

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Jusztus Vivien

T limfociták ioncsatornáinak aktivitása patológiás körülmények között

**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2025**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

T limfociták ioncsatornáinak aktivitása patológiás körülmények között

Jusztus Vivien

Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2025**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. ELŐSZÓ	9
2. BEVEZETÉS	10
2.1 Az immunrendszer szerepe, működése	10
2.2 T-sejtek szerepe az immunválasz során.....	11
2.3 Ovárium (petefészek) tumor	12
2.4 Ioncsatornák.....	13
2.5 Feszültség-kapuzott kálium csatorna, Kv1.3	13
2.6 KCa3.1: egy kalcium-kapuzott kálium ioncsatorna.....	14
2.7 CRAC-csatorna	16
2.8 T limfociták kálium csatornáinak szerepe a T-sejt aktivációban, effektoros funkciók betöltésében	17
2.9 Kv1.3 és KCa3.1 csatornák T-sejt altípus szerinti expressziója	18
2.10 A Ca ²⁺ optimum szabályozó szerepe a daganatok elleni küzdelemben.....	19
2.11 CAR-T sejtek felépítése, CAR generációk	20
2.12 CAR-T sejt terápia	22
2.13 Tumor mikroörmnyezet (TME).....	24
2.14 Szferoid, <i>in vitro</i> tumor modell.....	25
3. CÉLKITŰZÉS	26
3.1 Kv1.3, KCa3.1 és Orai1 ioncsatornák aktivitása daganatos betegek CD8 ⁺ T-sejtjeiben	26
3.2 CAR-T sejtek ioncsatornáinak (Kv1.3, KCa3.1, CRAC) szerepe a tumor infiltráció és elimináció során	26
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
4.1 Egészséges és beteg donorok	27
4.2 PBMC izolálása, aktiválása	27
4.3 Sejttenyésztés.....	28
4.4 Transzformálás	28
4.5 Plazmid preparálás	28
4.6 A CD8 ⁺ sejtek monoklonális antitest adhéziója	29
4.7 Retrovirális transzdukció, CD19 ⁺ MCF és CAR-T sejtvonalak létrehozása	29

4.8 Elektrofiziológiai mérések	30
4.9 Ioncsatornák farmakológia azonosítása	30
4.10 Intracelluláris Ca ²⁺ -mérés.....	31
4.11 Áramlási citometria	31
4.12 Calcein Red-alapú ölési assay.....	31
4.13 Agaróz-alapú szferoid növesztés	32
4.14 Szferoid-alapú ölési és infiltrációs assay.....	32
4.15 Statisztikai analízis	33
5. EREDMÉNYEK.....	34
5.1 Kv1.3, KCa3.1 és Orai1 ioncsatornák aktivitása daganatos betegek CD8⁺ T-sejtjeiben	34
5.1.1 Malignus betegek véréből izolált CD8⁺ T-sejtek alacsony KCa3.1 és magas Kv1.3 konduktanciával rendelkeznek.....	34
5.1.2 Az mTT-k magasabb CRAC-függő Ca²⁺ választ mutatnak.....	36
5.2 CAR-T sejtek ioncsatornáinak (Kv1.3, KCa3.1) szerepe a tumor infiltráció és elimináció során	38
5.2.2 A CEM-CAR sejtek Kv1.3, KCa3.1 és CRAC ioncsatornák expressziója	39
5.2.3 Csökkent Ca²⁺-válasz a CEM-CAR sejtek esetén.....	41
5.2.4 A CEM-CAR sejtek felismerik és eliminálják a CD19⁺ Raji és MCF-7 célsejteket	42
5.2.5 A CEM-CAR és a CAR-T sejtek a CD19⁺ Raji szferoidokba vándorolnak és eliminálják a CD19⁺ Raji szferoid sejtjeit.....	44
5.2.6 A Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák gátlása serkenti a CD19 specifikus CEM-CAR és CAR-T sejtek ölési hatékonyságát.....	47
6. DISZKUSSZIÓ	50
6.1 A Kv1.3 csatorna magas aktivitásához rossz prognózis társul ovárium tumor esetén	50
6.2 A CAR-T sejtek Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornáinak gátlása növeli a tumorölés hatékonyságát.....	51
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	54
8. SUMMARY.....	55
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	56
10. TÁRGYSZAVAK	57
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	58

