban ezen felül a Th17 és regulátoros T sejtek (Treg) aránya is megváltozik: nem terhes állapothoz képest nő a Treg sejtek, és csökken a Th17 sejtek perifériás aránya [50].

Patológias állapotokban, amikor az immuntolerancia nem alakul ki megfelelően, így PE-ban is, a második és harmadik trimeszter alatt várható anti-inflammatorikus állapot elmarad, így a pro-inflammatorikus citokinek kerülnek túlsúlyba, ahogy azt számos korábbi vizsgálati eredmény igazolja [51-53]. Emellett a Th17 és Treg sejtek egészséges terhességre jellemző arányváltozása sem alakul ki, egészséges terhességhez képest emelkedett Th17 és csökkent Treg arány jelenik meg [50, 54, 55].

### 3.7. A T LIMFOCITÁK JELLEMZŐI SCLEROSIS MULTIPLEXBEN

A sclerosis multiplex (SM) a központi idegrendszer myelin állományát pusztító kórkép, amelynek hátterében autoimmun folyamat áll. A betegségre jellemző, hogy fiatal felnőtteket érint, a diagnózis időpontja leggyakrabban a 25. és 50. életév közé esik. A kórkép sokféle tünetben nyilvánulhat meg, úgymint fáradékonyság, ízületi és izomfájdalmak, az emlékezőképesség zavara, vagy akár bénulás. Súlyos tünetei miatt nagymértékben rontja az életminőséget. Hazánkban kb. 8000 beteget tartanak nyilván, és évente kb. 300 új beteget diagnosztizálnak [56]. A klinikai tünetek alapján biztos diagnózist MR-vizsgálat, valamint liquorvizsgálat nyújthat. A kórkép terápiája alapvetően kétféle lehet: tüneti kezelés fájdalomcsillapítókkal és izomlazítókkal, valamint immunmoduláns terápia, amelynek célja a kóros immunválasz erősségének csökkentése.

A T limfociták döntő szerepet játszanak a SM pathogenezisében. Szabályozzák a központi idegrendszerben zajló autoimmun gyulladási folyamatot, amely a myelinhüvely és az axonok károsodásához vezet. A T limfocitáknak azonban csak egy kisebb hányada myelinspecifikus autoreaktív sejt. Ezen, a központi idegrendszerben megtalálható sejtek demyelinizáló hatása mellett a perifériás limfociták aktivációja szintén nagyban hozzájárul a betegség pathogeneziséhez és súlyosbodásához [57]. SM-ben a myelinre specifikus T sejtek funkcionális szempontból terminálisan differenciált TEM sejtek, melyek a Kv1.3 expressziójának növelésével Kv1.3<sup>high</sup> IKCa1<sup>low</sup> fenotípust vesznek fel myelin antigénnel történő *in vitro* stimuláció hatására [58]. Az alábbi kísérletek szintén a TEM sejtek kóros szerepe és ioncsatorna expressziója közötti kapcsolatra hívják fel a figyelmet. SM betegek T sejtjeit irreleváns antigénnel (pl. insulinnal, ovalbuminnal) stimulálva nem tapasztalták a Kv1.3<sup>high</sup> IKCa1<sup>low</sup> fenotípus

megjelenését. Rövid ideig tartó myelin antigénnel történő aktiválás (háromszori stimuláció) SM betegek T sejtjein szignifikánsan nagyobb Kv1.3 csatornaszám-növekedéshez vezetett, mint ugyanilyen módon aktivált egészséges kontroll személyek T sejtjeinél. Kontroll sejtek ismételt stimulációja (7-10 alkalommal) azonban már a Kv1.3<sup>high</sup> IKCa1<sup>low</sup> TEM fenotípus megjelenéséhez vezetett. Hasonló fenotípusú T sejt altípus figyelhető meg kísérleti autoimmun encephalomyelitisben (EAE), a SM rágcsló modelljében, melynek kialakulását krónikusan aktivált myelinre specifikus T sejtek okozzák [59].

SM-ben a Kv1.3-ra specifikus gátlószerek terápiás potenciálja tehát azért jelentős, mert szelektív módon a TEM sejtek proliferációját képesek gátolni, míg a naiv és TCM sejtek az IKCa1 expressziójának növelésével kivédik a Kv1.3 gátlása okozta proliferációs akadályozást. A limfociták kálium csatornáinak specifikus gátlószerei elméletileg tehát teljesítik az ideális immunszuppresszív szerekekkel szemben támasztott követelményt, hiszen szelektív módon csupán azoknak a sejteknek a proliferációját gátolják, melyek az autoimmun reakciót közvetítik, míg a többi, normális immunválaszhoz szükséges T sejt működését nem befolyásolják.

Ezeket az *in vitro* eredményeket extenzív *in vivo* patkánykísérletek is igazolják. Beeton és mtsai. kimutatták, hogy az EAE tünetei szignifikánsan javultak szelektív Kv1.3 gátlók hatására, továbbá az EAE adaptív átvitele egészséges állatokra megakadályozható volt az aktivált T sejtek *in vitro* Kv1.3 inhibitoros kezelésével [59]. Ezek az eredmények, valamint az a tény, hogy a szelektív Kv1.3 csatornagátlóknak elenyésző a toxicitása [59], nagy reményt ébresztenek klinikailag is alkalmazható szelektív immunszuppresszánsként való felhasználásukra.

### 3.8. A T LIMFOCITÁK JELLEMZŐI 1-ES TÍPUSÚ DIABETESBEN

Az autoimmun eredetű 1-es típusú, vagy más néven inzulin dependens diabetes mellitus (T1DM, IDDM) kialakulásában a pancreas  $\beta$  sejtjein található autoantigéneknek, dendritikus sejteknek, makrofágoknak, B és T limfocitáknak van szerepe. A T1DM az összes diabeteses eset mintegy 7-10 %-át teszi ki. Prevalenciája 0,3-0,5 %, hazánkban évente kb. 1500 új beteget diagnosztizálnak [60]. A betegség általában gyermekkorban, leggyakrabban a pubertás körül alakul ki, de előfordulhat bármely életkorban. A  $\beta$  sejt

autoantigének közül a legjobban a glutaminsav-dekarboxiláz (GAD) ismert. Ez az enzim felelős a gátló hatású neurotranszmitter, a gamma-amino-vajsav (GABA) szintéziséért. A GAD főként mikrovezikulumokban fordul elő a  $\beta$  sejtekben. Számos más szövetben, így például a herében, ovariumban, thymusban is megtalálható. Két eltérő formáját, a GAD67-et és a GAD65-öt különítik el, melyeket eltérő gének kódolnak. Aminosav szekvenciájuk kb. 70%-ban azonos. A humán szigetsejtek elsősorban GAD65-öt expresszálnak. Non obese diabetic (NOD) egereket vizsgálva, ami a T1DM egyik legjobb állatmodellje, arra a megállapításra jutottak, hogy az állatokat tisztított GAD-dal immunizálva nő a GAD-reaktív T sejtek iránti tolerancia, és az egyéb  $\beta$  sejt antigénnel szembeni T sejt válasz is gátlás alá kerül, így nem alakul ki insulitis és diabetes [61, 62]. A GAD szerepe a T1DM kialakulásában egyelőre nem teljesen tisztázott, de több kísérleti eredmény is arra utal, hogy a GAD a T1DM kialakulását triggerelő autoantigénként jelenik meg az autoimmun reakció kialakulásakor [63]. A GAD ellen képződő autoantitestet (GADA) a klinikai gyakorlatban is alkalmazzák a T1DM-ben kialakuló autoimmun reakció intenzitásának laboratóriumi meghatározására (referencia értéke: 1,5 U/ml alatt). Egy másik kézenfekvő autoantigén maga az inzulin molekula. Anti-inzulin autoantitesteket (IAA) a frissen diagnosztizált T1DM betegek több mint 59%-ában mutattak ki [64]. Az IAA patogén szerepének pontosabb megértéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek. A dendritikus sejtek és a makrofágok szűrik be először a pancreas szigeteit a pathogenezis során. A makrofágoknak alapvető szerepük van a  $\beta$  sejt ellenes citotoxikus T sejtek fejlődésében és aktivációjában. A T sejtek makrofágmentes környezetben nem képesek citotoxikus T sejtekké differenciálódni, sem a pancreas  $\beta$  sejtjeit károsítani [65]. Ha azonban ezeket a sejteket olyan környezetbe helyezték át, ahol jelen voltak a makrofágok, visszanyerték  $\beta$  sejt pusztító képességüket. Makrofágok hiányában az immunválasz egyensúlya a Th2 irányba tolódott el, mivel csökkent a makrofágok által termelt IL-12 citokin szintje. Az IL-12-nek jelentős szerepe van a Th1 sejtek aktiválásában. Ezek a sejtek IL-2-t és IFN- $\gamma$ -t termelnek, amelyek hozzájárulnak a CD8 sejtek maximális aktivációjához. A T sejtek aktivitására gyakorolt hatásukon kívül a makrofágok által termelt citokinek (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) és oxigén-szabadgyökök direkt módon is károsítják a  $\beta$  sejteket. A szigetsejteknek nagyon alacsony a szabadgyök



kötő képessége, ezért a szuperoxid anion és a hidrogén-peroxid jelenléte különösen káros rájuk nézve [66, 67].

A makrofágok és T sejtek által termelt citokinek Th1 vagy Th2 sejtes, illetve citotoxikus effektor vagy szuppresszor sejtes dominancia felé irányíthatják az immunválaszt. Az aktivált makrofágok és T sejtek, valamint az általuk termelt citokinek szinergista módon pusztítják a  $\beta$  sejteket, ami T1DM kialakulásához vezet. A NOD egérmodellben egyértelművé vált, hogy a T sejteknek kritikus a szerepük az autoimmun diabetes kialakulásában. NOD egerek anti-CD3 kezelése megakadályozza a diabetes kialakulását. A citotoxikus CD8 sejtek a CD4 sejtek segítségével károsítják a  $\beta$  sejteket [68], és végső effektoroként vesznek részt a  $\beta$  sejtek destrukciójában. Mind a CD4, mind a CD8 limfociták termelnek olyan proinflammatorikus citokineket (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), amelyek fokozzák a Fas expresszióját a szigetsejteken. Így a CD8 sejtek citotoxikus perforin termelő hatása mellett a  $\beta$  sejt károsítás egy másik módja is létrejöhet, amikor a Fas ligandot expresszáló Th1 és CD8 T sejtek indukálják a  $\beta$  sejtek apoptózisát.

A T sejtek által termelt citokineknek szintén fontos szerepük van a T1DM patomechanizmusában. Általánosságban véve a Th1 citokinek (IL-2, IFN- $\gamma$ ) a betegség kialakulását segítik, míg a Th2 citokinek (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) inkább akadályozzák. A citokinek szerepe azonban ennél összetettebb. NOD egereket IL-4 vagy IL-10 citokinekkal szisztémásan kezelve például megelőzhető a diabetes kialakulása, az IL-10 lokális expressziója a szigetsejteken azonban felgyorsítja a betegség kialakulását [69, 70].

#### 4. CÉLKITŰZÉS

Vizsgálataink során célunk volt, hogy kinetikus áramlási citométeres módszerünket alkalmazva jellemezzük a Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozásában fennálló különbségeket. Célul tűztük ki, hogy gátlószerek segítségével vizsgáljuk az ER kalcium ürítésének, a CRAC csatornáknak, valamint az MCU, a SERCA és a PMCA transzport mechanizmusoknak a szerepét a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  szabályozásában a limfocita aktiváció korai szakasza (első 10 perce) során Th1 és Th2 limfocitákban.

Ezen túlmenően célul tűztük ki, hogy jellemezzük az aktiváció által kiváltott kalcium beáramlás kinetikáját a főbb limfocita alcsoportokban (így a Th1, Th2, CD4, CD8 sejtekben) újszülöttekben, egészséges várandósokban, preeclampszában, sclerosis multiplexben, valamint 1-es típusú diabetesben, egészséges, nem terhes felnőttekhez hasonlítva. Célunk volt továbbá leírni azokat a változásokat, melyeket a Kv1.3 illetve IKCa1 limfocita kálium csatornák szelektív gátlása hoz létre a limfocita aktiváció kinetikájában.

## 5. ALANYOK ÉS MÓDSZER

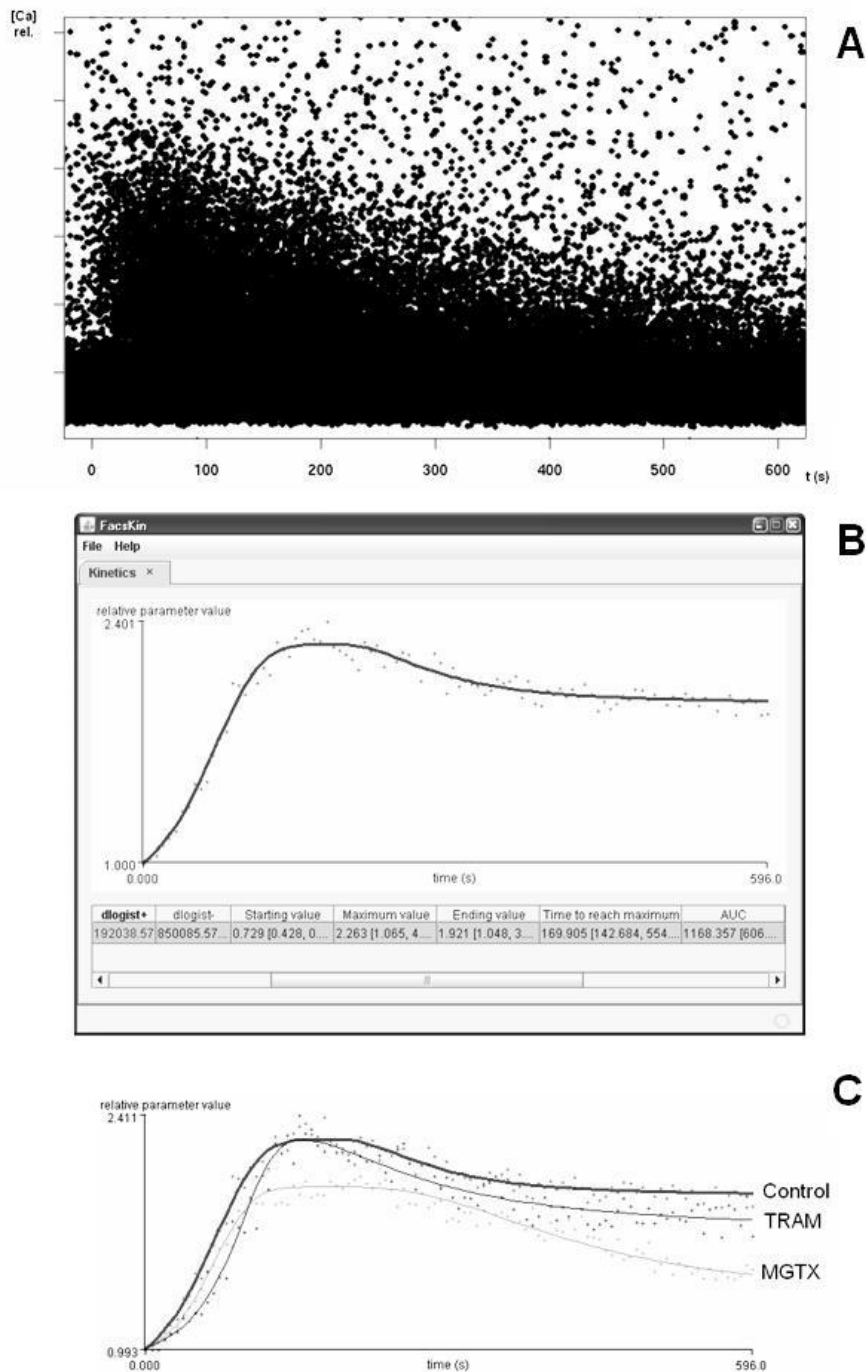
### 5.1. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA A LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ RÖVIDTÁVÚ VIZSGÁLATÁRA

Egészen a közelmúltig főként ún. single-cell technikákat (pl. patch clamp, fluoreszcens mikroszkópia) alkalmaztak a limfocita aktiváció folyamatának a vizsgálatára, és nem állt rendelkezésre nagy áteresztőképességű módszer a limfocita aktiváció kinetikájának tanulmányozására egyidejűleg több sejttípusban. A single-cell technikák korlátozó tényezője az, hogy nem alkalmasak a folyamat komplex sejtes környezetben történő jellemzésére, ezáltal figyelmen kívül hagyva a különböző immunsejt altípusok egymás közti interakcióját. Ezért fejlesztettünk ki egy olyan új megközelítést, amely lehetővé teszi a különböző limfocita alpopulációk aktivációjának szimultán vizsgálatát, egyazon mérés során.

Újjonnan fejlesztett módszerünk előnye az ún. single-cell technikákhoz képest, hogy azáltal, hogy egyszerre képes több sejttípust vizsgálni egy adott mintában, a különböző immunsejt altípusok egymás közti interakciójának esetleges módosító hatása nem vesz el a mérések során. A limfocita aktiváció során az egyes sejtek által termelt jeltovábbító molekulák (pl. citokinek, kemokinek, stb.) befolyásolják ugyanis a többi sejt működését is. A sejtek aktivációja tehát nem csupán egyetlen sejt működésére, hanem közvetve a mintában található többi sejt funkciójára is hatással van. Így egyfajta hálózatként is szemlélhetjük a limfocita altípusokat, amelyek kapcsolatban állnak az őket körülvevő más sejttípusokkal is. Módszerünk előnye tehát, hogy a vizsgálat során fennmaradnak a fiziológias sejt-sejt kölcsönhatások, melyek magukat a mérési eredményeket is befolyásolhatják.

A mérések során nyert adatokat a laboratóriumunkban fejlesztett, FacsKin ([www.facskin.com](http://www.facskin.com)) elnevezésű számítógépes program segítségével értékeltük (**7. ábra**). Ennek lényege, hogy a mérés során ún. dot-plotban ábrázolódó adathalmazból (ahol minden pont egy-egy sejtnek felel meg), mely önmagában nehezen értékelhető és összehasonlítható, a program olyan görbét számít, melynek paraméterei azután a többi görbével számszerűen is összevethetőek, így lehetőség nyílik az adatok kvantitatív vizsgálatára. Ehhez a művelethez a kulcslépés egy ún. kettős logaritmikus („dlogist+”)

függvény illesztése minden egyes mérésre, egy továbbfejlesztett algoritmus alapján [77].