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

[Ca²⁺]_{ext}:	extracelluláris calcium koncentráció
[Ca²⁺]_{int}:	intracelluláris calcium koncentráció
4-1BB/OX-40:	kostimulációs domének
A_{2A}-receptor:	adenozin receptor 2A
AM:	acetoxi-metilészter
APC:	antigén prezentáló sejt
ATP:	adenozin-5'-trifoszfát
BSA:	bovine serum albumin
bTT:	benignus tumor T-sejt
CA-125:	karcinóma antigén-125
CAR:	kiméra antigén receptor
CC:	CAR-T sejtek száma
CCRF-CEM:	T-limfocita sejtvonal
CD3/CD3/CD8/CD16/CD19/CD28/CD32:	differenciációs klaszter
CFTR:	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CRAC:	kalcium felszabadulás aktiválta kalcium csatorna
CTL:	citotoxikus T-sejt
CTLA-4:	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DC:	dendritikus sejt
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	dimetil-szulfoxid
DNS:	deoxiribonukleinsav
ER:	endoplazmatikus retikulum
ER:	ösztrogénhormon receptor

FBS:	fetális szarvasmarha-szérum
FCS:	magzati borjúsérum
FDA:	Food and Drug Administration
G_{KCa3.1}:	KCa3.1 csatornák teljes-sejt vezetőképessége
G_{Kv1.3}:	Kv1.3 csatornák teljes-sejt vezetőképessége
GrB:	granzim B
HBSS:	Hank's Balanced Salts Modified Solution
HD:	egészséges donor
HER2:	humán epidermális receptor 2
HLA:	humán leukocita antigén
HNC:	head and neck cancer, fej-nyaki daganat
hT:	egészséges T-sejt
IL-2:	interleukin-2
IL-7:	interleukin-7
IL-15:	interleukin-15
IP₃:	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
IP₃R:	IP₃ receptor
IR:	infiltrációs ráta
KCa3.1:	Ca²⁺-aktivált kálium csatorna
KE:	ölési hatékonyság
KR:	ölési ráta
Kv1.3:	Feszültség-aktivált kálium csatorna
LB:	Luria Bertani Broth agar
LBCL:	nagy B-sejtes limfóma

MDSC:	mieloid szuppresszor sejtek
MHC:	fő hisztonkompatibilitási komplex
mTT:	malignus tumor T-sejt
NFAT:	aktivált T-sejtek nukleáris faktora
NFW:	nukleáz mentes víz
NK:	természetes ölósejt
NT CEM:	nem transzdukált CEM sejt
NT T:	nem transzdukált T-sejt
OC:	ovárium daganat
PD-1:	programozott sejthalál fehérje 1
PD-L1:	programozott sejthalál ligand 1
PFA:	paraformaldehid
PBMC:	perifériás vér mononukleáris sejt
PBS:	foszfáttal pufferolt sóoldat
PI3K:	foszfatidil-inozitol-3-kinázok
PIP2:	foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát
PLC:	foszfolipáz C
PR:	progeszteron receptor
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute médium
sGFP:	superfolder zöld fluoreszcens fehérje
SOC:	Super Optimal growth with Catabolites repression
SOCE:	intracelluláris kalciumraktár által vezérelt Ca²⁺-belépés
STAT3:	transzkripció faktor
T1:	tetramerizációs domén

TAA:	tumor asszociált antigén
TAM:	tumor asszociált makrofág
TAN:	tumor asszociált neutrofil
TB:	Terrific Broth agar
TC:	össz sejtszám
T_{CM}:	központi memória T-sejt
TCR:	T-sejt receptor
T_{EM}:	effektor memória T-sejt
T_{EMRA}:	CCR7⁻ CD45RA⁺ T-sejt
TG:	thapsigargin
TIL:	tumor-infiltráló limfocita
TME:	tumor mikrokörnyezet
TRUCK:	T cells Redirected for Universal Cytokine Killing