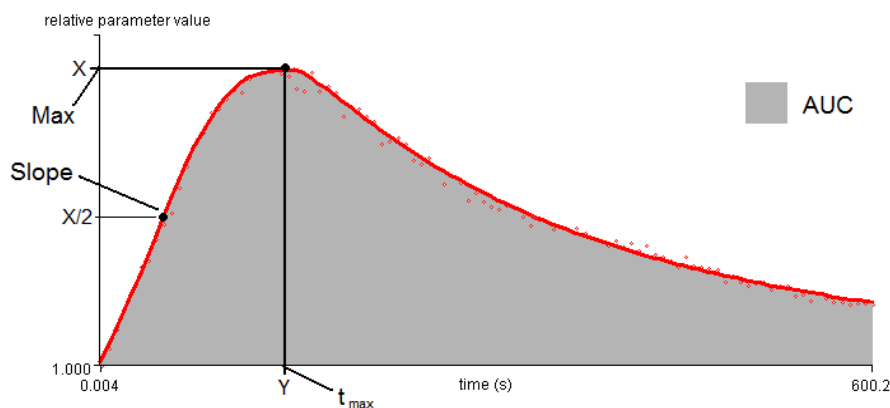
**7. ábra: A kinetikus áramlási citométeres mérések értékeléséhez használt, FacsKin elnevezésű számítógépes program**

A: a kinetikus mérések során kapott ún. „dot-plot”. [Ca] rel – a kalciumkötő festékek (a Fluo-3 és Fura-Red hányadosa) relatív fluoreszcenciája, t (s) – az eltelt idő másodpercben. B: a FacsKin program ablaka a számított „dlogist+” függvénnyel és a hozzá tartozó paraméter értékekkel. A „relative parameter value” megjelölés a

kalciumkötő festékek (a Fluo-3 és Fura-Red hányadosa) relatív fluoreszcenciájára utal. C: a kontroll, valamint a triarilmetánnal (TRAM) és margatoxinnal (MGTX) kezelt minták kalcium beáramlási kinetikájának kiszámított „dlogist+” függvényei. A gátlószerek hatása egyértelműen látható a görbe alatti területek csökkenéséből.

A limfocita aktiváció mértéke szoros összefüggésben áll a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  változásával. A dolgozatban ismertetett méréseink során ezért olyan fluoreszcens festékekkel jelöltük a sejteket, melyeknek intenzitása a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  függvényében változik. A limfocita aktiváció során a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  először megemelkedik, majd egy csúcserőket elérve fokozatosan csökken. Ezt a folyamatot legjobban a kettős logaritmusos függvény („dlogist+”) írja le. Ez a függvény olyan mérések jellemzésére használható, melyeknél az intenzitás az idő előrehaladtával növekszik, majd csökken.

A FacsKin program a függvény 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), valamint a görbe alatti terület értékét (AUC). Ezek a paraméterek a limfociták kalcium beáramlási kinetikájának különféle jellemzőit írják le (**8. ábra**). Az AUC érték a kalcium válasz nagyságát írja le. Egy egysége egyenlő az egy másodpercre eső egy relatív intenzitás értékkel. A relatív intenzitás érték megegyezik az aktuális intenzitás érték és a nulla másodpercben mért intenzitás érték hányadosával. Az AUC értékek arányosak a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  szintjével, melyek pedig a limfocita aktiváció szintjével állnak arányban [2].



**8. ábra: A kettős logaritmusos függvény kiszámított paramétereit**

AUC – görbe alatti terület, Max – a kalcium beáramlás legnagyobb értéke (X), Slope – a görbe meredeksége a Max érték felénél (X/2),  $t_{max}$  – a Max érték elérésének ideje (Y)

## 5.2. A VIZSGÁLATOK ALANYAI

A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálatunkhoz 10 egészséges önkéntestől vettünk perifériás vérmintát (5 nőtől és 5 férfitől, életkor: 24 [23–25] év (medián [tartomány])).

Az újszülöttek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatunkhoz 9 egészséges felnőttől vettünk perifériás vérmintát, és 9 érett, egészséges újszülöttől gyűjtöttünk köldökzsinórvért közvetlenül per vias naturales szülés után. A vizsgálat résztvevőinek adatai az **1. táblázatban** szerepelnek.

### 1. táblázat: Az újszülöttek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatunk résztvevői

Adatok: medián [tartomány]

	<b>Felnőtt n = 9</b>	<b>Újszülött n = 9</b>
Fiú/lány	4/5	5/4
Életkor (év)	27 [24 – 52]	-
Gesztációs kor (hét)	-	40 [38 – 41]
Születési súly (g)	-	3450 [3050 – 3900]

Az egészséges várandósok és PE-s betegek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatunkhoz 9 egészséges nem várandós asszonytól, 9 egészséges várandóstól, valamint 9 PE-s betegől vettünk perifériás vérmintát. A fertilis, nem várandós nők esetében a vérvétel a menstruációs ciklus luteális fázisában történt. A vizsgálat résztvevőinek adatai a **2. táblázatban** szerepelnek. A PE-s betegek a kórkép klinikailag enyhe formáját mutatták. A PE diagnózisát nemzetközi standard kritériumok alapján állították fel [78].

SM-ben végzett vizsgálatainkhoz 10 egészséges önkéntestől, valamint 11 olyan SM-ben szenvedő betegől vettünk perifériás vérmintát, akik a kórkép relapszáló-remittáló formáját mutatták és csupán tüneti kezelésben részesültek, immunmoduláns terápiát azonban nem kaptak. A vizsgálatban részt vett továbbá 6 olyan, relapszáló-remittáló SM-ben szenvedő beteg, aki átlagos dózisu IFN béta kezelésben részesül (vagy IFN béta-1a, heti 30 µg im. injekció formájában (Avonex®), vagy IFN béta-1a, heti

háromszori 44 µg sc. injekció formájában (Rebif®), vagy IFN béta-1b, másnapenkénti 250 µg sc. injekció formájában (Betaferon®).

## 2. táblázat: Az egészséges várandósok és preeclampsias betegek limfocitáinak aktivációs tulajdonságait jellemző vizsgálatunk résztvevői

Adatok: medián [kvartilis]. PE – preeclampsia

	<b>Fertilis, nem várandós nők n = 9</b>	<b>Egészséges várandósok n = 9</b>	<b>Preeclampsias várandósok n = 9</b>
Életkor (év)	30 [25-33]	35,5 [34-37]	32 [27-35]
Gesztációs kor (hét)	-	35 [34-37]	36 [30-38]
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	102 [90-115]	109 [100-110]	150 [145-160]
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	70 [60-80]	66 [60-70]	90 [90-100]
Proteinuria (g/24 óra)	-	-	1,4 [0,85-2,9]
PE kezdete (gestációs hét)			36 [28-37]

A vizsgálat résztvevőinek adatai a **3. táblázatban** láthatóak. A SM diagnózisát nemzetközi standard kritériumok alapján állították fel [79], és vérévételkor mindannyian remisszióban voltak. A mintagyűjtés előtti legutolsó IFN béta kezelés óta legalább 24 óra telt el a vérévételig. Az egészséges személyek neurológiai anamnézise negatív volt, és részletes fizikális és neurológiai vizsgálat során státuszukat negatívnak találtuk. A SM-es betegek esetében más betegség nem állt fenn rutin laboratóriumi vizsgálat és fizikális betegvizsgálat alapján.

## 3. táblázat: Sclerosis multiplexben végzett vizsgálatunk résztvevői

Adatok: medián [tartomány]. EDSS – expanded disability status score, SM – sclerosis multiplex

	<b>Egészséges önkéntesek n = 10</b>	<b>SM IFN béta kezelés nélkül n = 11</b>	<b>SM IFN béta kezeléssel n = 6</b>
Életkor (év)	35 [23-44]	44 [24-51]	39 [32-56]
Férfi/nő	4/6	4/7	2/4
SM fennállása (év)	-	4 [1-20]	7 [1-18]
EDSS pont	-	2 [1-3]	4,5 [2-5]

T1DM-ben végzett vizsgálatainkhoz 9 egészséges önkéntestől és 9 T1DM-ben szenvedő betegről gyűjtöttünk perifériás vérmintát. A vizsgálat résztvevőinek adatai a **4. táblázatban** láthatóak.

#### **4. táblázat: 1-es típusú diabetesben végzett vizsgálatunk résztvevői**

Adatok: medián [tartomány]. GADA – glutaminsav-dekarboxiláz elleni antitest, T1DM – 1-es típusú diabetes mellitus

	<b>Egészséges önkéntesek N = 9</b>	<b>T1DM betegek n = 9</b>
Életkor (év)	27 [24-52]	35 [27-55]
Férfi/nő	5/4	5/4
T1DM fennállása (hó)	-	12 [1-120]
GADA (U/ml)	nem kimutatható	51 [16-105]

A T1DM diagnózisát nemzetközi standard kritériumok alapján állították fel [80]. Az egészséges személyek cukorháztartással kapcsolatos anamnézise negatív volt, és részletes fizikális vizsgálat során státuszukat negatívnak találtuk. T1DM-re specifikus autoantitestek vérmintáikból nem voltak kimutathatóak. A T1DM-es betegek esetében más betegség nem állt fenn rutin laboratóriumi vizsgálat és fizikális betegvizsgálat alapján. Minden résztvevő BMI és vérnyomás értéke a normál tartományba esett.

A vizsgálatokban résztvevő alanyoktól, illetve újszülöttek esetén a szülőktől a vérminták levétele előtt tájékozott beleegyezést kértünk és kaptunk. A vizsgálatokat a Helsinki Deklaráció előírásaival összhangban végeztük.

### **5.3. A MONONUKLEÁRIS SEJTEK IZOLÁLÁSA**

A mononukleáris sejteket standard sűrűség gradiens centrifugálással (Ficoll Paque, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden, 27 perc, 400 g, 22 °C) választottuk el 9 ml frissen, lithium heparinos csőbe (BD Vacutainer, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) vett perifériás vénás vérből, illetve köldökzsinórvérből. Ezt a sejtszuspenziót kétszer mostuk PBS-ben (phosphate buffer saline). A sejteket a továbbiakban a fluoreszcens markerekkel való jelölés, a gátlószerekkel való előkezelés és az áramlási citométeres mérés telje ideje alatt módosított RPMI médiumban (Sigma-Aldrich, St.



Louis, MO, USA) tároltuk. A módosított RPMI kalcium koncentrációját kristályos  $\text{CaCl}_2$  hozzáadásával 2 mM-osra állítottuk be. A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálat esetében a sejtek egy részét a módosított RPMI médium helyett PBS-ben tároltuk.

#### 5.4. A SEJTFELSZÍNI MARKEREK ÉS AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUMSZINT MEGHATÁROZÁSA

A limfociták sejtpopulációját a Forward Scatter és a Side Scatter karakterisztika alapján különítettük el a mononukleáris sejtek közül az áramlási citométeres mérések során. A sejtfelszíni markerek festéséhez a mononukleáris sejteket 500  $\mu\text{l}$  módosított RPMI-ben vagy PBS-ben szuszpendáltunk. A sejteket 30 percig, sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk a következő konjugált anti-humán monoklonális antitestek kombinációjával a gyártó javaslatainak megfelelően: anti-CD4 phycoerythrin-Cy7, anti-CD8 allophycoyanin-Cy7, anti-CXCR3 allophycoyanin (a Th1 alpopuláció elkülönítésére), anti-CCR4 phycoerythrin (a Th2 alpopuláció elkülönítésére) (az összes PharMingen, San Diego, CA, USA), valamint külön mérés során anti-Kv1.3 channel FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálat esetében az alábbi sejtfelszíni monoklonális antitesteket használtuk: anti-CD4 allophycoyanin-Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CXCR3 allophycoyanin (PharMingen), and anti-CCR4 PerCP (BioLegend). A sejteket ezután mostuk.

A  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  monitorozásához Fluo-3 és Fura-Red festékeket tartalmazó keveréket adtunk a sejtszuspenzióhoz. A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálat esetében csupán Fluo-3 festéket használtunk. A keveréket a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ajánlása szerint készítettük: a festékeket 1:2 arányban Pluronic F-127-ben oldottunk. A sejteket 20 percig, sötétben, 30 °C-on inkubáltuk a keverékkel, majd mosást végeztünk. A sejteket ezután a mérésig szobahőn, sötétben tároltuk. A  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  szintet a Fluo-3 és Fura-Red fluoreszcenciájának fix hányadosa alapján számítottuk.

## 5.5. A SEJTEK GÁTLÓSZERES KEZELÉSE

Az egy-egy alanytól származó mononukleáris sejt szuszpenziókat több, megegyező sejtszámú mérési mintára osztottuk. Egy mintát gátlószeres kezelés nélkül (kontrollként), két mintát pedig MGTX, és TRAM-34 gátlószerekkel kezelve mértünk (mindkettő Sigma-Aldrich). A gátlószereket 60 nM-os, telítő koncentrációban alkalmaztuk. MGTX esetében legalább 15, TRAM-34 esetében legalább 10 percig hatott a gátlószer a mérések megkezdése előtt. A Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozását leíró vizsgálat esetében az MCU működését ruthenium red (RR) hozzáadásával [71-73], a SERCA csatornát thapsigarginnal (TG) [74], míg a PMCA-t caloxin 2A1 (CLX) segítségével gátoltuk [75, 76]. A RR-et (Sigma-Aldrich, 1,25 mM) legalább 10 perccel a mérés előtt adtuk a mintához, a TG-t (Sigma-Aldrich, 750 nM) közvetlenül a mérés előtt hozzáadva, a CLX-t (AnaSpec, Fremont, CA, USA, 750  $\mu$ M) pedig legalább 5 perccel a mérés előtt hozzáadva alkalmaztuk. Minden mintához 20  $\mu$ g PHA-t adtunk közvetlenül a mérés megkezdése előtt aktiválás céljából (Sigma-Aldrich). Az intracelluláris kalciumkötő festékek bazális fluoreszcenciáját (melyet a Fluo-3 és Fura-Red hányadosát alapul véve számítottunk) minden mérés legelején (nulla másodpercnél) állapítottuk meg. Vizsgálatainkhoz BD FACSAria áramlási citométert (BD Biosciences) használtunk. A méréseket kinetikus jelleggel folyamatosan végeztük, 10 percen keresztül.

## 5.6. STATISZTIKAI ELEMZÉS

A mérési eredmények összehasonlítását Wilcoxon, Mann-Whitney és Kruskal-Wallis tesztek segítségével végeztük, mivel az előzetesen elvégzett Kolmogorov-Smirnoff teszt az adatok nem normál eloszlását tárta fel. A 0,05-nél kisebb  $p$  értékeket vettük szignifikánsnak. A statisztikai számításokat GraphPad InStat programmal végeztük (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. A KALCIUM HÁZTARTÁS SZABÁLYOZÁSA EGÉSZSÉGESEKBEN RÖVID TÁVÚ LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SORÁN

Vizsgálataink során a CD4+ CXCR3+ sejteket tekintettük a Th1 alpopulációnak, a CD4+ CCR4+ sejteket pedig a Th2 alpopulációnak. Először a PHA hatására kialakuló kalcium beáramlás mértékét hasonlítottuk össze Th1 és Th2 sejtekben. Az AUC, Slope és Max értékek mind alacsonyabbak voltak Th2 sejtek esetében, mint Th1 sejteknél (**5. táblázat**). A  $t_{max}$  érték esetén nem találtunk különbséget.

#### 5. táblázat: A limfocita aktiváció paraméterei Th1 és Th2 sejtekben extracelluláris kalcium jelenlétében (ER+CRAC hozzájárulása) és anélkül (ER hozzájárulása) mérve

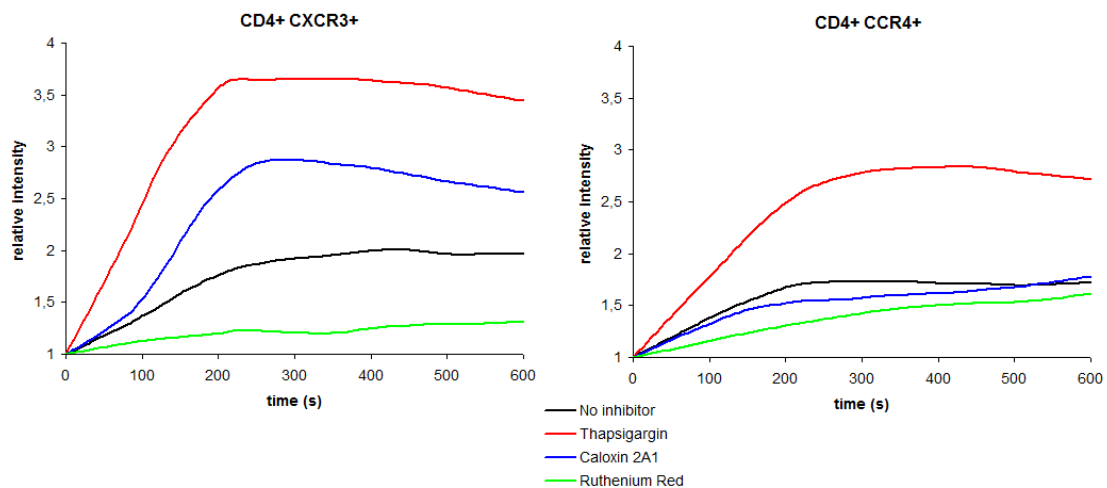
A CRAC hozzájárulását a két tényező kivonásával kaptuk meg. Adatok: medián [tartomány]. \*  $p < 0,05$  vs. Th1 sejtek megfelelő paramétere. AUC – görbe alatti terület, CRAC – calcium release activated calcium csatorna, ER – endoplazmás retikulum, rpv – relative parameter value,  $t_{max}$  – a maximum elérésének ideje

Sejt-típus	Paraméter	ER + CRAC hozzájárulása	ER hozzájárulása	CRAC hozzájárulása	CRAC/ER arány
Th1 sejtek (CD4+ CXCR3+)	AUC (U)	460 [201-779]	98 [65-218]	362 [136-561]	3,7
	Slope	0,006 [0,002-0,011]	0,002 [0,001-0,003]	0,004 [0,001-0,008]	2
	Max (rpv)	2,130 [1,486-2,636]	1,238 [1,199-1,459]	1,892 [1,287-2,177]	3,7
	$t_{max}$ (s)	473 [281-600]	358 [267-600]	115 [14-600]	0,3
Th2 sejtek (CD4+ CCR4+)	AUC (U)	312* [211-454]	93 [58-114]	219 [153-340]	2,4
	Slope	0,003* [0,002-0,005]	0,001 [0,001-0,002]	0,002 [0,001-0,003]	2
	Max (rpv)	1,732* [1,492-2,209]	1,262 [1,226-1,435]	1,470 [1,266-1,774]	1,8
	$t_{max}$ (s)	425 [285-600]	314 [235-600]	111 [50-600]	0,4

Az ER-ból való kalcium felszabadulás és a CRAC csatornán való kalcium beáramlás egyéni hozzájárulását a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelkedéséhez úgy állapítottuk meg, hogy méréseinket extracelluláris kalciumot nem tartalmazó közegben is elvégeztük. Így az ER hozzájárulását tudtuk meghatározni, hiszen a CRAC csatornán keresztül kalcium nem

áramlott be a sejtekbe. A CRAC csatornán keresztüli kalcium beáramlás egyéni mértékét ezután úgy állapítottuk meg, hogy ezen mérések értékeit kivontuk az extracelluláris kalcium jelenlétében végzett mérések eredményeiből. Végül minden vizsgált paraméter esetében meghatároztuk a két tényező arányát (CRAC/ER arány). Az eredményeket a **5. táblázat** tartalmazza.