1. ELŐSZÓ

A T-sejtek szerepet játszanak a tumor növekedés visszaszorításában és az immunterápiában. A T-limfociták ioncsatornáit, mint a feszültség-függő Kv1.3, kalcium-aktivált KCa3.1 kálium csatornák és a kalcium-felszabadulás aktivált, CRAC csatorna (CRAC: calcium release-activated channels,) a Ca^{2+} jelátvitel szabályozásával befolyásolják a T-sejtek Ca^{2+} -függő funkcióit, mint például az aktivációt, proliferációt, valamint más effektor funkciókat, mint a citokin/granzim termelés, migráció és akár a tumorölés. A Kv1.3 és KCa3.1 K^+ csatornák stabilizálják a T-sejtek negatív membránpotenciálját a CRAC csatornákon keresztül történő Ca^{2+} beáramlás fenntartása érdekében. Akárcsak T-sejtek esetében ezen ioncsatornák kimérea antigén receptorral (CAR) rendelkező T-sejtekben is kiemelkedő szerepet játszhatnak. A T-sejtek genetikai módosítása, hogy CAR-t fejzzenek ki, lehetővé teszi számukra, hogy felismerjék a daganat felszínén lévő specifikus antigént, és aztán elpusztítsák a daganatot. Dolgozatom két témát ölel fel, melyben feltérképeztük a T limfociták ioncsatornáinak lehetséges szerepét és expresszióját patológiás állapotokban.

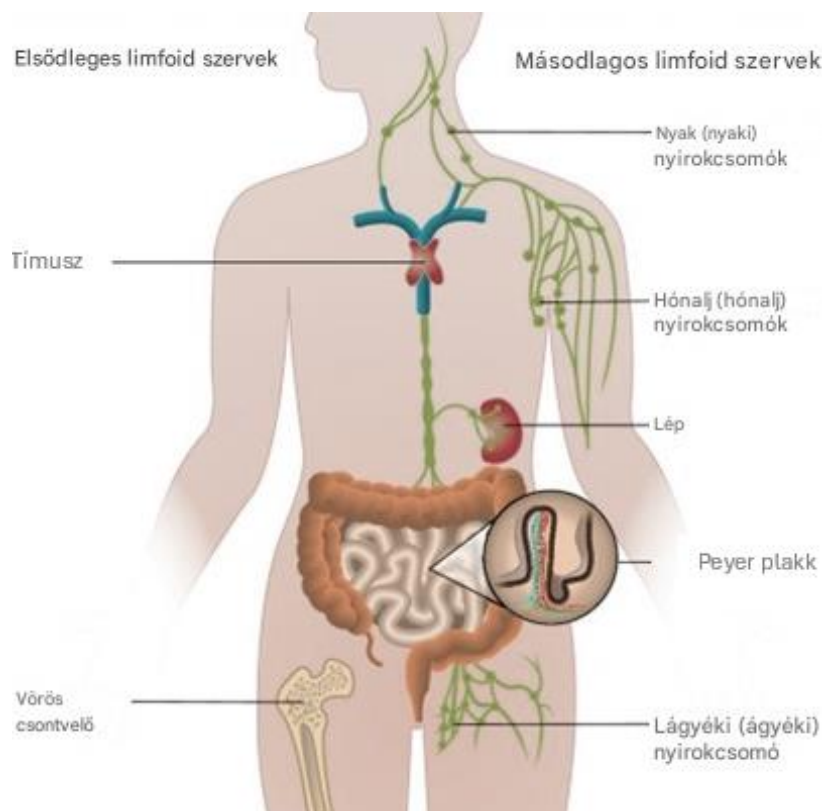
Megvizsgáltuk a Kv1.3, a KCa3.1 és a CRAC expresszióját petefészekrákos (OC) betegek $CD8^+$ sejtjeiben. Célunk az volt, hogy OC esetében jellemezzük mind a rosszindulatú, mind a jóindulatú daganatos betegek véréből izolált $CD8^+$ T-limfocita ioncsatornák aktivitását, ezzel egy potenciális biomarkert szolgáltatva a prognosztikában, diagnosztikában.

Akárcsak a T-sejteknél, úgy a CAR-T sejtek esetében is kiemelkedő szerepet játszhatnak a Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák. Célunk az volt, hogy megkiderítsük, hogy a CAR-T sejt ioncsatornák (Kv1.3 és KCa3.1) milyen szerepet töltenek be a CAR-T sejtek általi tumor infiltrációban és eliminációban *in vitro* körülmények között monolayer és 3D szferoid tumormodellben. Továbbá, hogy a Kv1.3 (Vm24) és KCa3.1 (TRAM34) inhibitorok alkalmazása hogyan befolyásolja a CEM-CAR és a CAR-T sejtek tumorölési hatékonyságát szferoidokban.