Az RR mindkét limfocita altípusban csökkentette az AUC értéket (**6. táblázat, 9. ábra**). A Th1 sejtekben ezen felül a Slope és Max értékek is csökkentek, a  $t_{max}$  érték pedig emelkedett a Th2 sejtekben. Az RR tehát a kalcium beáramlásnak mind a nagyságát, mind a kinetikáját befolyásolja. Eredményeink alapján a mitokondriális kalcium felvétel Th1 sejtekben a limfocita aktiváció kezdeti és csúcs szakaszában is jelen van (amire a Slope és Max értékek változása utal az MCU gátlásának hatására), míg Th2 sejtekben csupán a kalcium beáramlás csúcsán van szerepe (amit a  $t_{max}$  érték változása jelez).



**9. ábra: Az alkalmazott gátlószerek hatása a kalcium beáramlásra Th1 és Th2 sejtekben, reprezentatív mintában**

A függőleges tengely az intracelluláris kalciumkötő festék (Fluo-3) fluoreszcenciájának relatív intenzitását jelzi. A kontroll (gátlószer nélküli) mérést a fekete vonal jelzi. CD4+ CXCR3+ – Th1 sejtek, CD4+ CCR4+ – Th2 sejtek

A TG az AUC, Slope és Max értékeket is megnövelte mind a Th1, mind a Th2 sejtekben (**6. táblázat, 9. ábra**). A TG tehát mind a kalcium eltávolítás mértékét és kinetikáját befolyásolja Th1 és Th2 sejtekben. A Slope érték kétszer akkora mértékben emelkedett Th2 sejtekben, mint a Th1 alpopulációban a TG hatására. Ez arra utal, hogy

az ER kalcium felvétel hamarabb indul meg Th2 sejtekben. A további kalcium felvétel azonban (a kalcium beáramlás csúcán) már hasonló Th1 és Th2 sejtekben, mivel a TG hatására a Max érték azonos mértékben nő.

**6. táblázat: A thapsigargin, a caloxin 2A1 és a ruthenium red hatásai a kalcium beáramlás kinetikájának paramétereire egészséges önkéntesek limfocitáiban extracelluláris kalcium jelenlétében**

Adatok: medián [tartomány]. A gátlószerral kezelt mintákat a kezeletlen mintákhoz hasonlítottuk.  $p < 0,05$ . AUC – görbe alatti terület, ns – nem szignifikáns, rpv – relative parameter value,  $t_{\max}$  – a maximum elérésének ideje

Sejtípus	Paraméter	Kezeletlen	Thapsigargin		Caloxin 2A1		Ruthenium Red	
Th1 sejtek (CD4+ CXCR3+)	AUC (U)	460 [201-779]	1105 [691-2411]	+140%	504 [373-828]	+10%	123 [63-544]	-73%
	Slope	0,006 [0,002-0,011]	0,011 [0,007-0,021]	+83% (+0,005)	0,008 [0,003-0,018]	ns	0,002 [0,001-0,009]	-66% (-0,004)
	Max (rpv)	2,130 [1,486-2,636]	3,599 [2,525-7,602]	+69%	2,645 [1,890-3,168]	+24%	1,321 [1,155-2,236]	-38%
	$t_{\max}$ (s)	473 [218-600]	516 [225-600]	ns	316 [194-600]	ns	515 [145-600]	ns
Th2 sejtek (CD4+ CCR4+)	AUC (U)	312 [211-454]	889 [602-2057]	+184%	323 [190-537]	ns	180 [122-450]	-42%
	Slope	0,003 [0,002-0,005]	0,008 [0,006-0,022]	+166% (+0,005)	0,003 [0,002-0,006]	ns	0,002 [0,001-0,005]	ns
	Max (rpv)	1,732 [1,492-2,209]	3,017 [2,266-6,737]	+74%	1,748 [1,600-2,412]	ns	1,601 [1,310-2,092]	ns
	$t_{\max}$ (s)	425 [285-600]	491 [309-600]	ns	582 [328-600]	ns	600 [486-600]	+41%

CLX hatására a Th1 sejtekben mutattunk ki változást a kalcium háztartásban. Itt a Max érték 24 %-kal emelkedett a gátlószer hatására (**6. táblázat, 9. ábra**). A CLX kezelés tehát a kalcium beáramlás csúcsán eredményez változásokat. Érdekes módon a CLX a Th2 sejtekre nem volt hatással.

## 6.2. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGESEKBEN

Egészséges önkéntesek mintáin a Kv1.3 és IKCa1 csatornák specifikus gátlószerinek alkalmazása (MGTX és TRAM) jelentős hatással volt a limfociták kalcium beáramlásának AUC, Max és  $t_{max}$  értékeire. Az eredmények a **7. táblázatban** láthatók. A TRAM gátlószerrel történő kezelés csökkentette az AUC és Max értékeket minden vizsgált limfocita altípus esetén. A MGTX szintén minden esetben csökkentette az AUC és Max értékeket, kivéve a Th1 sejteket. A  $t_{max}$  értékekben nem találtunk szignifikáns eltérést. A vizsgált paraméterek csökkenésének mértéke karakterisztikus volt a vizsgált sejttípusra és a gátolt kálium csatornára.

## 6.3. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK ÚJSZÜLÖTTKORBAN

Újszülötteknél az AUC értékek kisebbek voltak a teljes limfocita populációban, a Th1 alpopulációban, és a CD8 alpopulációban felnőttekhez viszonyítva. A Max értékek alacsonyabbak voltak újszülöttekben felnőttekhez képest a teljes limfocita populációban, a Th1 és Th2 sejtekben, valamint a CD8 sejtekben. Felnőttekhez képest kisebbek voltak a  $t_{max}$  értékek újszülöttek esetén a Th1 és a Th2 alpopulációkban (**7. táblázat, 10. ábra**). Újszülöttek CD8 sejtjeiben az AUC és Max értékeket mind a MGTX, mind a TRAM csökkentette. A TRAM csökkentette továbbá a teljes limfocita populáció  $t_{max}$  értékét. Újszülöttek esetében a többi vizsgált alpopulációban sem a MGTX, sem a TRAM nem csökkentette a kalcium beáramlást.

Megvizsgáltuk a Kv1.3 csatorna elleni antitest medián fluoreszcencia értékeit újszülöttek limfocitáin felnőttekhez hasonlítva. A Th2, CD4 és CD8 sejtek esetében ezt az értéket magasabbnak találtuk újszülöttek esetén, mint felnőtteknél.

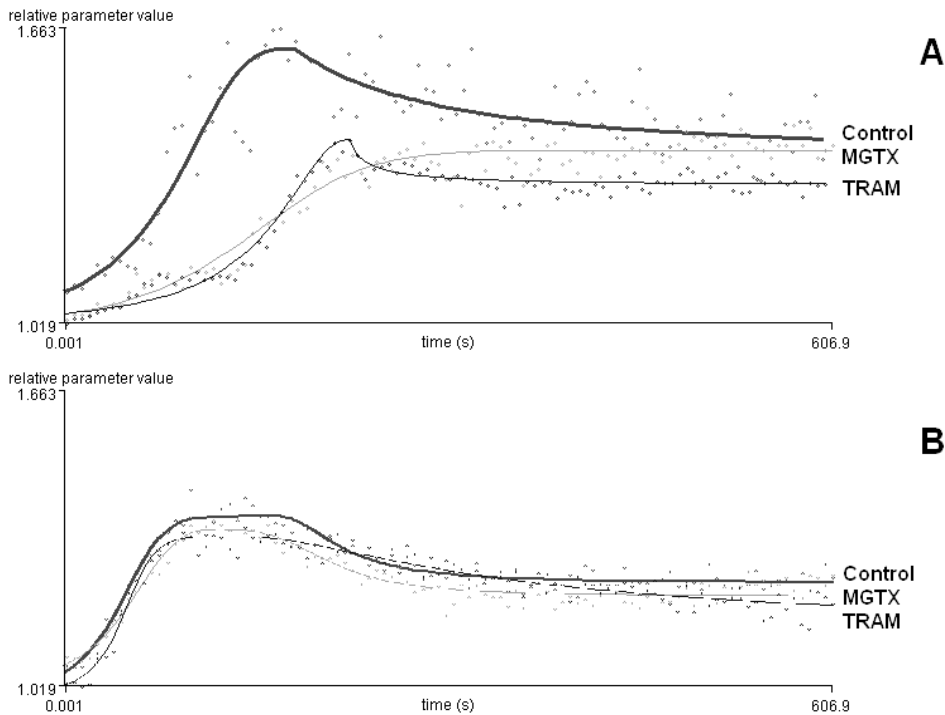
**7. táblázat: A margatoxin (MGTX) és a triarilmetán (TRAM) hatásai a kalcium beáramlás kinetikájának paramétereire egészséges felnőttek és újszülöttek limfocitáiban (folytatás a következő oldalon)**

Sejtípus		Kezeletlen		MGTX (60 nM)				TRAM (60 nM)			
		Felnőtt (n=9)	Újszülött (n=9)	Felnőtt (n=9)		Újszülött (n=9)		Felnőtt (n=9)		Újszülött (n=9)	
Ly	AUC (U)	891 [684-1338]	653* [616-839]	710** [608-878]	-20 %	653 [607-787]	ns	657** [338-887]	-26 %	632 [595-789]	ns
	Max (rpv)	1,661 [1,199-2,748]	1,204* [1,045-1,516]	1,267** [1,058-1,627]	-24 %	1,203 [1,028-1,526]	ns	1,163** [1,003-1,723]	-30 %	1,139 [1,016-1,454]	ns
	t <sub>max</sub> (s)	567 [201-1356]	362 [126-602]	490 [172-866]	ns	185 [93-649]	ns	280 [142-810]	ns	165 <sup>†</sup> [107-277]	-54 %
Th1	AUC (U)	880 [650-1092]	705* [613-831]	770 [626-1008]	ns	645 [593-765]	ns	699** [569-882]	-21 %	643 [598-775]	ns
	Max (rpv)	1,669 [1,173-2,214]	1,225* [1,037-1,473]	1,416 [1,108-1,848]	ns	1,220 [1,009-1,542]	ns	1,262** [0,979-1,774]	-24 %	1,175 [1,018-1,477]	ns
	t <sub>max</sub> (s)	562 [162-1398]	209* [105-683]	319 [160-613]	ns	181 [88-457]	ns	373 [36-1147]	ns	148 [75-215]	ns
Th2	AUC (U)	777 [667-1603]	724 [532-1117]	644** [591-777]	-17 %	690 [475-878]	ns	653** [582-823]	-16 %	642 [515-1019]	ns
	Max (rpv)	1,626 [1,208-3,914]	1,329* [1,003-2,311]	1,156** [1,028-1,566]	-29 %	1,323 [1,002-1,873]	ns	1,144** [1,005-1,550]	-30 %	1,207 [1,003-2,016]	ns
	t <sub>max</sub> (s)	586 [207-1220]	419* [138-570]	517 [210-654]	ns	279 [12-578]	ns	482 [91-736]	ns	270 [200-869]	ns
CD4	AUC (U)	824 [690-1416]	716 [603-1169]	707** [608-833]	-14 %	655 [602-813]	ns	648** [588-840]	-20 %	648 [580-1010]	ns
	Max (rpv)	1,627 [1,206-3,194]	1,370 [1,021-2,423]	1,301** [1,045-1,612]	-20 %	1,264 [1,025-1,692]	ns	1,153** [0,994-1,569]	-29 %	1,280 [1,002-2,006]	ns
	t <sub>max</sub> (s)	575 [210-884]	376 [200-914]	436 [180-821]	ns	222 [138-650]	ns	355 [152-702]	ns	226 [146-694]	ns
CD8	AUC (U)	950 [721-1889]	656* [602-758]	756** [600-943]	-20 %	619 <sup>†</sup> [563-721]	-6 %	777** [586-1010]	-18 %	602 <sup>†</sup> [570-712]	-8 %
	Max (rpv)	1,912 [1,260-4,280]	1,117* [1,066-1,414]	1,487** [1,024-1,918]	-22 %	1,086 <sup>†</sup> [1,005-1,305]	-3 %	1,404** [1,004-1,959]	-27 %	1,042 <sup>†</sup> [1,002-1,315]	-7 %
	t <sub>max</sub> (s)	518 [125-985]	297 [110-500]	339 [195-584]	ns	257 [102-486]	ns	265 [161-963]	ns	211 [66-570]	ns



## 7. táblázat

Adatok: medián [tartomány]. \* újszülöttek kezeletlen mintáit hasonlítottuk felnőttek kezeletlen mintáihoz,  $p < 0,05$ , \*\* felnőttek MGTX és TRAM kezelt mintáit hasonlítottuk felnőttek kezeletlen mintáihoz,  $p < 0,05$ , † újszülöttek MGTX és TRAM kezelt mintáit hasonlítottuk újszülöttek kezeletlen mintáihoz,  $p < 0,05$ . AUC – görbe alatti terület,  $L_y$  – teljes limfocita populáció, ns – nem szignifikáns, rpv – relative parameter value,  $t_{max}$  – a maximum elérésének ideje



**10. ábra: A kálium csatornák gátlószereinek hatása a limfocita aktivációra felnőttektől (A) és újszülöttektől (B) származó limfociták esetében**

Látható, hogy újszülöttek limfocitáiban alacsonyabb szintű a kalcium beáramlás fitohemagglutininnal történő aktiváció hatására. Továbbá – felnőttek limfocitáival ellentétben – sem a margatoxin (MGTX), sem a triarilmetán (TRAM) nem csökkentette szignifikánsan a kalcium beáramlás mértékét.

## 6.4. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGES TERHESSÉGBEN ÉS PREECLAMPSIÁBAN

Először a kalcium beáramlás AUC, Max és  $t_{max}$  paramétereit hasonlítottuk össze a PHA-val aktivált limfocitákban fertilis, nem várandós nők, egészséges várandósok és PE-s betegek esetén. Az AUC értékek alacsonyabbak voltak a Th1, a CD4 és a CD8 sejtek esetén egészséges várandósokban nem terhesekhez hasonlítva (8. táblázat, 11. ábra).

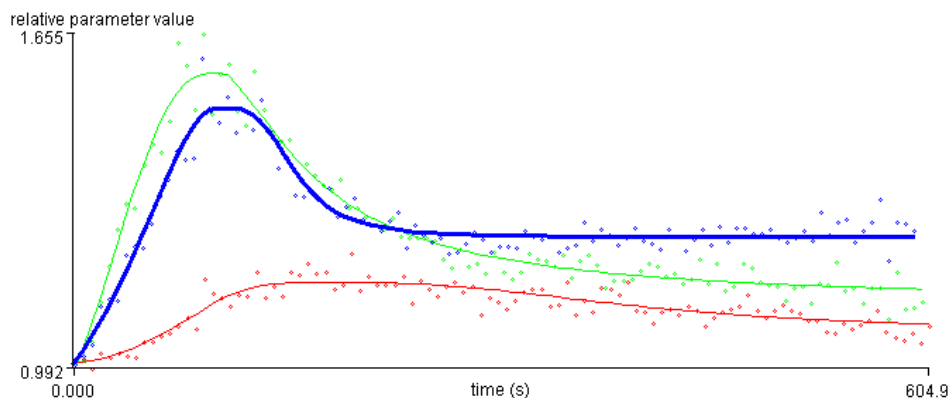
**8. táblázat: A margatoxin (MGTX) és a triarilmetán (TRAM) hatásai a kalcium beáramlás kinetikájának paramétereire nem várandós nők, egészséges várandósok és preeclampsziás betegek limfocitáiban (folytatás a következő oldalon)**