2. BEVEZETÉS

2.1 Az immunrendszer szerepe, működése

Az immunrendszer működése rendkívül összetett, ugyanis képes elpusztítani a kórokozókat és a kórossá vált belső struktúrákat, mielőtt azok komoly és tartós kárt okoznának. Kétféle immunrendszer alakult ki az evolúció során: a veleszületett és a szerzett immunrendszer, amelyek egymással szorosan együttműködve és egymást kiegészítve segítik fenntartani az immunhomeosztázist. [1-3]. Az immunrendszer sejtei elszórtnan, elsősorban a vérben és a nyirokrendszerben található meg, nem pedig egyetlen szervbe tömörülve. A nyirokszerveket funkciójuk alapján elsődleges vagy másodlagos nyirokszerveknek nevezzük (1. ábra). A vörös csontvelő, mint elsődleges nyirokszerv a limfociták immunkompetens sejtjei éréséhez biztosítanak megfelelő mikrokörnyezetet, míg a másodlagos nyirokszervek helyszínt biztosítanak az antigének és patogének idegen struktúráinak specifikus receptorokkal való felismeréséhez, ezáltal a fajlagos immunválasz kialakulásához [4-6].

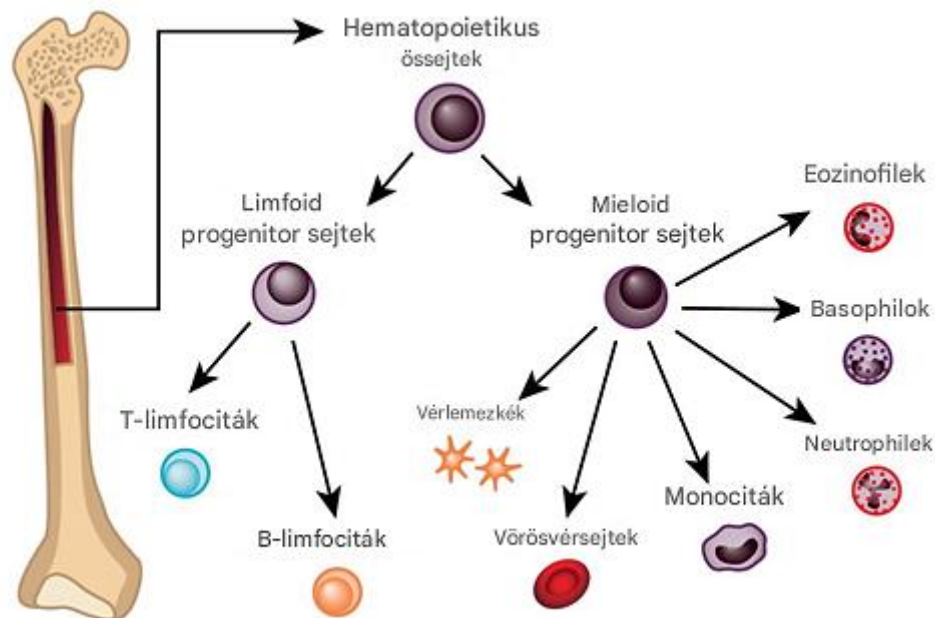


1. ábra: Elsődleges és másodlagos nyirokszervek [6]

Az elsődleges nyirokszervek (vörös csontvelő, tímusz) az immunsejtek képződésének/érésének helyei, míg a másodlagos nyirokszervek (nyaki, hónalj, lágyéki nyirokcsomók, lép, Peyer-plakk) az immunválasz központi területei.

Antigéninger hatására elindul a sejtek klónszelekció folyamata, amely magába foglalja az azonos antigénköti receptormolekulákat hordozó limfociták klónjainak kialakulását, amely a specifikus immunválasz, illetve a differenciáció alapját képezi. A proliferálódó sejtek differenciációja különféle irányokba történhet, effektor sejtekké, illetve centrális memóriasejtté is differenciálódhatnak, amelyek képessé válnak a patogén eliminálására. [7, 8].