		Kezeletlen			MGTX (60 nM)			TRAM (60 nM)		
Sejttípus		Nem terhes	Egészs. terhes	Preeclampsia	Nem terhes	Egészs. terhes	Preeclampsia	Nem terhes	Egészs. terhes	Preeclampsia
Ly	AUC (U)	686 [671-821]	654* [641-677]	716 [655-723]	662 <sup>†</sup> [658-717]	642 <sup>‡</sup> [605-654]	645 <sup>#</sup> [611-704]	652 <sup>§</sup> [641-817]	638 <sup>ε</sup> [584-649]	690 <sup>‡</sup> [599-705]
	Max (rpv)	1,322 [1,271-1,530]	1,332 [1,264-1,629]	1,343 [1,141-1,358]	1,273 [1,266-1,301]	1,126 <sup>‡</sup> [1,064-1,261]	1,133 [1,046-1,263]	1,285 <sup>§</sup> [1,180-1,447]	1,224 [1,020-1,326]	1,225 [1,023-1,289]
	t <sub>max</sub> (s)	553 [460-682]	648 [474-746]	364 [140-619]	560 [296-829]	642 [585-705]	565 [184-579]	664 [280-725]	725 [541-811]	181 [129-428]
Th1	AUC (U)	775 [683-880]	658* [640-669]	749 [673-777]	753 [668-770]	626 <sup>‡</sup> [599-648]	628 [608-747]	698 <sup>§</sup> [643-817]	636 <sup>ε</sup> [597-640]	744 [645-753]
	Max (rpv)	1,354 [1,303-1,574]	1,276 [1,116-1,374]	1,507 [1,305-1,547]	1,371 [1,286-1,446]	1,079 <sup>‡</sup> [1,025-1,263]	1,218 [1,098-1,421]	1,409 [1,204-1,569]	1,193 <sup>ε</sup> [1,078-1,275]	1,383 [1,171-1,558]
	t <sub>max</sub> (s)	616 [519-639]	602 [571-618]	450 [110-588]	533 [295-594]	633 [582-681]	546 [152-587]	522 [260-606]	615 [565-720]	290 [139-510]
Th2	AUC (U)	678 [667-777]	667 [620-700]	674 [666-747]	641 <sup>†</sup> [633-656]	641 [590-645]	637 <sup>#</sup> [624-660]	653 <sup>§</sup> [637-709]	646 [572-689]	637 <sup>‡</sup> [599-663]
	Max (rpv)	1,326 [1,286-1,463]	1,406 [1,191-1,645]	1,203 [1,163-1,426]	1,156 <sup>†</sup> [1,118-1,228]	1,167 [1,038-1,262]	1,144 <sup>#</sup> [1,087-1,159]	1,257 <sup>§</sup> [1,186-1,299]	1,161 [1,037-1,424]	1,126 [1,080-1,174]
	t <sub>max</sub> (s)	589 [533-689]	642 [638-705]	443 <sup>κ</sup> [301-549]	525 [313-628]	659 [531-717]	488 [314-596]	538 [482-623]	682 [476-696]	421 [301-604]
CD4	AUC (U)	691 [684-781]	649* [641-659]	649 <sup>β</sup> [648-660]	668 <sup>†</sup> [644-695]	638 <sup>‡</sup> [598-645]	625 <sup>#</sup> [599-633]	644 <sup>§</sup> [640-681]	637 <sup>ε</sup> [587-643]	630 <sup>‡</sup> [608-638]
	Max (rpv)	1,364 [1,295-1,389]	1,258 [1,141-1,457]	1,167 <sup>β</sup> [1,162-1,212]	1,274 <sup>†</sup> [1,222-1,314]	1,079 <sup>‡</sup> [1,032-1,165]	1,100 <sup>#</sup> [1,050-1,108]	1,201 <sup>§</sup> [1,154-1,390]	1,085 [1,000-1,206]	1,095 <sup>‡</sup> [1,081-1,121]
	t <sub>max</sub> (s)	593 [407-761]	642 [515-680]	255 <sup>κ,β</sup> [157-443]	560 [295-700]	594 [380-619]	296 [218-481]	576 [380-620]	608 [436-759]	266 [201-454]
CD8	AUC (U)	736 [670-881]	649* [641-666]	724 <sup>κ</sup> [672-830]	700 <sup>†</sup> [660-756]	626 <sup>‡</sup> [605-636]	652 [613-689]	696 <sup>§</sup> [659-780]	605 <sup>ε</sup> [592-640]	685 [630-707]
	Max (rpv)	1,336 [1,260-1,644]	1,161* [1,136-1,364]	1,324 [1,246-1,579]	1,247 <sup>†</sup> [1,208-1,354]	1,105 <sup>‡</sup> [1,028-1,131]	1,200 <sup>#</sup> [1,090-1,207]	1,312 [1,212-1,404]	1,173 [1,038-1,203]	1,194 [1,139-1,359]
	t <sub>max</sub> (s)	444 [326-643]	615 [543-673]	314 [277-456]	384 [227-638]	635 [532-666]	281 [169-488]	352 [230-564]	674 [97-690]	415 [390-665]

## 8. táblázat

Adatok: medián [kvartilis]. \* egészséges várandósok kezeletlen mintáit hasonlítottuk nem várandósok kezeletlen mintáihoz,  $p < 0,05$ , <sup>&</sup> preeclampsziások kezeletlen mintáit hasonlítottuk egészséges várandósok kezeletlen mintáihoz,  $p < 0,05$ , <sup>b</sup> preeclampsziások kezeletlen mintáit hasonlítottuk nem várandósok kezeletlen mintáihoz,  $p < 0,05$ , <sup>†</sup> MGTX kezelt mintákat hasonlítottunk kezeletlen mintákhoz a nem várandós csoporton belül,  $p < 0,05$ , <sup>§</sup> TRAM kezelt mintákat hasonlítottunk kezeletlen mintákhoz a nem várandós csoporton belül,  $p < 0,05$ , <sup>‡</sup> MGTX kezelt mintákat hasonlítottunk kezeletlen mintákhoz az egészséges várandós csoporton belül,  $p < 0,05$ , <sup>€</sup> TRAM kezelt mintákat hasonlítottunk kezeletlen mintákhoz az egészséges várandós csoporton belül,  $p < 0,05$ , <sup>#</sup> MGTX kezelt mintákat hasonlítottunk kezeletlen mintákhoz a preeclampsziás csoporton belül,  $p < 0,05$ , <sup>‡</sup> TRAM kezelt mintákat hasonlítottunk kezeletlen mintákhoz a preeclampsziás csoporton belül,  $p < 0,05$ . AUC – görbe alatti terület, Ly – teljes limfocita populáció, ns – nem szignifikáns, rpv – relative parameter value,  $t_{max}$  – a maximum elérésének ideje

Az egészséges várandósok mintáit PE-s várandósokhoz hasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a  $t_{max}$  érték alacsonyabb PE-ban a Th2 altípusban.



**11. ábra: A kalcium beáramlás kinetikája a Th1 limfocita populációban nem terhes (kék), egészséges várandós (piros) és preeclampsziás minták (zöld) esetében**

A „relative parameter value” megjelölés a kalciumkötő festékek (a Fluo-3 és Fura-Red hányadosa) relatív fluoreszcenciájára utal. A kalcium beáramlás alacsonyabb szintű egészséges terhességben, mint nem terhesek és preeclampsziások esetén.

A teljes limfocita populációban, a Th1, a CD4 és a CD8 alpopulációkban mind a MGTX, mind a TRAM csökkentette az AUC értékeket egészséges terhességben. A nem várandós nőktől vett mintákkal ellentétben azonban a gátlószereknek nem volt hatása a kalcium beáramlásra a Th2 altípusban egészséges terhességben.

PE-ban mindkét gátlószer csökkentette az AUC értékeket a teljes limfocita populációban, valamint a Th2 és a CD4 alpopulációkban, a Th1 és a CD8 sejtek AUC értékeire azonban nem voltak hatással. A Th2 és a CD8 sejtek esetében az MGTX, míg a CD4 sejtek esetén mindkét gátlószer csökkentette a Max értéket PE-ban.

Megvizsgáltuk a Kv1.3 csatorna elleni antitest medián fluoreszcencia értékeit a limfocitákon mindhárom csoport esetében. Nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok között egyik vizsgált limfocita altípus esetében sem.

## 6.5. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK SCLEROSIS MULTIPLEXBEN

Első lépésben gátlókerek hozzáadása nélkül hasonlítottuk össze a kalcium beáramlás paramétereit (AUC, Max,  $t_{max}$  és Slope) a limfociták aktivációját követően az egészséges önkéntesek és a SM-es betegek két csoportja (IFN bétával és anélkül kezelt) között. IFN bétával nem kezelt SM-es betegek esetén egészségesekhez viszonyítva csökkent a  $t_{max}$  érték a CD4, a Th1 és a Th2 altípusok esetén (**9. táblázat**). Tehát a kalcium beáramlás csúcsának elérése ezekben az altípusokban hamarabb következik be SM-ben. IFN bétával kezelt betegek esetén a  $t_{max}$  érték ismét magasabb volt a Th1 sejtekben, mint IFN béta kezelés nélküli SM-ben. A Slope érték IFN bétával nem kezelt SM-ben magasabb volt mint egészséges önkénteseknél a CD4, Th1 és Th2 limfocita altípusokat vizsgálva, ami szintén gyorsabb kalcium beáramlásra enged következtetni (**10. táblázat**). Ez az érték ismét csökkent IFN bétával kezelt SM-ben a CD4 és a Th1 sejtekben.

A Kv1.3 és IKCa1 csatornák specifikus gátlószereinek alkalmazása jelentős hatással volt a limfociták kalcium beáramlásának AUC, Max és  $t_{max}$  értékeire mindhárom csoportban; a Slope érték azonban nem változott meg. Az eredmények a **9. táblázatban** láthatók. A MGTX és TRAM gátlószerekkel történő kezelés csökkentette az AUC értéket minden vizsgált limfocita altípus esetén, mindhárom csoportban. A Max érték is csökkent egészségesek Th2 sejtjeiben, továbbá a CD4, CD8 és Th1 altípusoknál IFN bétával nem kezelt betegek esetén. A  $t_{max}$  érték kizárólag MGTX hatására csökkent a CD8 sejt típus esetén mindkét SM-es csoportban. A vizsgált paraméterek csökkenésének mértéke karakterisztikus volt a vizsgált sejt típusra és a gátolt kálium csatornára.

**9. táblázat: A margatoxin (MGTX) és a triarilmetán (TRAM) hatásai a kalcium beáramlás kinetikájának paramétereire egészséges önkéntesek, valamint IFN bétával vagy anélkül kezelt sclerosis multiplexes betegek limfocitáiban**

Adatok: medián [kvartilis]. <sup>a</sup> IFN bétával nem kezelt SM-es betegek gátlószer nélküli mintáit hasonlítottuk egészségesek gátlószer nélküli mintáihoz,  $p < 0,05$ , <sup>b</sup> IFN bétával kezelt SM-es betegek gátlószer nélküli mintáit hasonlítottuk IFN bétával nem kezelt SM-es betegek gátlószer nélküli mintáihoz,  $p < 0,05$ , <sup>c</sup> MGTX és TRAM gátlószeres mintákat hasonlítottunk gátlószer nélküli mintákhoz az egészséges csoportban,  $p < 0,05$ , <sup>d</sup> MGTX és TRAM gátlószeres mintákat hasonlítottunk gátlószer nélküli mintákhoz az IFN bétával nem kezelt SM-es betegek csoportjában,  $p < 0,05$ , <sup>e</sup> MGTX és TRAM gátlószeres mintákat hasonlítottunk gátlószer nélküli mintákhoz az IFN bétával kezelt SM-es betegek csoportjában,  $p < 0,05$ . AUC – görbe alatti terület, rpv – relative parameter value,  $t_{max}$  – a maximum elérésének ideje

Sejttípus	Gátlószer nélkül			MGTX (60 nM)			TRAM (60 nM)			
	Egészséges	IFN b nélkül	IFN bétával	Egészséges	IFN b nélkül	IFN bétával	Egészséges	IFN b nélkül	IFN bétával	
CD4	AUC (U)	785 [738-867]	740 [719-863]	736 [695-756]	90% <sup>c</sup> [83-93%]	93% <sup>d</sup> [89-96%]	90% <sup>e</sup> [89-93%]	93% <sup>c</sup> [89-98%]	92% <sup>d</sup> [82-94%]	93% <sup>e</sup> [90-95%]
	Max (rpv)	1,377 [1,228-1,634]	1,318 [1,267-1,683]	1,179 [1,165-1,378]	95% [84-102%]	90% <sup>d</sup> [80-94%]	86% <sup>e</sup> [80-87%]	99% [91-107%]	90% <sup>d</sup> [78-94%]	89% <sup>e</sup> [83-91%]
	$t_{max}$ (s)	416 [261-504]	201 <sup>a</sup> [169-251]	284 [166-413]	90% [42-184%]	102% [93-126%]	98% [58-104%]	118% [89-135%]	94% [64-121%]	100% [39-110%]
Th1	AUC (U)	868 [781-1002]	872 [800-1106]	738 [733-753]	90% <sup>c</sup> [84-93%]	90% <sup>d</sup> [74-93%]	92% <sup>e</sup> [90-95%]	86% <sup>c</sup> [85-93%]	91% <sup>d</sup> [82-96%]	98% <sup>e</sup> [91-99%]
	Max (rpv)	1,588 [1,333-1,931]	1,564 [1,392-2,101]	1,303 [1,181-1,349]	87% <sup>c</sup> [82-93%]	86% <sup>d</sup> [72-96%]	88% <sup>e</sup> [73-88%]	89% [79-94%]	87% <sup>d</sup> [81-94%]	99% <sup>e</sup> [95-99%]
	$t_{max}$ (s)	353 [227-486]	184 <sup>a</sup> [137-241]	414 <sup>b</sup> [386-566]	118% [66-162%]	167% [78-324%]	109% [104-192%]	107% [82-221%]	115% [72-224%]	86% [76-100%]
Th2	AUC (U)	777 [752-854]	808 [754-840]	718 [695-885]	87% <sup>c</sup> [86-93%]	88% <sup>d</sup> [86-91%]	85% <sup>e</sup> [85-91%]	92% <sup>c</sup> [88-94%]	90% <sup>d</sup> [86-93%]	89% <sup>e</sup> [84-93%]
	Max (rpv)	1,460 [1,258-1,546]	1,535 [1,330-1,611]	1,204 [1,076-1,383]	88% <sup>c</sup> [81-90%]	88% [81-93%]	89% <sup>e</sup> [74-96%]	88% <sup>c</sup> [86-98%]	87% <sup>d</sup> [80-88%]	92% <sup>e</sup> [87-100%]
	$t_{max}$ (s)	393 [228-536]	189 <sup>a</sup> [163-438]	254 [248-316]	110% [100-174%]	118% [95-169%]	125% [37-171%]	134% [117-174%]	101% [69-127%]	66% [13-95%]
CD8	AUC (U)	831 [727-950]	840 [738-996]	727 [680-753]	92% <sup>c</sup> [87-98%]	83% <sup>d</sup> [79-93%]	93% <sup>e</sup> [91-95%]	86% <sup>c</sup> [82-91%]	90% <sup>d</sup> [86-95%]	95% <sup>e</sup> [93-96%]
	Max (rpv)	1,462 [1,260-2,041]	1,709 [1,336-1,899]	1,194 [1,154-1,349]	92% <sup>c</sup> [87-97%]	86% <sup>d</sup> [75-89%]	87% <sup>e</sup> [74-88%]	84% [69-89%]	85% <sup>d</sup> [82-93%]	91% <sup>e</sup> [89-99%]
	$t_{max}$ (s)	326 [205-478]	364 [265-503]	439 [338-566]	84% [68-125%]	63% <sup>d</sup> [47-103%]	88% <sup>e</sup> [68-98%]	108% [68-156%]	91% [56-123%]	77% [77-95%]

**10. táblázat: A kalcium beáramlás kinetikájának Slope értékei egészséges önkéntesek, valamint IFN bétával vagy anélkül kezelt sclerosis multiplexes betegek limfocitáiban, a kálium csatornák gátlószereinek alkalmazása nélkül**

Adatok: medián [kvartilis]. <sup>a</sup> IFN bétával nem kezelt SM-es betegek mintáit hasonlítottuk egészségesek mintáihoz,  $p < 0,05$ , <sup>b</sup> IFN bétával kezelt SM-es betegek mintáit hasonlítottuk IFN bétával nem kezelt SM-es betegek mintáihoz,  $p < 0,05$

Sejttípus	Egészséges	IFN b nélkül	IFN bétával
CD4	0,003 [0,002-0,007]	0,005 <sup>a</sup> [0,002-0,013]	0,002 <sup>b</sup> [0,001-0,012]
Th1	0,005 [0,002-0,007]	0,010 <sup>a</sup> [0,008-0,021]	0,001 <sup>b</sup> [0,001-0,001]
Th2	0,002 [0,001-0,006]	0,006 <sup>a</sup> [0,004-0,013]	0,006 [0,004-0,053]
CD8	0,004 [0,002-0,021]	0,004 [0,002-0,011]	0,002 [0,001-0,010]

Megvizsgáltuk a Kv1.3 csatorna elleni antitest medián fluoreszcencia értékeit a limfocitákon mindhárom csoport esetében. Ez az érték csökkent a CD4 és a Th2 sejtek esetén az IFN bétával nem kezelt SM-es csoportban egészségesekhez viszonyítva (40 [29-49] vs. 18 [9-23], valamint 67 [34-73] vs. 33 [23-46], medián [kvartilis],  $p < 0,05$ ), a CD8 és Th1 sejtek esetén azonban nem volt szignifikáns különbség.

**6.6. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK 1-ES TÍPUSÚ DIABETESBEN**

Egészséges személyek limfocitáival összehasonlítva T1DM-ben kisebb  $t_{max}$  értékeket mértünk a teljes limfocita populációt, valamint a Th1 sejteket vizsgálva. Ez, SM-hez hasonlóan, a limfociták fokozott reaktivitásával magyarázható az autoimmun reakció fennállása miatt (**11. táblázat**).

Egészséges személyek mintáit vizsgálva Th1 sejtekben az AUC és a Max értékeket csupán a TRAM kezelés csökkentette, míg Th2 sejtekben mind a MGTX, mind a TRAM. A teljes limfocita populációban, valamint CD4 és CD8 sejtekben szintén mindkét gátlószer csökkentette az AUC és a Max értékeket.

T1DM-ben szintén mindkét gátlószer csökkentette az AUC és a Max értékeket a teljes limfocita populációban. Th1 sejtekben ezeket az értékeket a TRAM helyett azonban a MGTX csökkentette.