A csontvelői hemopoetikus őssejtekből mieloid és limfoid előalakok fejlődnek, majd ezekből alakulnak ki az immunrendszer sejtjei (2. ábra). A mieloid fejlődési útvonalon keletkeznek pl. a dendritikus sejtek (DC), granulociták, makrofágok és a hízósejtek, míg a limfoid fejlődési úton a limfociták elő alakjai differenciálódnak, melyekből végül B sejtek, T sejtek vagy természetes öló (NK) sejtek jönnek létre [1, 4, 6, 9].



2. ábra: A hematopoézis folyamata [6]

A hematopoézis során keletkeznek az immunrendszer különféle sejtjei. Minden sejt egy közös hematopoietikus őssejtből ered, majd fejlődik tovább mieloid vagy limfoid fejlődési útvonalon.

2.2 T-sejtek szerepe az immunválasz során

Az adaptív immunválasz kiemelkedő szereplői a T-sejtek, melyek szerepe a szervezetbe bejutó baktériumok, vírusok, valamint daganatok és kóros ágensek elleni védekezés [7, 10, 11]. A T-sejtek előalakjai a csontvelőben képződnek, majd a csecsemőmirigybe, azaz a tímuszba vándorolnak, és környezeti tényezők hatására immunkompetens T-sejtekké érnek [5, 6, 12]. A

perifériás nyirokszervekbe már a receptorstruktúrákkal rendelkező T-limfocitákként jutnak el, amelyek antigéneket képesek felismerni. Ezen T-sejteket két csoportba sorolhatjuk be működésük alapján: citotoxikus (CD8⁺) és helper (CD4⁺) T-sejtek [7, 13]. Az immunválasz kialakításának különböző szakaszaiban játszanak szerepet. A CD8⁺ és a CD4⁺ T-sejt egyaránt rendelkezik antigén-specifikus T-sejt receptorral (TCR), amelyet Ig-szupercsaládba tartozó gének kódolnak [14-17]. A helper T-sejtek az immunválaszt egyéb immunsejt aktivációja révén (például B-limfocita, makrofág) szabályozzák, irányítják, ezáltal vesznek részt a fertőzések elleni küzdelemben. Immunológiai memóriát csak a limfociták képesek kialakítani, mivel kizárólag ezek a sejtek képesek az antigének specifikus felismerésére. A citotoxikus T-sejtek képesek felismerni és eliminálni a fertőzött és daganatos sejteket, ezzel gátolva a fertőzés további elterjedését és segítve a daganatos betegség leküzdését. [1, 7, 13]. A T-limfociták az antigénprezentáló sejtek (APC-k) membránján megjelenő fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulákhoz kötött formában ismerik fel a fehérjetermészetű antigénekből származó peptidek lineáris szekvenciáit [9]. APC közé sorolhatók a B-limfociták, a makrofágok, dendritikus sejtek, de bizonyos mértékig a szervezet valamennyi sejtje képes az idegen antigéneket prezentálni. Az antigén prezentáció következtében számos szignalizációs út vonal indul el a sejtben, mint például a Ca²⁺-függő jelátviteli út vonal, amely következtében a sejt proliferálódni, differenciálódni fog [18]. Aktiváció hatására a citotoxikus T-limfocitákban és NK sejtekben a proteázok családjába tartozó, granzim citotoxikus protein termelés megnő, amely fontos szerepet játszik a sejtek apoptózisának szabályozásában, ezzel hozzájárulva fertőzött sejtek elpusztításához. A célsejtek citoplazmájába granzim áramlik be a citotoxikus T-sejtek által kibocsátott granzim, perforin és szerglicin tartalmú komplexeket által [19]. A citoplazmába jutott granzimok kaszpázokat is hasítanak, ezáltal apoptózist indukálva a célsejtben [7, 20-22].

2.3 Ovárium (petefészek) tumor

A petefészekrák (OC) gyakori nőgyógyászati rosszindulatú daganat, amely a világon sok nőt érint. Az OC incidenciája magas, és korlátozott, <50%-os 5 éves túlélési aránya (incidencia: 3,4% az összes daganatos megbetegedésre vonatkozóan, nők esetében és 22,5% az összes nőgyógyászati rákos megbetegedés esetében) [14]. Az OC felismerése a korai stádiumban problematikus; az OC-ben szenvedő betegeket a betegség előrehaladott szakaszában (III-IV. stádium) diagnosztizálják, és addigra a rák már áttéteket képzett a felső hasüregben. A túlélés kritikus pontja a betegség stádiuma és a műtéti beavatkozás után megmaradó tumoros csomók mennyisége. A nem mucinózus epiteliális petefészekrák leggyakrabban használt biomarkere a

karcinóma antigén-125 (CA-125) mint szérummarker, de mucinózus rákokban és csírasejtes daganatokban nem informatív [15]. A platina-alapú gyógyszerek rendelkezésre állnak elsődleges kezelésként, de előrehaladott stádiumú betegeknél ez nem bizonyul hatékonynak [19, 23].

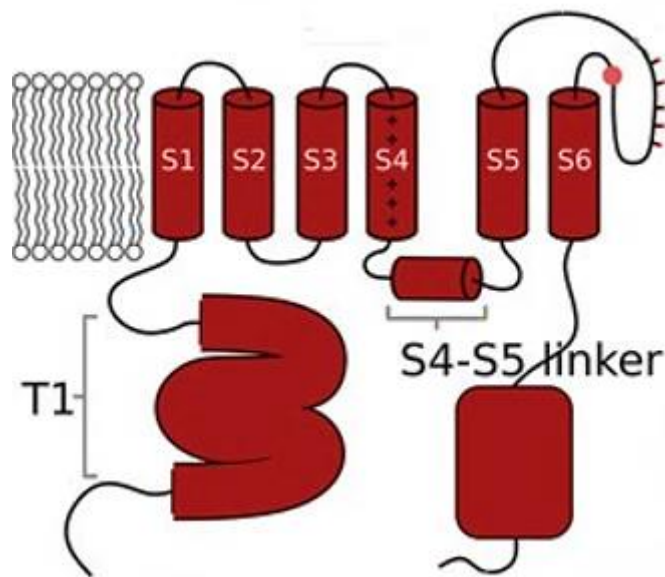
2.4 Ioncsatornák

Az ioncsatornák olyan pórusformáló fehérjék, melyek biztosítják az ionok szabályozott és szelektív átjutását a sejtmembránon az elektrokémiai gradiens irányában. Az ioncsatornákat szelektivitás és kapuzás alapján több csoportja oszthatjuk. A szelektivitás alapján megkülönböztethetünk nagy szelektivitású csatornákat melyek leginkább K^+ , Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- számára átjárható, ezek jellemzően 4 alegységből állnak. A kis szelektivitású ioncsatornák kationokra specifikusak és jellemzően 5 alegységből állnak, míg azok a csatornák, melyek nem szelektívek jellemzően 6 alegységből. Kapuzás alapján megkülönböztetünk ligand-kapuzott, intracelluláris (i.c.) hírvivő által kapuzott, feszültség-kapuzott, membrán-feszülés (mechanoszenzitív) kapuzott és háttér csatornát. A ligand kapuzott ioncsatornák esetében egy extracelluláris ligand kötődés, míg az i.c. hírvivő által kapuzott csatornák esetén a ligand bekötődése az intracelluláris oldalról jelenti az ingert. A feszültség-kapuzott ioncsatornák esetében a membránpotenciálváltozás, míg a mechanoszenzitív csatornák esetében a membrán feszülése jelenti az ingert [24]. A nyugalmi potenciál fenntartását a háttér csatornák segítik elő, amelyek konstitutívan aktív ioncsatornák [25]. Az ioncsatornák lehetséges állapotai: nyitott, zárt és esetenként inaktív, mely állapotokat különféle konformáció jellemez [24, 26]. Hosszan tartó elektromos vagy kémiai stimulus hatására az ioncsatornák inaktivált állapotba kerülhetnek az adott inger megszűnéséig. Az ioncsatornák mutációi számos betegség hátterében húzódnak meg, ezen okból kifolyólag a gyógyszeripar számára igen jó célpontoknak tekinthetők, erre példa a cisztás fibrózis, amely esetén a betegség hátterében a CFTR kloridion csatorna mutációi állnak [27].