**11. táblázat: A margatoxin (MGTX) és a triarilmetán (TRAM) hatásai a kalcium beáramlás kinetikájának paramétereire egészséges önkéntesek, valamint 1-es típusú diabeteses betegek limfocitáiban (folytatás a következő oldalon)**

		Kezeletlen		MGTX (60 nM)				TRAM (60 nM)			
Sejttípus		Egészséges (n=9)	T1DM (n=9)	Egészséges (n=9)		T1DM (n=9)		Egészséges (n=9)		T1DM (n=9)	
Ly	AUC (U)	891 [684-1338]	963 [750-1168]	710* [608-878]	-20 %	715 <sup>s</sup> [668-788]	-26 %	657* [338-887]	-26 %	751 <sup>s</sup> [636-959]	-22 %
	Max (rpv)	1,661 [1,199-2,748]	1,787 [1,358-2,263]	1,267* [1,058-1,627]	-24 %	1,295 <sup>s</sup> [1,16-1,509]	-28 %	1,163* [1,003-1,723]	-30 %	1,326 <sup>s</sup> [1,110-1,805]	-26 %
	t <sub>max</sub> (s)	567 [201-1356]	392 <sup>†</sup> [138-700]	490 [172-866]	ns	237 [162-546]	ns	280 [142-810]	ns	355 [119-975]	ns
Th1	AUC (U)	880 [650-1092]	968 [787-1244]	770 [626-1008]	ns	735 <sup>s</sup> [690-805]	-24 %	699* [569-882]	-21 %	833 [673-1128]	ns
	Max (rpv)	1,669 [1,173-2,214]	1,860 [1,371-2,767]	1,416 [1,108-1,848]	ns	1,334 <sup>s</sup> [1,238-1,591]	-28 %	1,262* [0,979-1,774]	-24 %	1,575 [1,188-2,078]	ns
	t <sub>max</sub> (s)	582 [162-1398]	126 <sup>†</sup> [110-562]	319 [160-613]	ns	220 <sup>s</sup> [133-543]	+75 %	373 [36-1147]	ns	185 [90-602]	ns
Th2	AUC (U)	777 [667-1603]	772 [569-1161]	644* [591-777]	-17 %	648 <sup>s</sup> [224-749]	-16 %	653* [582-823]	-16 %	772 [632-972]	ns
	Max (rpv)	1,626 [1,208-3,914]	1,578 [1,160-2,233]	1,156* [1,028-1,566]	-29 %	1,115 <sup>s</sup> [0,742-1,333]	-29 %	1,144* [1,005-1,550]	-30 %	1,470 [1,170-2,034]	ns
	t <sub>max</sub> (s)	586 [207-1220]	493 [163-573]	517 [210-654]	ns	421 [198-590]	ns	482 [91-736]	ns	403 [177-971]	ns
CD4	AUC (U)	824 [690-1416]	811 [720-1128]	707* [608-833]	-14 %	683 <sup>s</sup> [617-729]	-16 %	648* [588-840]	-20 %	734 <sup>s</sup> [591-829]	-9 %
	Max (rpv)	1,627 [1,206-3,194]	1,554 [1,292-2,337]	1,301* [1,045-1,612]	-20 %	1,218 <sup>s</sup> [1,058-1,966]	-22 %	1,153* [0,994-1,569]	-29 %	1,331 <sup>s</sup> [1,015-1,671]	-14 %
	t <sub>max</sub> (s)	575 [210-884]	439 [182-603]	436 [180-821]	ns	316 [216-585]	ns	355 [152-702]	ns	392 [186-668]	ns
CD8	AUC (U)	950 [721-1889]	927 [684-1388]	756* [600-943]	-20 %	667 <sup>s</sup> [232-817]	-28 %	777* [586-1010]	-18 %	782 [649-937]	ns
	Max (rpv)	1,912 [1,260-4,280]	1,758 [1,216-2,600]	1,487* [1,024-1,918]	-22 %	1,202 <sup>s</sup> [0,612-1,505]	-32 %	1,404* [1,004-1,959]	-27 %	1,480 [1,215-1,917]	ns
	t <sub>max</sub> (s)	523 [125-985]	281 [128-730]	339 [195-584]	ns	351 [118-536]	ns	265 [161-963]	ns	432 [133-750]	ns

**11. táblázat**

Adatok: medián [tartomány]. † T1DM-es kezeletlen mintákat hasonlítottuk egészségesek kezeletlen mintáihoz,  $p < 0,05$ , \* egészségesek MGTX és TRAM kezelt mintáit hasonlítottuk egészségesek kezeletlen mintáihoz,  $p < 0,05$ , § T1DM-es MGTX és TRAM kezelt mintákat hasonlítottuk T1DM-es kezeletlen mintákhoz,  $p < 0,05$ . AUC – görbe alatti terület,  $L_y$  – teljes limfocita populáció, ns – nem szignifikáns, rpv – relative parameter value,  $t_{max}$  – a maximum elérésének ideje

Továbbá T1DM-ben a Th2 és CD8 sejtek esetében is csupán a MGTX bizonyult hatásos gátlószernek. T1DM-ben tehát a vizsgált limfocita altípusok érzékenyebbek a Kv1.3 csatorna gátlására, mint egészséges személyek esetén.

Megvizsgáltuk a Kv1.3 csatorna elleni antitest medián fluoreszcencia értékeit a limfocitákon T1DM-ben egészségesekhez hasonlítva. Ez az érték magasabb volt T1DM-ben a teljes limfocita populáció és a Th1 sejtek esetén (46 [18-62] vs. 78 [32-154], valamint 4 [1-41] vs. 41 [21-151], medián [tartomány],  $p < 0.05$ ).



## 7. MEGBESZÉLÉS

### 7.1. A KALCIUM HÁZTARTÁS SZABÁLYOZÁSA EGÉSZSÉGESEKBEN RÖVID TÁVÚ LIMFOCITA AKTIVÁCIÓ SORÁN

Vizsgálataink során kinetikus áramlási citométeres módszerünket alkalmazva gátlószerek segítségével jellemeztük az ER kalcium ürítésének, a CRAC csatornáknak, az MCU, a SERCA és a PMCA transzport mechanizmusoknak a szerepét a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  szabályozásában a limfocita aktiváció korai szakasza (első 10 perce) során Th1 és Th2 limfocitákban.

Eredményeink jellegzetes különbségekre mutattak rá a kalcium beáramlás kinetikájában Th1 és Th2 sejtek között. A T limfocita aktiváció során létrejövő eltérő  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kinetika mintázatok eltérő módon befolyásolják a citokintermelést Th1 és Th2 sejtekben, a kalcium jel egyes elemeinek eltérései ugyanis különböző transzkripciós faktorok aktivációjával állnak összefüggésben [34, 35].

A sejten kívüli térből belépő kalcium általában véve nagyobb jelentőségű a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  megemelkedésében, mint az ER-ből felszabaduló kalcium, melynek mennyiségét hasonlóan találtuk a két sejttypusban. A CRAC csatornák dominanciájában azonban különbség mutatkozik a Th1 és Th2 sejtek között. A CRAC működésének hozzájárulása a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelkedéséhez nagyobb volt Th1 sejtek esetén. Ez szoros összefüggésben áll az MCU szabályozó szerepével. Méréseink alapján Th1 sejtekben ugyanis az MCU-n keresztül nagyobb a kalcium forgalma. Mivel a mitokondriumok több kalciumot vesznek fel a CRAC csatornák közelében, a negatív feedback alacsonyabb szintű Th1 sejtekben, ezért a CRAC csatornák aktívabban működnek. Ez a jelenség hozzájárul a Th2 sejtek általában vett alacsonyabb szintű kalcium beáramlásához a limfocita aktiváció során.

Az RR MCU-ra kifejtett hatásán túl az ER-ből való kalcium kiáramlás egyik leghatékonyabb inhibitora is (20  $\mu$ M feletti koncentrációban alkalmazva), gátolja ugyanis a ryanodin receptorokat. Az  $IP_3$ -mal ellentétben, amely tranziens  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelkedést vált ki, a ryanodin receptoron keresztüli ER kalcium ürítés fenntartott kalcium jelhez vezet [35]. A RR ezen tulajdonsága hozzájárulhat az AUC-t csökkentő hatásához [81, 82].

Már Fanger és mtsai. is felvetették, hogy a Th2 sejtek gyorsabb kalcium ürítésének legvalószínűbb oka a PMCA csatornák eltérő aktivitása [13]. Eredményeink alátámasztják ezt a feltételezést, amint az a CLX kezelés Th1 és Th2 sejtekre gyakorolt eltérő hatásán látszik. Egyéb vizsgálatok azt is megállapították, hogy a szabad kalcium többségét a PMCA távolítja el a citoplazmából [83].

A SERCA és PMCA csatornák működése T sejtekben finoman szabályozás alatt áll annak érdekében, hogy megfelelő legyen a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kinetikája az aktiváció során. A SERCÁ-nak már a sejtek nyugalmi állapotában fontos szerep jut a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  szabályozásában, mivel ellensúlyozza az ún. „kalcium leak”-et az ER-ből. Ezért ez a pumpa már rögtön a limfocita aktiváció elején, a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  megemelkedésekor működésbe lép mindkét vizsgált T sejt altípusban. Ezt tükrözi, hogy a SERCA gátlása a Slope értéket befolyásolja. Az ER  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  emelkedésének ellensúlyozásában betöltött szabályozó szerepe kifejezettebb Th2 sejtekben, és ez a mechanizmus gyorsabban aktiválódik ebben a sejtípusban. Az AUC érték növekedése nagyobb volt TG kezelés hatására a Th2 sejtekben, ami azt jelzi, hogy a SERCA ebben a sejtípusban nagyobb mennyiségű kalcium eltávolításában vesz részt. Ez összhangban áll Fanger és mtsai. korábbi eredményeivel [13]. Megállapítottuk tehát, hogy a SERCA csatorna fokozottabb működése, valamint a mitokondriális kalcium visszavétel kisebb aktivitása áll annak a ténynek a hátterében, hogy a Th2 sejtek, azonos aktiváló stimulus hatására, általánosságban véve alacsonyabb szintű limfocita aktiváción mennek keresztül (és részben ennek köszönhetően eltérő citokineket termelnek), mint a Th1 sejtek [2] (**9. ábra**).

Amint a Th1 sejtek esetében megállapítottuk, a SERCÁ-val ellentétben a PMCA-nak a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kinetikájának szabályozásában csak attól a fázistól van szerepe, amikor már megemelkedett a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , nem pedig rögtön a kalcium beáramlás kezdetétől. A PMCA így járul hozzá az eredeti  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  visszaállításához. Mindez abban tükröződik, hogy a PMCA gátlása csupán a Max értéket befolyásolta Th1 sejtekben, a Slope-ot azonban nem. A PMCA fő szabályozója a megemelkedett  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  [11]. Amint láthattuk, az ER kalcium visszavétele kifejezettebb Th2 sejtekben, ezért a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  itt nem fog olyan mértékben emelkedni, mint a Th1 sejtek esetén. Th2 sejtekben tehát ez az emelkedés nem lesz elégséges ahhoz, hogy a PMCA-t működésbe hozza a limfocita aktiváció vizsgált első 10 percében. Ezzel szemben Th1 sejtek esetén az ER kalcium visszavétel

kisebb mértéke miatt a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kellő mértékben fog emelkedni ahhoz, hogy aktiválja a PMCA-t. Összefoglalva, a limfocita aktiváció kezdetén a megemelkedett  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  csökkentésében jelentősebb az ER szerepe. Ez a mechanizmus aktívabban működik Th2 sejtekben. Az ER kezdeti kalcium felvétele fontos szabályozó hatással van a PMCA működésére. Ez a csatorna inkább a kalcium beáramlás csúcsán vesz részt a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  szint csökkentésében.

Finom különbségeket figyelhetünk meg a kalcium beáramlást szabályozó mechanizmusok működésében Th1 és Th2 sejtek között. Az eltérő kalcium jelátvitel, valamint a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  változás kinetikájának különbözősége fontos szereppel bírhat abban, hogy ez a két sejtpopuláció eltérő típusú citokineket termel. A kiváltott kalcium jel különböző tulajdonságai nagymértékben befolyásolják az egyes citokinek génjeinek átírását. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy a kalcium beáramlás kinetikájának milyen tulajdonságokkal kell bírnia az adott típusú citokinek termeléséhez. Ezek az eredmények feltehetőleg az immunmoduláció új módszereinek kidolgozásához is hozzájárulhatnak, melyek a kalcium ürítés mechanizmusaira hatnak a limfocita aktiváció során Th1 és Th2 sejtekben. Ez a megközelítés terápiás szempontból is hasznossá válhat az immunmediált kórképek, így többek között az autoimmun betegségek gyógyításában.

## 7.2. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGESEKBEN

Amint az irodalmi áttekintésben láthattuk, a limfocita aktiváció folyamatában a kálium csatornák játsszák a főszerepet abban, hogy folyamatos legyen a kalcium beáramlás, mivel lehetővé teszik, hogy kálium távozzon a sejtől, ezáltal fenntartva a kalcium belépéséhez szükséges elektrokémiai potenciálkülönbséget [3]. Korábbi vizsgálatok eredményei [59] azt is felvetették, hogy a kálium csatornák specifikus gátlásával elérhető az egyes limfocita altípusok szelektív befolyásolása, ami új terápiás lehetőséget jelenthet az autoimmun betegségek kezelésében.

Egészséges önkénteseknél feltűnő különbséget találtunk a Th1 és Th2 sejtípusok között az IKCa1 csatorna gátlása iránti érzékenységben. A TRAM, az IKCa1 csatorna specifikus gátlószere kisebb mértékben csökkentette a kalcium beáramlást a Th2

sejtekben, mint a Th1 sejtekben (**9. táblázat**). Ezek az eredmények összhangban állnak a korábban Fanger és mtsai. által patch clamp technikával kapott adatokkal, melyek szerint az IKCa1 csatornán keresztüli ionáram kisebb mértékű a Th2 sejtekben, mint a Th1 sejttypusban. Ehhez a jelenséghez hozzájárulhat az is, hogy a  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , amelynek el kell érnie egy küszöbértéket ahhoz, hogy aktiválni tudja az IKCa1 csatornákat, gyorsabban növekszik a Th1, mint a Th2 sejttypusban. Ez pedig annak a következménye, hogy a SERCA pumpa, amely a kalcium endoplazmába való visszavételért felelős, aktívabb a Th2 sejttypusban [13]. Az IKCa1 csatornákkal ellentétben a Kv1.3 csatornák gátlása esetén a Th2 sejttypusnál csökkent nagyobb mértékben a kalcium beáramlás a Th1 sejtekhez viszonyítva. A Th1 sejtekben a kalcium beáramlás tehát kevésbé volt érzékeny a Kv1.3 csatornák gátlására. Összességében tehát nagyobb mennyiségű kálium hagyja el kompenzatorikusan a sejtet a kálium csatornákon keresztül a limfocita aktiváció során a Th1 sejttypusban a Th2 sejttypushoz képest. Ez az extracelluláris térből nagyobb mennyiségű kalcium beáramlását teszi lehetővé. A kétféle csatorna aktivitásában tapasztalható különbség a két sejttypus esetén hozzájárulhat az eltérő citokintermelési profilhoz [34, 35].

Egészséges önkéntesek esetén a CD8 sejtek érzékenyebbek voltak az IKCa1 csatornák gátlására, mint a CD4 sejtek, így a TRAM hatására nagyobb mértékű csökkenést figyelhettünk meg az AUC értékekben. Nem volt azonban szignifikáns különbség a CD4 és CD8 sejtek között a feszültségfüggő csatornák gátlását vizsgálva.

### 7.3. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK ÚJSZÜLÖTTKORBAN

Vizsgálataink arra utalnak, hogy a T sejtek PHA-val történő aktivációját követő kalcium beáramlás eltérő képet ölt újszülöttkorban felnőttekhez hasonlítva. Az alacsonyabb AUC, Max és  $t_{max}$  értékek alátámasztják, hogy újszülöttek limfocitáiban kisebb szintű a rövidtávú aktiváció, illetve a hozzá társuló intracelluláris kalcium beáramlás kinetikája. Ez összhangban áll korábbi vizsgálatok eredményeivel [43], valamint a széles körben ismert ténnyel, hogy az újszülöttek kisebb mértékű immunválasszal reagálnak különböző stimuláló hatásokra.

A  $t_{\max}$  érték szintén alacsonyabb a Th1 és Th2 szubpopulációkban, kifejezettebben a Th1 sejtekben, amely alapján arra következtethetünk, hogy ez az alcsoport gyorsabban aktiválódik PHA stimulusra. Ezek szerint úgy tűnik, hogy az újszülöttek T helper sejtjei gyorsabban aktiválódnak akkor, ha pro-inflammatorikus válaszra van szükség, mint ha anti-inflammatorikus reakció szükséges. Felmerül tehát, hogy újszülött korban a pro-inflammatorikus válasz könnyebben alakul ki, míg az anti-inflammatorikus állapot nehezebben jön létre. Ezt a feltevést nem támasztják alá az egereken végzett kísérleti adatok, mivel az újszülött egerekben a Th2 funkció dominál a Th1 funkció fölött [84, 85]. Az azonban nem ismert, hogy egerekben vajon gyorsabb válasszal is társul-e ez a dominancia.

Vizsgálataink során szelektív módon gátoltuk a Kv1.3 és IKCa1 csatornákat, és megállapítottuk, hogy a fő limfocita altípusok rövidtávú aktivációja kisebb mértékben változik újszülöttek esetén, mint felnőttekben. Ez az eredmény arra utal, hogy az újszülöttek limfocitái kevésbé érzékenyek a kálium csatornák specifikus gátlására felnőttekből izolált limfocitákkal összehasonlítva. Elméletileg ez a kisebb szintű érzékenység a kálium csatornák funkcionális éretlenségéből és/vagy alacsonyabb expressziójából adódhat. Ennek a kérdésnek az eldöntésére megvizsgáltuk a Kv1.3 csatornák expresszióját, és felnőttekhez képest emelkedett értékeket mértünk az újszülöttek CD4, CD8 és Th2 limfocitáin. A gátlószeres kezelés iránti kisebb szintű érzékenység a magasabb expressziós értékekkel kombinálva arra utal, hogy a limfociták Kv1.3 kálium csatornáit funkcionálisan éretlenek újszülöttkorban.

Hasonló jelenséget figyeltünk meg az IKCa1 csatornák specifikus gátlása esetében is. A kereskedelmi forgalomban e csatornák elleni antitest egyelőre nem kapható, így e csatornák expresszióját ezzel a módszerrel nem tudtuk megvizsgálni. Adataink azonban indirekt bizonyítékkal szolgálnak az IKCa1 csatornák funkcionális éretlenségére. Újszülöttek limfocitáiban szignifikánsan emelkedett intracelluláris bazális kalciumszinteket mértünk. Ennek a jelenségnek egyik lehetséges magyarázata az újszülöttkori vörösejtek kalciumürítő mechanizmusainak éretlensége, beleértve a PMCA éretlenségét. Ezt a megfigyelést korábban újszülöttek vörösvérsejtjeiben írták le kutatócsoportunk munkatársai [86]. Az emelkedett bazális kalciumszint növeli az immunsejtek excitabilitását, citokin termelését [87], valamint az IKCa1 csatornák funkcionalitását is [2]. Az alacsonyabb szintű excitabilitás és az IKCa1 csatornák

gátlása iránti kisebb szintű érzékenység az emelkedett bazális kalciumszinttel társulva az újszülöttek limfocitáiban arra utal, hogy – a Kv1.3 csatornához hasonlóan – az IKCa1 csatornák is funkcionálisan éretlenek.