2.5 Feszültség-kapuzott kálium csatorna, Kv1.3

A kálium csatornák az ioncsatornák egyik legnépesebb csoportja. A feszültségfüggő kálium (Kv) csatornák a sejt membránpotenciálját és a különféle jelátviteli folyamatokat szabályozzák [28-32]. A Kv csatornák négy alegységből állnak össze, melyek egyaránt lehetnek hetero- és homomerek. Egy alegység hat transzmembrán hélixet tartalmaz. Az egyes alegységek ER-ban

történő összeszerelődését a csatorna intracellulárisan elhelyezkedő N-terminálisán található tetramerizációs ún. T1 domén teszi lehetővé. Az N-terminushoz hozzákötődve a Kv β alegység által további jelátviteli molekulák kapcsolódhatnak [33]. Az ionvezetést lehetővé tevő konzervált pórusrégió kialakulásért 5. és 6. transzmembrán szegmens (S5 és S6) közötti hurok és a S6 szegmens bizonyos részei felelősek (3. ábra). Ezen régió tartalmazza a kálium szelektivitásáért felelős szelektivitási szűrő szekvenciát. A Kv csatornák feszültség szenzorának negyedik transzmembrán szegmenst tekintjük [32, 34, 35]. A csatornák pórusa négy K⁺ kötőhelyet tartalmaz [35]. A funkcionális feszültség-függő káliumcsatorna alfa-alegység alapján 12 alcsaládot írtak le, melyek közül a Kv1.3 a Kv1.x alcsalád tagja [36]. Kimutatták, hogy a Kv1.3 ioncsatorna kulcsfontosságú eleme annak az útvonalnak, amely a CD8⁺ T-sejtek granzim B (GrB) termelését és szekrécióját szabályozza [37]. Emellett egérmodellekben arról számoltak be, hogy a Kv1.3 expressziójának felszabályozása a tumorspecifikus CD8⁺ sejtekben csökkentette a melanoma tumor növekedését [38].



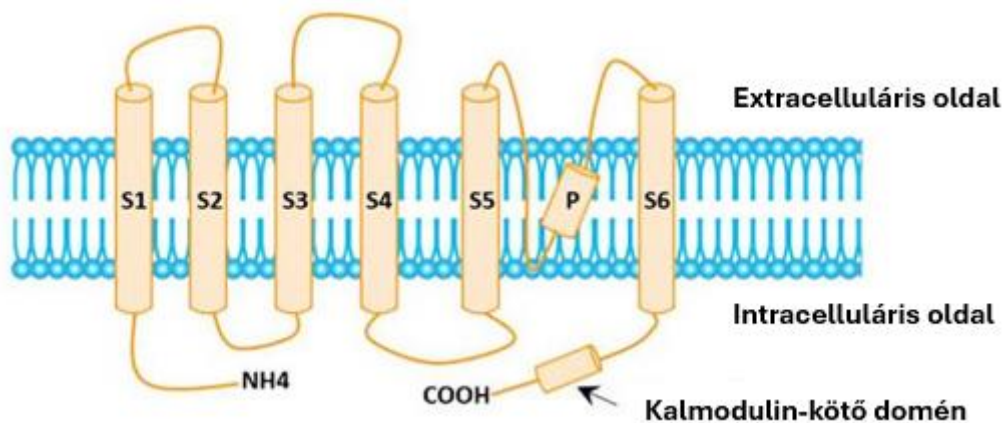
3. ábra: A feszültség-függő Kv ioncsatornák felépítésének sematikus ábrája [39]

A Kv1.3 csatorna négy azonos alegységből szerelődik össze, melynek mindegyike hat transzmembrán szegmensből (S1-S6) tevődik össze. Az ionvezetést a pórusrégió kialakulásért felelős 5. és 6. transzmembrán szegmens közötti hurok és a S6 szegmens teszi lehetővé. A T1, azaz tetramerizációs domén az alegységek ER-ban történő összeszerelődéséhez szükséges.

2.6 KCa3.1: egy kalcium-kapuzott kálium ioncsatorna

Fiziológiai, vezetőképessége és farmakológiai tulajdonságok alapján a kalciummal aktivált káliumcsatornákat három kategóriába sorolhatjuk: lehetnek nagy vezetőképességű (BKCa, 100