A kálium csatornák funkcionális éretlenségének jelei az összes vizsgált főbb limfocita-altípusban (Th1, Th2, CD4, CD8) kimutathatóak voltak. Újszülöttek esetén az egyetlen alpopuláció, melynek a rövidtávú aktivációját szignifikánsan gátolta mind a Kv1.3, mind az IKCa1 csatorna specifikus gátlószere, a CD8 sejtek voltak. Azonban még e sejtek esetében is megfigyeltük, hogy a Kv1.3 csatornák emelkedett expressziója ellenére, a gátlás mértéke nem érte el a felnőtteknél megfigyelt szintet. Mindez arra utal, hogy megfigyeléseink általánosan jellemzőek a vizsgált limfocita altípusokban.

#### 7.4. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK EGÉSZSÉGES TERHESSÉGBEN ÉS PREECLAMPSIÁBAN

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az aktivált T limfociták kalcium beáramlási kinetikájában jelentős eltérések mutatkoznak egészséges terhesség során a nem terhes állapothoz képest: az AUC értékek alacsonyabbak a Th1, CD4 és CD8 limfocita szubpopulációkban egészséges terhesség során. Ezen megfigyelés alapján ésszerű feltételezni, hogy a terhesség során a foetalis antigének ellen kialakuló fiziológias immuntolerancia részben az alacsonyabb szintű kalcium válasznak tulajdonítható. Ezt a feltevést támasztja alá a Th1 és CD8 limfocita altípusok károsodott funkciójának kitüntetett szerepe az anyai immuntoleranciában [88]. A Th1 sejtekkel szemben, az aktiváció által kiváltott kalcium válasz nem csökkent a Th2 alcsoportban a nem terhes állapothoz képest. A Th1 alcsoport csökkent aktivációja (amelyet vizsgálatunkban az alacsonyabb AUC érték jelöl) és a Th2 sejtek megtartott aktivációja részben szerepet játszhatnak az egészséges terhesség során kialakuló Th2 túlsúlyban [51-53].

Az egészséges várandósoktól eltérően a PE-ban szenvedő terhesekben nem észleltünk csökkent aktivációt, azaz csökkenést az AUC értékben a Th1 és CD8 sejtek esetében a nem terhes állapothoz képest. Az egészséges terhességre jellemző kalcium beáramlás jellegzetességeinek hiánya alapján felmerül, hogy ezek a sajátságok összefüggésben állhatnak az elégtelen anyai immuntoleranciával, amely PE-ban tapasztalható, mivel a vizsgálati eredmények a nem terhes mintákéhoz hasonlóak [88]. A PE-s betegekben a

Th1 limfociták megtartott aktivációs tulajdonságai valójában a normál terhesség során megjelenő Th2 dominancia hiányával lehetnek összefüggésben. A Th1 szubpopulációhoz hasonlóan a CD8 sejtekben sem tapasztalható aktiváció csökkenés PE-s betegekben, ennek megfelelően a citotoxikus aktivitás csökkenése, amely az egészséges terhesség során kialakul, preeclapmsiában nem jön létre [89, 90].

Érdekes módon a  $t_{max}$  értékek csökkentek a Th2 és CD4 limfocitákban a PE-s betegekben az egészséges terhesekhez képest. Ez az eredmény jelentheti a limfociták fokozott reaktivitását PE-ban, lehetséges következményeként a folyamatosan zajló anyai szisztémás gyulladásnak.

Mivel a Kv1.3 és IKCa1 kálium csatornák jelentősen befolyásolják az aktivációval kiváltott kalcium választ, ezért specifikus antitestek alkalmazásával megvizsgáltuk sejtfelszíni expressziójukat is egészséges terhesekben valamint PE-sokban. A minták Kv1.3 ellenes antitestekkel történő jelölése után összehasonlítható fluoreszcens értékeket kaptunk, ami arra enged következtetni, hogy nem mutatható ki különbség a sejtfelszíni expresszióban egyetlen vizsgált limfocita altípus esetén sem. Következésképpen a kálium csatornák gátlása után a kalcium beáramlás kinetikájában tapasztalt különbségek a nem terhes, egészséges terhes illetve PE-s minták esetében valószínűleg a csatornák megváltozott működésének, és nem az expresszió (azaz a csatornák mennyiségének) változásának az eredménye.

Vizsgálati eredményeink alapján megállapítható, hogy a teljes limfocita populáció, illetve legkifejezettebben a CD4 szubpopuláció érzékeny MGTX és TRAM gátlásra valamennyi vizsgálati csoport esetében, amely tisztán jelzi a Kv1.3 és IKCa1 csatornák meghatározó szabályozó szerepét a kalcium beáramlásban. A gátlás az AUC és Max értékek csökkenésében tükröződik a kezeletlen mintákhoz képest. Mindazonáltal a kalcium beáramlás érzékenysége a többi vizsgált limfocita szubpopulációban jelentős változatosságot mutat. Különösen érdekes, hogy a Th2 limfociták kalcium beáramlása egészséges terhesekben érzéketlen volt a kálium csatornák gátlásra, míg a nem terhes mintákban a specifikus csatornablokkolók hatására jelentősen csökkent a kalcium beáramlás mértéke. Figyelemreméltó, hogy PE-ban a Th2 sejtek nem terhes jellegzetességeket mutattak, és MGTX, valamint TRAM kezelésre is érzékenyek voltak. Mivel eredményeink alapján a Kv1.3 és IKCa1 csatornák kalcium beáramlásra kifejtett szabályozó hatása korlátozott terhességben (mivel a csatornák gátlása nem

eredményezett csökkenést az AUC és Max értékekben), könnyen levonható a következtetés, hogy ez a tényező részben felelős lehet az egészséges terhesség során bekövetkező Th2 eltolódásért, ami a hiányzik PE-ban. Ezt a feltevést támasztják alá azon vizsgálatok, melyek szerint a kalcium beáramlási görbe alakja, amelyet a kálium csatornák befolyásolnak, meghatározza az egyes T helper sejttípusok citokintermelési profilját [34, 35].

További eltérések is megfigyelhetők egészséges várandósok és PE-sok között. Amíg a kalcium beáramlás CD8 és Th1 sejtekben érzéketlen volt a kálium csatornák gátlásra PE-ban, addig egészséges terhességben ezek a szubpopulációk érzékenyek voltak. Ez az érzéketlenség PE-ban összefüggésben állhat a kialakuló Th1 túlsúllyal.

A  $t_{max}$  értékek, amelyek a limfocita aktiváció időbeni lefolyását jellemzik, nem változtak a gátlás hatására egyik vizsgált csoportban sem. Ez az eredmény jól tükrözi azt a megállapítást, hogy sokkal inkább a belépő kalcium mennyisége, nem pedig a belépés sebessége az, ami megváltozik a kálium csatorna blokkolók hatására terhességben.

## 7.5. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK SCLEROSIS MULTIPLEXBEN

Korábbi vizsgálatok során már megfigyelték SM-ben, hogy a fennálló autoimmun reakció miatt a CD4 sejtek preaktivált állapotban vannak. Buntinx és mtsai. kimutatták, hogy SM-es betegek perifériás T sejtei alacsonyabb koncentrációjú PHA hatására aktiválódnak IFN gamma jelenlétében, ami magasabb szintű reaktivitást jelez [91]. Jelen vizsgálatunkban a fokozott reaktivitást a  $t_{max}$  érték csökkenése jelzi SM-ben egészséges önkéntesekhez viszonyítva, azaz a kalcium beáramlás hamarabb éri el maximumát a CD4, Th1 és Th2 sejttípusok esetén. A Slope értékben mérhető növekedés is ezt támasztja alá. Érdekes, hogy ezek az eltérések a CD4 sejtekre korlátozódtak és nem voltak jelen a CD8 sejttípus esetén. Míg a kalcium beáramlás kinetikája megváltozik, az AUC és Max értékek összehasonlítása során kiderült, hogy a limfocitákba beáramló kalcium mennyisége nem különbözik SM-ben egészségesekhez viszonyítva.

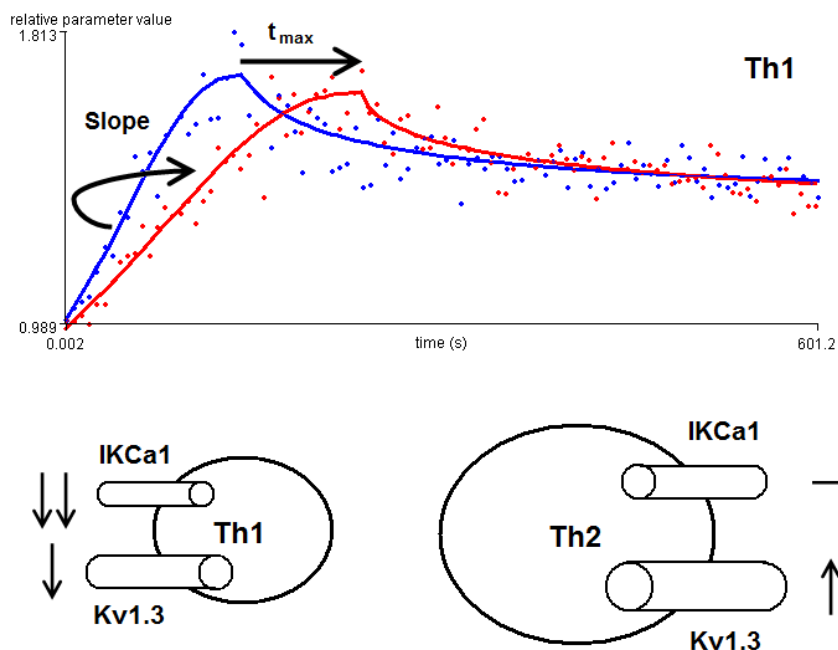


Az egészséges önkéntesekhez képest a SM-es betegek esetén a vizsgált limfocita altípusok eltérően reagáltak a Kv1.3 és IKCa1 csatornák gátlására. Az IKCa1 csatorna gátlásával a vizsgált altípusok közel azonos mértékben voltak gátolhatóak. Azonban a MGTX, a Kv1.3 csatorna specifikus gátlószere nagyobb mértékben csökkentette az AUC értéket a CD8, mint a CD4 sejteknél. Ez ellentétben áll azzal, hogy egészséges önkéntesek esetén nem volt ilyen kimutatható különbség. A Kv1.3 csatornák hozzájárulása a kalcium beáramlás szabályozásához tehát megnövekedett a CD8 altípusban SM-ben. A Kv1.3 csatorna specifitása a CD8 sejtekre korlátozódik, mivel a többi sejttípus, így a Th1 és Th2 sejtek is, hasonló módon reagálnak a Kv1.3 csatornák gátlására.

Korábbi vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a limfocita aktiváció szelektív befolyásolása a kálium csatornák specifikus gátlásával új terápiás lehetőséget jelenthet SM-ben [33, 59, 92-95]. Idáig nem állt azonban adat rendelkezésre arról, hogy ez a módszer milyen hatással van a limfociták fő típusainak (CD4, CD8, Th1 és Th2 sejtek) aktivációjára ebben a kórképben. Eredményeink alapján elmondható, hogy a CD8 sejtek érzékenysége a Kv1.3 csatornák gátlására megnövekedett SM-ben a CD4 sejtekhez viszonyítva (-17% vs. -7% az AUC értékben). Ez az eredmény azon ismeretek tükrében értelmezhető, melyek a TEM sejtek SM-ben betöltött szerepét támasztják alá.

Amint korábban említettük, Beeton és mtsai. kimutatták, hogy a TEM sejtek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a SM pathogenezisében [59]. Bár a Kv1.3<sup>high</sup> IKCa1<sub>low</sub> kálium csatorna fenotípus mind a CD4 mind a CD8 TEM sejtekre jellemző, feltételezhetjük, hogy a TEM sejtek többsége CD8 sejt, mivel a TEM sejtek azonnali effektor funkciót mutatnak. Ez magyarázhatja a CD8 sejtek megnövekedett érzékenységét a Kv1.3 csatornák gátlása iránt SM-ben. Ennek következtében a CD4-CD8 sejtek tekintetében kimutattuk, hogy a szelektív immunmoduláció előnyös lehet a SM terápiájában, a CD8 effektor limfociták ugyanis jobban gátolhatóak MGTX kezeléssel, mint a CD4 sejtek. Ez a specifitás azonban nem figyelhető meg a CD4 altípusban, mivel eredményeink azt mutatják, hogy a Th1 és Th2 sejttípus közel azonos mértékben volt gátolható a Kv1.3 csatornák vizsgálva. Mivel a citokintermelés különös fontosságú az autoimmun reakciók szabályozásában, a gyulladást csökkentő Th2 sejtek gátlása valószínűleg nem kedvezne az autoimmun folyamat visszaszorításának.

Megfigyeléseink alapján több eltérés is jellemző az IFN bétával kezelt és a nem kezelt SM-es betegek limfocitáinak kalcium beáramlási kinetikájában és az alkalmazott gátlószerek iránti érzékenységében. Az IFN bétával nem kezelt SM-es betegek mintáiban összehasonlítható Slope értékeket mértünk a Th1 és Th2 altípusokon. Az IFN bétával kezelt SM-es betegeknél a Th1 sejtek esetében a Slope érték csökkent, míg a  $t_{max}$  érték emelkedett a nem kezeltkezhöz hasonlítva, és ezek a paraméterek közel megegyező értéket értek el, mint egészséges önkéntesek esetén (**12. ábra**). Úgy tűnik tehát, hogy összefüggés áll fenn az IFN béta kezelés és a limfocita aktiváció, valamint a kalcium beáramlás kinetikája között a Th1 sejtípusban, a Th2 sejtípusban azonban nem. Ez előnyös a SM terápiájában, mivel csökken a pro-inflammatorikus citokinek szekréciója, de nem befolyásolja az anti-inflammatorikus citokinek termelését, ami kompenzálja a fennálló gyulladásos folyamatot.



**12. ábra: Az IFN béta vizsgálatunk során megfigyelt immunmoduláns hatásai sclerosis multiplexben**

A Th1 (de nem a Th2) sejtekben az IFN bétával kezelt SM betegek esetén (piros görbe) magasabb  $t_{max}$  értéket és csökkent Slope értéket mértünk IFN béta kezelésben nem részesülő SM betegekhez képest (kék görbe). Az IFN béta a kálium csatornák működését is elsősorban a Th1 sejtípusban befolyásolja SM-ben. Az IKCa1 csatorna működését nagyobb mértékben csökkenti ( $\downarrow\downarrow$ ), mint a Kv1.3 csatornáét ( $\downarrow$ ). Th2

sejtekben az IKCa1 csatorna működése nem változik (–), a Kv1.3 csatornáé pedig nő (↑) IFN béta kezelésben nem részesülő SM betegekhez hasonlítva.

Továbbá eredményeink alapján elmondható, hogy az IFN béta elsődlegesen a Th1 altípusban befolyásolja a Kv1.3 és IKCa1 csatornák működését is, és csak mérsékelten a Th2 sejttípus esetén. Míg az IFN béta a Th1 sejttípus esetén csökkenti mindkét csatorna működését (az IKCa1 csatornát nagyobb mértékben, mint a Kv1.3-at), a Th2 sejttípus esetén az IKCa1 csatorna működése nem változik, a Kv1.3 csatorna funkciója pedig nő az IFN bétával nem kezelt SM-es betegekhez hasonlítva (**12. ábra**). Ezek a mechanizmusok valószínűleg szintén hozzájárulnak az IFN béta citokintermelést csökkentő hatásához, elsősorban a Th1 altípus esetén. Megfigyeléseink az IFN béta idáig nem ismert terápiás hatását jelezhetik SM-ben.

## 7.6. A T LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJA ÉS A LIMFOCITA KÁLIUM CSATORNÁK 1-ES TÍPUSÚ DIABETESBEN

T1DM-ben Th1 sejtekben az AUC és a Max értékeket a TRAM helyett a MGTX csökkentette, Th2 sejtekben pedig csupán a MGTX csökkentette a kalcium beáramlást. A teljes limfocita populációban és a CD4 sejtekben, egészségesekhez hasonlóan, mindkét gátlószer hatásos volt, a CD8 sejtekben azonban ismét csupán a MGTX csökkentette az AUC és a Max értékeket. T1DM-ben tehát a limfociták érzékenyebbek a Kv1.3 csatornák gátlására, mint egészségesekben. Ennek hátterében az állhat, hogy a Kv1.3 csatornák expressziója megnövekedett a limfociták felszínén T1DM-ben. A T1DM limfociták megváltozott aktivációs kinetikáját részben magyarázhatja a Kv1.3 csatornák megnövekedett jelentősége. Megvizsgáltuk, hogy a Kv1.3 csatornák magasabb expressziója összefüggésbe hozható-e a fokozott reaktivitással (azaz a csökkent  $t_{max}$  értékekkel) T1DM-ben. Számottevő mértékű fordított korrelációt találtunk a Kv1.3 expresszió és a  $t_{max}$  értékek között egészségesek és T1DM betegek mintáit összevontan vizsgálva mind a Th1 sejtekben ( $r = -0,59$ ;  $p = 0,01$ ), mind a teljes limfocita populációban ( $r = -0,49$ ;  $p = 0,04$ ). A Kv1.3 csatornák expressziójának és működésének tehát fontos hatása van a kalcium beáramlás kinetikájára.

Eredményeink rámutatnak, hogy a Kv1.3 csatornák gátlásával befolyásolható a limfocita aktiváció T1DM-ben. E csatornák megnövekedett jelentősége azonban nem

kizárólagosan jellemző egy adott limfocita altípusra, hanem több alpopulációt jellemez T1DM-ben. A limfociták kálium csatornáinak gátlásával, mint lehetséges immunmoduláns terápiás beavatkozással kapcsolatban eddig csupán korlátozott mértékben álltak rendelkezésre adatok arra vonatkozóan, hogy az alkalmazott gátlószerek milyen hatással vannak a teljes limfocita populáció és a főbb alcsoportok aktivációjára emberben. Eredményeink rámutatnak arra, hogy a kalcium beáramlás fenntartásához mindkét vizsgált kálium csatorna hozzájárul mind T1DM-ben, mind SM-ben. A limfocita aktivációban betöltött önálló szerepük azonban a vizsgált limfocita altípustól, valamint attól függnek, hogy a minta egészséges személytől vagy T1DM, illetve SM betegről származik-e. Egészségesek esetében a Th1 sejttípus kivételével minden vizsgált alpopulációban mindkét csatorna gátlható volt. A Th1 sejtekben azonban csak az IKCa1 csatorna specifikus gátlószere volt hatásos. Ezen eredmény összhangban áll Fanger és mtsai. korábbi eredményével egér eredetű limfocitákban [13]. Korábbi vizsgálatok alapján [58, 92] feltételezték, hogy a MGTX kezelés elsősorban azon limfociták működését csökkentené, melyek a pancreas béta sejteinek károsításáért felelősek. Eredményeink azonban rávilágítottak arra, hogy a Kv1.3 csatornáknak minden limfocita altípusban jelentős a szerepe T1DM-ben, így Th2 sejtekben is, melyek ellensúlyozó tényezők a T1DM progressziójában az anti-inflammatorikus citokinek termelése révén [70]. Ezért a Kv1.3 csatornák gátlószereinek az alkalmazása nem kizárólag azokra a sejtekre hatna, melyek az autoimmun válaszáért felelősek T1DM-ben, hanem általában véve minden immunsejt aktivációs karakterisztikáját befolyásolják, ami előre nehezen megjósolható változásokat eredményezne. Ezért további vizsgálatok szükségesek a Kv1.3 csatornák gátlószereivel való kezelés hatásának leírására, és következményeinek megismerésére T1DM-ben.

## 7.7. ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS MÓDSZERÜNK ÁLTALÁNOS HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A kórosan működő limfocita altípusok más autoimmun kórképek kialakulásában is fontos szerepet játszanak. Attól függően, hogy mi az autoimmun reakció célpontja, különböző szervek, szervrendszerek betegedhetnek meg, eltérő kórképeket létrehozva. Az immunológiai megbetegedések egy másik csoportjában éppen az immunválasz, a

limfocita aktiváció elégtelensége okozza a problémát. Az immunhiányos állapotokban a szervezet különösen fogékonyá válik a fertőzések iránt, és megnő a tumorképződés kockázata is. Immunhiány nem csupán veleszületett módon, hanem külső hatásokra is kialakulhat. Elég csak az AIDS-re, vagy a szervtranszplantációt követően létrehozott immuntoleráns állapotra gondolni. Módszerünk azonban általánosan használható elsősorban immunmediált, de számos egyéb betegség vizsgálatában is a limfocita aktiváció megfigyelésére.

Újjonnan fejlesztett eljárásunk nagy előnye a vizsgálati beállítás rugalmassága. Mind a sejttípusok, mind a gátlószerek, mind a vizsgálni kívánt folyamat felcserélhető, attól függően, hogy mit kívánunk vizsgálni, és ennek megfelelően milyen módon készítjük elő mintáinkat.

Módszerünk nem csupán a kálium csatornák gátlószereinek, hanem különböző egyéb molekulák, gyógyszerek terápiás hatékonyságának nyomon követésére egyaránt alkalmas. Továbbá nem csak a jelenlegi vizsgálatokban bemutatott sejttípusok, hanem bármilyen egyéb limfocita altípus is vizsgálható, attól függően, hogy a sejtfelszíni festés során milyen markereket használunk a sejtek jelölésére. Funkcionális alapon sok egyéb limfocita altípust ismerünk, melyek szintén közreműködnek az autoimmun és egyéb immunológiai folyamatok szabályozásában. Módszerünk tehát új terápiás megközelítések kifejlesztésére nyújthat lehetőséget, amelyek az immunválasz modulálását célzottan tehetik lehetővé.

Eljárásunknak fontos szerepe lehet továbbá nem csupán a limfocita aktiváció vizsgálatában, hanem az alap kutatás egyéb területein is, ahol különböző sejten belüli folyamatok kinetikájának jellemzésére van szükség (például reaktív oxigénradikálok képződése). A vizsgált kinetikus paraméterek értékelésére, attól függően, hogy a megfigyelt mechanizmus milyen kinetikát követ, különböző matematikai függvények állnak rendelkezésre a FacsKin programba építve. A program automatikusan választja ki a mérés adataira legjobb illeszkedést biztosító függvényt. A függvény lehet konstans, növekvő vagy csökkenő logaritmus (logist+, logist-), illetve növekvő vagy csökkenő kettős logaritmus (dlogist+, dlogist-) [77, 96]. A program honlapján ([www.facsKin.com](http://www.facsKin.com)) részletes leírás olvasható a függvények jellemzőiről, illetve a program használatáról. A programot ezen a honlapon le is tölthetik az érdeklődők.

## 8. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A T limfocita aktiváció során az extracelluláris térből belépő kalcium nagyobb szerepet játszik a citoplazmatikus kalcium szint emelkedésében, mint az endoplazmás retikulumból felszabaduló kalcium. Az endoplazmás retikulumból felszabaduló kalcium mennyisége megegyezik Th1 és Th2 sejtekben. Az MCU, és részben ennek köszönhetően a CRAC csatornák alacsonyabb szintű működése, valamint a SERCA pumpa fokozott működése áll annak a ténynek a háttérében, hogy a Th2 sejtek azonos aktiváló stimulus hatására alacsonyabb szintű limfocita aktiváción mennek keresztül, mint a Th1 sejtek. A SERCA pumpa működése már a kalcium beáramlás kezdetén hozzájárul a citoplazmatikus kalcium szint csökkentéséhez, és szabályozza a PMCA pumpa működését. A PMCA pumpa az emelkedett kalcium szint csökkentéséhez a kalcium beáramlás csúcsától járul hozzá, és aktívabban működik Th1 sejtekben.
2. Egészséges személyek esetén a TRAM, az IKCa1 csatorna specifikus gátlószere kisebb mértékben csökkentette a kalcium beáramlást a Th2 sejtekben, mint a Th1 sejtekben. Ez részben arra vezethető vissza, hogy a citoplazmatikus kalcium szint, amelynek el kell érnie egy küszöbértéket az IKCa1 csatorna aktiválódásához, gyorsabban növekszik Th1, mint Th2 sejtekben. Az IKCa1 csatornákkal ellentétben a Kv1.3 csatornák gátlása esetén a Th2 sejttypusnál csökkent nagyobb mértékben a kalcium beáramlás a Th1 sejtekhez viszonyítva. A Th1 sejtekben a kalcium beáramlás tehát kevésbé volt érzékeny a Kv1.3 csatornák gátlására.
3. A kalcium beáramlás kinetikája alacsonyabb szintű újszülöttek T limfocitáiban, mint felnőtt T limfocitákban. Ebben fontos szerepet játszhat a limfociták kálium csatornáinak kisebb szintű működése. Az újszülöttek limfocitái kevésbé érzékenyek a kálium csatornák specifikus gátlására felnőttekből izolált limfocitákkal összehasonlítva. A Kv1.3 csatorna expressziója magasabb újszülöttek limfocitáin.
4. Egészséges terhességben csökken a kalcium beáramlás a Th1 és CD8 sejtekben, míg preeclampsziában nem. A Th2 sejtek kalcium beáramlása egészséges várandósokban

érzékeny volt a kálium csatornák gátlására, míg preeclampsziások esetén jelentősen csökkent a kalcium beáramlás mértéke a gátlás hatására. Egészséges várandós nőkben a limfociták kalcium beáramlási kinetikája és a kálium csatornák gátlószereire való érzékenysége specifikus mintázattal bír, amely hiányzik preeclampsziában. Ezek a tulajdonságok preeclampsziában a nem terhes állapothoz hasonlóak. A limfociták kalcium válaszában eltérései szerepet játszhatnak az egészséges terhesség során megjelenő immunológiai tolerancia kialakulásában.

5. A vizsgált autoimmun kórképekben és preeclampsziában a limfociták kalcium beáramlása hamarabb éri el csúcspontját, mint egészségeseknél. Ez a limfociták fokozott reaktivitásával állhat összefüggésben a fenti megbetegedésekben.
6. SM-ben elérhető a CD8 limfociták szelektív immunmodulációja a Kv1.3 csatornák gátlásával. Azonban a korábbi feltevésekkel ellentétben ez a szelektivitás nem eléggé specifikus az összes limfocita altípust vizsgálva, mivel az anti-inflammatorikus citokineket termelő Th2 sejtekre is hatással van az alkalmazott gátlószer, ami valószínűleg visszaesést jelentene a jelenlegi terápiás törekvésekben. SM-ben az IFN béta kezelés elsősorban a Th1 sejttípus kalcium beáramlási kinetikájában létrejövő kompenzatorikus változásokkal és e sejtek kálium csatornáinak működésével áll összefüggésben, azonban a Th2 sejttípus fokozott működését, és így a gyulladást csökkentő citokinek termelését kevésbé érinti.
7. A limfociták fokozott reaktivitása T1DM-ben összefüggést mutat a Kv1.3 csatornák magasabb expressziójával egészségesekhez képest. T1DM-ben a limfociták érzékenyebbek a Kv1.3 csatornák gátlására, mint egészségesekben. A Kv1.3 csatornák gátlásával befolyásolható a limfocita aktiváció T1DM-ben. E csatornák megnövekedett jelentősége azonban nem kizárólagosan jellemző egy adott limfocita altípusra.

## 9. ÖSSZEFOGLALÁS

*Háttér:* A kalcium beáramlás döntő szereppel bír a limfocita aktiváció folyamatában, kinetikájának vizsgálata ezért nélkülözhetetlen az immunstátusz jellemzésében mind fiziológias körülmények között, mind autoimmun betegségekben. A feszültségfüggő Kv1.3 és a kalcium-dependens IKCa1 limfocita kálium csatornák kiemelkedő szerepet játszanak a limfocita aktiváció szabályozásában.

*Célkitűzés:* Célunk volt, hogy újonnan fejlesztett kinetikus áramlási citométeres módszerünk segítségével leírjuk a Th1 és Th2 sejtek kalcium háztartásának szabályozásában fennálló különbségeket. Jellemezni kívántuk továbbá az aktiváció által kiváltott kalcium beáramlás kinetikáját a főbb limfocita alcsoportokban (így a Th1, Th2, CD4, CD8 sejtekben) újszülöttekben, egészséges várandósokban, preeclampsziában, sclerosis multiplexben, valamint 1-es típusú diabetesben, egészséges, nem várandós felnőttekhezhez hasonlítva. Célunk volt továbbá leírni azokat a változásokat, melyeket a Kv1.3 illetve IKCa1 csatornák szelektív gátlása hoz létre a limfocita aktiváció kinetikájában.

*Eredmények:* A mitokondriális kalcium felvétel, és részben ennek köszönhetően a CRAC csatornák kisebb szintű működése, valamint a SERCA pompa fokozott működése áll annak a ténynek a háttérében, hogy a Th2 sejtek azonos aktiváló stimulus hatására alacsonyabb szintű limfocita aktiváción mennek keresztül, mint a Th1 sejtek.

A kalcium beáramlás kinetikája alacsonyabb szintű újszülöttek limfocitáiban, mint felnőtt limfocitákban. Ebben fontos szerepet játszhat a limfociták kálium csatornáinak alacsonyabb szintű működése.

Egészséges várandós nőkben a limfociták kalcium beáramlási kinetikája és a kálium csatornák gátlószereire való érzékenysége specifikus mintázattal bír, amely hiányzik preeclampsziában. Ezek a tulajdonságok preeclampsziában a nem terhes állapothoz hasonlóak.

Sclerosis multiplexben elérhető a CD8 limfociták szelektív immunmodulációja a Kv1.3 csatornák gátlásával. Ez a szelektivitás azonban nem eléggé specifikus az összes limfocita altípust vizsgálva, mivel az anti-inflammatorikus citokineket termelő Th2 sejtekre is hatással van a gátlószer. Sclerosis multiplexben SM-ben az IFN béta kezelés



elsősorban a Th1 sejttípus kalcium beáramlási kinetikájában létrejövő kompenzatorikus változásokkal és e sejtek kálium csatornáinak működésével áll összefüggésben.

A Kv1.3 csatornák gátlásával befolyásolható a limfocita aktiváció 1-es típusú diabetesben. E csatornák megnövekedett jelentősége azonban nem kizárólagosan jellemző egy adott limfocita altípusra.

*Konklúzió:* Vizsgálataink során jellemeztük a citoplazmatikus szabad kalcium szint szabályozásának sajátosságait Th1 és Th2 sejtekben. Jellegzetes különbségeket mutattunk ki a kalcium beáramlás kinetikájában a vizsgált csoportokban egészséges, nem várandós felnőttekhezhez hasonlítva. Megfigyeltük továbbá a vizsgált csoportokban a Kv1.3 és IKCa1 csatornák gátlásának hatásait és működésük specifikus eltéréseit.

## 10. SUMMARY

*Background:* Calcium influx plays an essential role in the process of lymphocyte activation, therefore the investigation of its kinetics is indispensable for the characterization of the immune status both under physiological conditions and in autoimmune disorders. Voltage-gated Kv1.3 and calcium-dependent IKCa1 lymphocyte potassium channels play an important role in the regulation of lymphocyte activation.

*Aims:* Using our novel kinetic flow cytometry approach, we aimed to describe the differences in the regulation of calcium homeostasis between Th1 and Th2 cells. Furthermore, we aimed to characterize the kinetics of the activation-elicited calcium influx in major lymphocyte subsets (i.e. Th1, Th2, CD4 and CD8 cells) in neonates, healthy pregnancy, preeclampsia, multiple sclerosis and type 1 diabetes, compared to healthy, non-pregnant adults. We also aimed to describe the alterations in the kinetics of lymphocyte activation induced by the selective inhibition of Kv1.3 and IKCa1 channels.

*Results:* The lower activity of mitochondrial calcium uptake, and therefore of CRAC channels, along with the higher activity of the SERCA pump account for the notion that Th2 cells go through a lower level of lymphocyte activation compared with Th1 cells upon identical activating stimuli.

The kinetics of calcium influx is lower in neonatal than in adult lymphocytes. The lower activity of lymphocyte potassium channels may have an important role in this observation.

There is a characteristic pattern of calcium influx in lymphocytes and its sensitivity to potassium channel inhibition in healthy pregnancy that is missing in preeclampsia. These properties are more comparable to the non-pregnant state in preeclampsia.

Specific immunomodulation of the CD8 subset can be reached through inhibition of Kv1.3 channels in multiple sclerosis. However, this effect is not specific enough concerning all lymphocyte subsets influencing the autoimmune response, since it also affects anti-inflammatory Th2 cells. IFN beta treatment is related to compensatory changes in calcium influx kinetics and lymphocyte potassium channel function in MS primarily in the Th1 subset, shaping these properties more similar to those of healthy individuals.

Lymphocyte activation can be modulated via the inhibition of Kv1.3 channels in type 1 diabetes. However, the increased significance of these channels is not exclusive for a specific lymphocyte subset, but is characteristic for each subset investigated.

*Conclusion:* We described the properties of the regulation of cytoplasmic calcium level in Th1 and Th2 cells in our investigations. We demonstrated characteristic differences in the kinetics of calcium influx in the investigated study groups in comparison with healthy, non-pregnant adult subjects. Furthermore, we observed the effects of Kv1.3 and IKCa1 channel inhibition and the specific alterations in their activity in our study groups.

**11. IRODALOMJEGYZÉK**

1. Vig M, Kinet JP. Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol.* 2009;10:21-27.
2. Crabtree GR, Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem.* 1994;63,1045-1083.
3. Panyi G. Biophysical and pharmacological aspects of K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes. *Eur Biophys J.* 2005;34:515-529.
4. Zweifach A, Lewis RS. Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:6295-6299.
5. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:690-702.
6. Parekh AB. Functional consequences of activating store-operated CRAC channels. *Cell Calcium.* 2007;42:111-121.
7. Gilibert JA, Parekh AB. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2<sup>+</sup>) current I(CRAC). *EMBO J.* 2007;19:6401-6407.
8. Hoth M, Fanger CM, Lewis RS. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol.* 1997;137:633-648.
9. Quintana A, Schwarz EC, Schwindling C, Lipp P, Kaestner L, Hoth M. Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *J Biol Chem* 2006;281,40302-40309.
10. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol.* 2000;529,57-68.
11. Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E. The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys.* 2008;476,65-74.
12. Lewis RS. Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:925-929.
13. Fanger CM, Neben AL, Cahalan MD. Differential Ca<sup>2+</sup> influx, K<sub>Ca</sub> channel activity, and Ca<sup>2+</sup> clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *J Immunol.* 2000;164,1153-1160.

14. Matteson DR, Deutsch C. K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature*. 1984;307:468-471.
15. Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD. Calcium activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol*. 1993;102:601-630.
16. Cai YC, Osborne PB, North RA, Dooley DC, Douglass J. Characterization and functional expression of genomic DNA encoding the human lymphocyte type *n* potassium channel. *DNA Cell Biol*. 1992;11:163-172.
17. Chandy KG. Simplified gene nomenclature [letter]. *Nature*. 1991;352:26.
18. Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998;280:69-77.
19. Pahapill PA, Schlichter LC. Modulation of potassium channels in intact human T lymphocytes. *J Physiol (Lond)*. 1992;445:407-430.
20. Panyi G, Sheng Z-F, Tu L-W, Deutsch C. C-type inactivation of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J*. 1995;69:896-904.
21. Lee SC, Deutsch C. Temperature dependence of K<sup>+</sup>-channel properties in human T lymphocytes. *Biophys J*. 1990;57:49-62.
22. Bowlby MR, Fadool DA, Holmes TC, Levitan IB. Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J Gen Physiol*. 1997;110:601-610.
23. Varga Z, Panyi G, Péter M, Pieri C, Csécséi G, Damjanovich S, Gáspár R. Multiple binding sites for melatonin on Kv1.3. *Biophys J*. 2001;80:1280-1297.
24. Grissmer S, Cahalan MD. Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *J Gen Physiol*. 1989;93:609-630.
25. Deutsch C, Lee SC. Modulation of K<sup>+</sup> currents in human lymphocytes by pH. *J Physiol (Lond)*. 1989;413:399-413.
26. Logsdon NJ, Kang J, Togo JA, Christian EP, Aiyar J. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 1997;272:32723-32726.
27. Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J. Calmodulin mediates calciumdependent

- activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem.* 1999;274:5746-5754.
28. Giangiacomo KM, Ceralde Y, Mullmann TJ. Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon.* 2004;43:877-886.
29. Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hänsel W, Chandy KG. Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxypsoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol.* 2004;65:1364-1374.
30. Maurice M, Pichard L, Daujat M, Fabre I, Joyeux H, Domergue J, Maurel P. Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture. *FASEB J.* 1992;6:752-758.
31. Koo GC, Blake JT, Shah K, Staruch MJ, Dumont F, Wunderler D, Sanchez M, McManus OB, Sirotina-Meisher A, Fischer P, Boltz RC, Goetz MA, Baker R, Bao J, Kayser F, Rupprecht KM, Parsons WH, Tong XC, Ita IE, Pivnichny J, Vincent S, Cunningham P, Hora Jr D, Feeney W, Kaczorowski G, Springer MS. Correolide and derivatives are novel immunosuppressants blocking the lymphocyte Kv1.3 potassium channels. *Cell Immunol.* 1999;197:99-107.
32. Rauer H, Grissmer S. The effect of deep pore mutations on the action of phenylalkylamines on the Kv1.3 potassium channel. *Br J Pharmacol.* 1999;127:1065-1074.
33. Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest.* 2003;111:1703-1713.
34. Verheugen JA, Vijverberg HP. Intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations and membrane potential fluctuations in intact human T lymphocytes: role of K<sup>+</sup> channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium.* 1995;17:287-300.
35. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature.* 1998;392:933-936.
36. Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: A potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:8151-8156.

37. Köhler R, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, Grgic I, Kämpfe D, Si H, Wibawa J, Real R, Borner K, Brakemeier S, Orzechowski HD, Reusch HP, Paul M, Chandy KG, Hoyer J. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation*. 2003;108:1119-1125.
38. Cohen SB, Perez-Cruz I, Fallen P, Gluckman E, Madrigal JA. Analysis of the cytokine production by cord and adult blood. *Hum Immunol*. 1999;60:331-336.
39. García Vela JA, Delgado I, Bornstein R, Alvarez B, Auray MC, Martin I, Oña F, Gilsanz F. Comparative intracellular cytokine production by in vitro stimulated T lymphocytes from human umbilical cord blood (HUCB) and adult peripheral blood (APB). *Anal Cell Pathol*. 2000;20:93-98.
40. Lewis DB, Wilson CB. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. W.B. Saunders. 1995, p. 20.
41. Wu CY, Demeure C, Kiniwa M, Gately M, Delespesse G. IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol*. 1993;151:1938-1949.
42. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*. 1996;196:137-151.
43. Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today*. 1999;20:330-335.
44. Hassan J, Reen D. Cord blood CD4+ CD45RA+ T cells achieve a lower magnitude of activation when compared with their adult counterparts. *Immunology*. 1997;90:397-401.
45. Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2007;28:192-209.
46. Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2000;356:1260-1265.
47. Baumwell S, Karumanchi SA. Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. *Nephron Clin Pract*. 2007;106:c72-81.
48. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63:425-433.

49. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF 3rd, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci.* 2009;16:206-215.
50. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, Nanan R. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.* 2009;183:7023-7030.
51. Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1999;41:297-306.
52. Rein DT, Schondorf T, Gohring UJ, Kurbacher CM, Pinto I, Breidenbach M, Mallmann P, Kolhagen H, Engel H. Cytokine expression in peripheral blood lymphocytes indicates a switch to T(HELPER) cells in patients with preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2002;54:133-142.
53. Darmochwal-Kolarz D, Rolinski J, Leszczynska-Goarzelak B, Oleszczuk J. The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol.* 2002;48:381-386.
54. Toldi G, Rigo J Jr, Stenczer B, Vasarhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2011;66:223-229.
55. Saito S. Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. *Immunol Cell Biol.* 2010;88:615-617.
56. Simó M. A sclerosis multiplex és kezelési irányelvei. *Orvosképzés.* 2008;5:355-357.
57. Martino G, Furlan R, Brambilla E, Bergami A, Ruffini F, Gironi M, Poliani PL, Grimaldi LM, Comi G. Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis. *J Neuroimmunol.* 2000;109:3-9.
58. Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Béraud E. Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:13942-13947.
59. Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, LeeHealey CJ, S Andrews B, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL,



- Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus HG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:17414-17419.
60. Gergő L. Az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásának patomechanizmusa, tünettana és kezelési lehetőségei. *Orv Hetil*. 2010;151:533-539.
61. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature*. 1993;366:69-72.
62. Elliott JF, Qin HY, Bhatti S, Smith DK, Singh RK, Dillon T, Lauzon J, Singh B. Immunization with the larger isoform of mouse glutamic acid decarboxylase (GAD67) prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 1994;43:1494-1499.
63. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates: requirement for both L3T4+ and Lyt2+ T cells. *J Exp Med*. 1987;166:823-832.
64. Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM, Shastri N, Pamer EG, Janeway CA Jr. Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med*. 1999;5:1026-1031.
65. Jun HS, Yoon CS, Zbytniuk L, van Rooijen N, Yoon JW. Role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med*. 1999;189:347-358.
66. Appels B, Burkart V, Kantwerk-Funke G, Funda J, Kolb-Bachofen V, Kolb H. Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J Immunol*. 1989;142:3803-3808.
67. Corbett JA, McDaniel ML. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of  $\beta$  cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes*. 1992;41:897-903.
68. Nagata M, Yoon JW. Studies on autoimmunity for T-cell-mediated  $\beta$  cell destruction. Distinct difference in  $\beta$  cell destruction between CD4+ and CD8+ T cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice. *Diabetes*. 1992;41:998-1008.
69. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*. 1998;14:129-151.

70. Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:200-211.
71. Hajnóczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, Yi M. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in apoptosis. *Cell Calcium.* 2006;40:553-560.
72. Matlib MA, Zhou Z, Knight S, Ahmed S, Choi KM, Krause-Bauer J, Phillips R, Altschuld R, Katsube Y, Sperelakis N, Bers DM. Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca<sup>2+</sup> uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:10223-102231.
73. Xu L, Tripathy A, Pasek DA, Meissner G. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *J Biol Chem.* 1999;274:32680-32691.
74. Thastrup O, Cullen PJ, Drøbak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:2466-2470.
75. Chaudhary J, Walia M, Matharu J, Escher E, Grover AK. Caloxin: a novel plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump inhibitor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:1027-1030.
76. Szewczyk MM, Pande J, Grover AK. Caloxins: a novel class of selective plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump inhibitors obtained using biotechnology. *Pflugers Arch.* 2008;456:255-266.
77. Kaposi AS, Veress G, Vásárhelyi B, Macardle P, Bailey S, Tulassay T, Treszl A. Cytometry-acquired calcium-flux data analysis in activated lymphocytes. *Cytometry A.* 2008;73:246-253.
78. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy.* 2001;20:IX–XIV.
79. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol.* 2005;58:840-846.

80. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27:S5-10.
81. Dammermann W, Guse AH. Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005;280:21394-21399.
82. Langhorst MF, Schwarzmann N, Guse AH. Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup> entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal*. 2004;16:1283-1289.
83. Donnadieu E, Bismuth G, Trautmann A. Calcium fluxes in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 1992;267:25864-25872.
84. Adkins B, Ghanei A, Hamilton K. Developmental regulation of IL-4, IL-2, and IFN-gamma production by murine peripheral T lymphocytes. *J Immunol*. 1993;151:6617-6626.
85. Adkins B, Hamilton K. Freshly isolated, murine neonatal T cells produce IL-4 in response to anti-CD3 stimulation. *J Immunol*. 1992;149:3448-3455.
86. Kocsis I, Vászárhelyi B, Héninger E, Vér A, Tulassay T. Expression and activity of the Ca(2+)-atpase enzyme in human neonatal erythrocytes. *Biol Neonate*. 2001;80:215-218.
87. Kesson AM, Bryson YJ. Uptake of extracellular Ca<sup>2+</sup> is a requirement for production of interferon-gamma by cord blood mononuclear cells. *J Interferon Res*. 1991;11:81-86.
88. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online*. 2006;13:680-686.
89. Darmochwal-Kolarz D, Saito S, Rolinski J, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Activated T lymphocytes in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007;58:39-45.
90. Malinowski A, Szpakowski M, Tchórzewski H, Zeman K, Pawłowicz P, Wozniak P. T lymphocyte subpopulations and lymphocyte proliferative activity in normal and pre-eclamptic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1994;53:27-31.
91. Buntinx M, Ameloot M, Steels P, Janssen P, Medaer R, Geusens P, Raus J, Stinissen P. Interferon-gamma-induced calcium influx in T lymphocytes of multiple

- sclerosis and rheumatoid arthritis patients: a complementary mechanism for T cell activation? *J Neuroimmunol.* 2002;124:70-82.
92. Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD. K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:280-289.
93. Rangaraju S, Chi V, Pennington MW, Chandy KG. Kv1.3 potassium channels as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13:909-924.
94. Rus H, Pardo CA, Hu L, Darrah E, Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Mullen KM, Allie R, Guo L, Wulff H, Beeton C, Judge SI, Kerr DA, Knaus HG, Chandy KG, Calabresi PA. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:11094-11099.
95. Varga Z, Csepany T, Papp F, Fabian A, Gogolak P, Toth A, Panyi G. Potassium channel expression in human CD4<sup>+</sup> regulatory and naïve T cells from healthy subjects and multiple sclerosis patients. *Immunol Lett.* 2009;124:95-101.
96. Mészáros G, Szalay B, Toldi G, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A. Kinetic measurements on flow cytometer: new methods for monitoring intracellular processes. *Assay Drug Dev Technol.* 2011, in press.

## 12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 12.1. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Összesített impakt faktor: 17,978, első szerzőként: 15,278

#### Nemzetközi közlemények:

- **Toldi G**, Kaposi A, Zsembery Á, Treszl A, Tulassay T, Vásárhelyi B. Human Th1 and Th2 lymphocytes are distinguished by calcium flux regulation during the first ten minutes of lymphocyte activation. *Immunobiology*. 2011, in press. IF: 4.114
- **Toldi G**, Folyovich A, Simon Z, Zsiga K, Kaposi A, Mészáros G, Tulassay T, Vasarhelyi B. Lymphocyte calcium influx kinetics in multiple sclerosis treated without or with interferon beta. *J Neuroimmunol*. 2011;237:80-86. IF: 2.901
- **Toldi G**, Stenczer B, Treszl A, Kollar S, Molvarec A, Tulassay T, Rigo J Jr, Vasarhelyi B. Lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in healthy pregnancy and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65:154-63. IF: 2.451
- **Toldi G**, Vasarhelyi B, Kaposi AS, Meszaros G, Panczel P, Hosszufalusi N, Tulassay T, Treszl A. Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: the increased significance of Kv1.3 potassium channels. *Immunol Lett*. 2010;133:35-41. IF: 2.511
- **Toldi G**, Treszl A, Pongor V, Gyarmati B, Tulassay T, Vasarhelyi B. T-lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in the neonate. *Int Immunol*. 2010;22:769-74. IF: 3.301
- Mészáros G, Szalay B, **Toldi G**, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A. Kinetic measurements on flow cytometer: new methods for monitoring intracellular processes. *Assay Drug Dev Technol*. 2011, in press. IF: 2.700

Könyvfejezetek:

- **Toldi G**, Treszl A, Vásárhelyi B. T Lymphocyte Characteristics and Immune Tolerance during Human Pregnancy. In: Autoimmune Disorder / Book 1 (ed: Mavragani C). Intech, 2011. ISBN 978-953-308-70-9.
- **Toldi G**, Vásárhelyi B. The Contribution of Lymphocyte Potassium Channels to the Perinatal Regulation of the Immune Response in Mother and Newborn. In: Potassium Channels: Types, Structure and Blockers (ed: Fonseca DS). Nova Publishers, 2011. ISBN: 978-1-61324-880-5.

Magyar közlemények:

- **Toldi G**, Vásárhelyi B, Tulassay T. A limfociták kálium csatornáinak funkcionális éretlensége újszülötteknél. *Gyermekgyógyászat*. 2010;61:204-9.
- Mészáros G, Rónai KZ, **Toldi G**, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A. Sejtélettani folyamatok jellemzése valós idejű áramlási citometriás módszerrel. *Hun Immunol*. 2008;7:22-29.

12.2. AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Összesített impakt faktor: 22,808, első szerzőként: 11,236

Nemzetközi közlemények:

- **Toldi G**. Prevention of stillbirths – how students can get involved. *Int J Stud Res*. 2011;1:171-172.
- **Toldi G**, Molvarec A, Stenczer B, Müller V, Eszes N, Bohács A, Bikov A, Rigó J Jr, Vásárhelyi B, Losonczy G, Tamási L. Peripheral Th1/Th2/Th17/regulatory T-cell balance in asthmatic pregnancy. *Int Immunol*. 2011;23:669-677. IF: 3.301
- **Toldi G**, Bíró E, Szalay B, Stenczer B, Molvarec A, Rigó J Jr, Vásárhelyi B, Bekő G. Soluble urokinase Plasminogen Activator Receptor (suPAR) levels in healthy pregnancy and preeclampsia. *Clin Chem Lab Med*. 2011, in press. IF: 2.069

- **Toldi G**, Rigo J Jr, Stenczer B, Vasarhelyi B, Molvarec A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2011;66:223-9. IF: 2.451
- **Toldi G**, Stenczer B, Molvarec A, Takats Z, Beko G, Rigo J Jr, Vasarhelyi B. Hepcidin concentrations and iron homeostasis in preeclampsia. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48:1423-6. IF: 2.069
- **Toldi G**, Svec P, Vásárhelyi B, Mészáros G, Rigó J, Tulassay T, Treszl A. Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87:1229-33. IF: 1.346
- Molvarec A, Shiozaki A, Ito M, **Toldi G**, Stenczer B, Szarka A, Nakashima A, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2011;91:56-63. IF: 2.204
- Molvarec A, Ito M, Shima T, Yoneda S, **Toldi G**, Stenczer B, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Decreased proportion of peripheral blood vascular endothelial growth factor-expressing T and natural killer cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203:567.e1-8. IF: 3.313
- Mészáros G, Szalay B, **Toldi G**, Mezei G, Tamási L, Vásárhelyi B, Cserháti E, Treszl A. FoxP3+ regulatory T cells in childhood allergic rhinitis and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19:238-40. IF: 1.254
- Gyarmati B, Szabó E, Szalay B, Cseh Á, Czuczy N, **Toldi G**, Vásárhelyi B, Takáts Z. Serum maternal hepcidin levels three days after delivery are higher compared to those measured at parturition. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37:1620-1624. IF: 0.869
- Molvarec A, Blois SM, Stenczer B, **Toldi G**, Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vásárhelyi B, Rigó J Jr, Saito S. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Immunol.* 2011;139:48-56. IF: 3.932

Magyar közlemények:

- Pongor V, **Toldi G**, Szabó M, Vásárhelyi B. A terápiás célú teljestest-hypothermia szisztémás és immunmoduláns hatásai Orv Hetil. 2011;152:575-580.
- Gyarmati B, Szabó E, Szalay B, Cseh Á, Czuczy N, **Toldi G**, Vásárhelyi B, Takáts Z. Emelkedett hepcidinszint nőgyógyászati műtéteket követő harmadik napon Orv Hetil. 2010;151:1790-1794.

Könyvfejezet:

- Treszl A, Mészáros G, **Toldi G**, Vásárhelyi B. Histone Deacetylases and Autoimmunity. In: The Epigenetics of Autoimmune Diseases (ed: Zoulai M). Wiley & Sons, 2009. ISBN: 978-0-470-75861-8.



### 13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Több mint öt évvel ezelőtt, másodéves diákkörös hallgatóként kapcsolódtam be az I. számú Gyermekklinikán működő MTA-SE Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport munkájába. Köszönettel tartozom Tulassay Tivadar professzor úrnak nem csupán azért, hogy megteremtette a kutatócsoport munkájához szükséges feltételeket, hanem személyes támogatásáért, bátorításáért is.

Kutatómunkámat a kezdetektől irányítja témavezetőm, Vásárhelyi Barna. Ő tanított meg a tudományos gondolkodás és kritikus szemlélet alapjaira, az eredmények értelmezésére és a tudományos közlés technikájára. Különösen hálás vagyok neki azért, hogy mindig készen állt arra, hogy tanácsokkal segítse utamat.

Mindig nagy örömet jelent inspiráló közösségben dolgozni. Köszönet illeti Treszl András, aki bevezetett az áramlási citométeres mérések és a laboratóriumi munka alapjaiba, és nagy segítségünkre volt az eredmények értékelése során is. Hallgatótársaim, Kaposi Ambrus és Mészáros Gergő munkája nélkül nem jöhetett volna létre a mérések kiértékelésére használt módszer és a FacsKin program. Köszönöm továbbá kutatócsoportunk minden tagjának a hozzájárulást és a biztatást, amellyel munkánkat segítették.

Köszönetemet fejezem ki Rigó János professzor úrnak, Molvarec Attilának és Stenczer Baláznak (I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika), akik a várandós és preeclamsiás minták gyűjtésben nyújtottak segítséget.

Hálásan köszönöm Zsembery Ákos támogatását (Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet), aki szakértelmével és tanácsaival segítette eredményeink értékelését.

Gyarmati Béla főorvos úr (Uzsoki utcai Kórház, Szülészeti és Nőgyógyászati Osztály) és Pongor Vince hallgatótársam a köldökzsinórvér gyűjtésében voltak segítségünkre.

A sclerosis multiplexben végzett vizsgálatok elvégzésében Folyovich András főorvos úr (Szent János Kórház, Neurológiai Osztály) nyújtott pótolhatatlan segítséget, aki kollégáival, Simon Zsuzsával és Zsiga Katalinnal a vérminták gyűjtésében is közreműködött. Biró Enikő diákkörös hallgató a minták mérésével és az eredmények értelmezésével segítette munkánkat.

A T1DM-ben végzett vizsgálat során Pánczél Pál és Hosszufalusi Nóra (III. sz. Belgyógyászati Klinika) támogatták munkánkat a vérminták gyűjtésével.

Végezetül ezúton szeretnék köszönetet mondani a vizsgálatban részt vevő betegeknek és önkénteseknek a vérmintákért, valamint az újszülöttek szüleinek, akik hozzájárultak a köldökzsinórvér felhasználásához.