-300 pS), közepes vezetőképességű (IKCa, 25-100 pS) és kis vezetőképességű kalcium-aktivált káliumcsatornák (SKCa, 2-25 pS). Közepes vezetőképességű K^+ csatornák közé tartozik a Ca^{2+} -aktivált KCa3.1 [40, 41]. A KCa3.1 ioncsatorna 4 alfa alegységet tartalmazó transzmembrán fehérje, ami egyenként 6 transzmembrán szegmenset (S1-S6) tartalmaz (4. ábra). Az ionvezetést lehetővé tevő pórus régió az S5 és S6 között helyezkedik el. A C-terminálison található egy kalmodulin kötő domén, melyhez Ca^{2+} -aktivált kalmodulin kapcsolódik, amely aktiválni fogja a csatornát, azaz nyitott állapotba kerül. A csatorna aktivációjának szabályozásában elsősorban az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedése vesz részt. Az aktivált csatorna hozzájárul K^+ kiáramlás általi membránpotenciál és az az intracelluláris Ca^{2+} szint szabályozásához [32, 40, 42-44].



4. ábra: A kalcium aktivált KCa3.1 ioncsatornák felépítésének sematikus ábrája

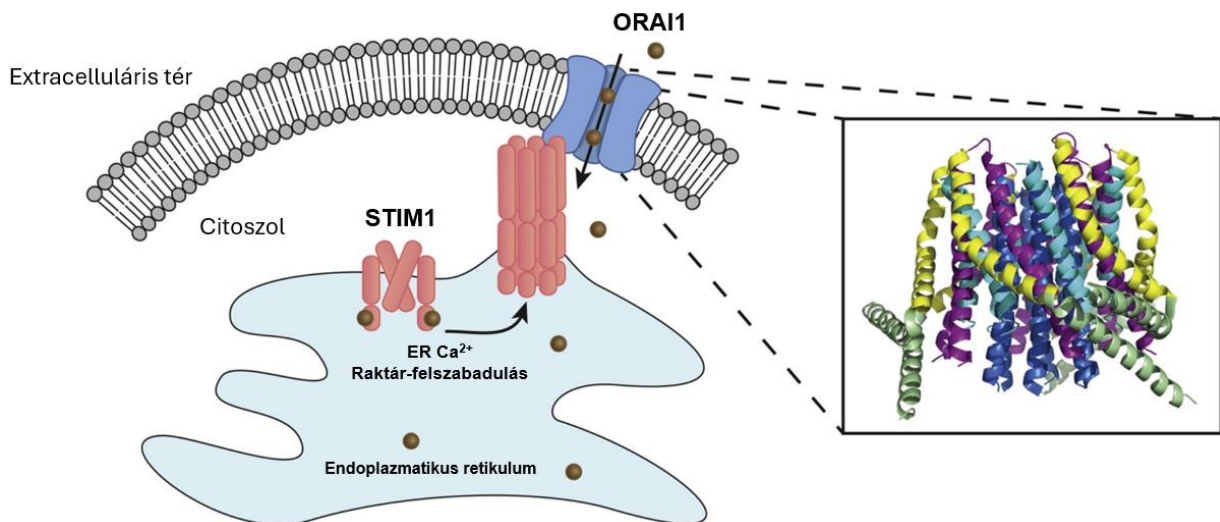
Forrás: <https://www.cusabio.com/c-20939.html> (Letöltés dátuma: 2025. február)

A KCa3.1 egy tetramer fehérje, amelynek minden alegysége hat transzmembrán szegmensbe és egy pórus régióba (P) szerveződik az 5. és 6. szegmens között. A csatorna Ca^{2+} érzékenységeért a C-terminálison található kalmodulin-kötő domén felelős, amely Ca^{2+} szenzorként funkcionálva érzékeli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt.

KCa3.1 csatorna fontos immunszabályozó szerepet játszik különféle sejtbeli folyamatokban, mint a sejtciklus progresszió, T-sejtek proliferációjában, aktivációjában, migrációjában, továbbá azok effektor funkciót elősegítő gének expressziójában [23]. Daganatos betegekből származó $CD8^+$ sejtek KCa3.1 diszfunkciója korlátozza a kemokin által indukált migrációjukat, amikor a sejteket magas adenosin-szintnek tették ki [23, 45]. Diszfunkciója szerepet játszik különféle autoimmun kórképekben, mint például a reumatoid arthritisz vagy immunrendszeri gyulladásoos betegségek kialakulásában [46, 47].

2.7 CRAC-csatorna

A T-sejtek aktivációja során a Ca^{2+} -válasz kialakulásához hozzájáruló egyik kulcsfontosságú mechanizmus a raktár-ürítés által indukált Ca^{2+} beáramlás (SOCE: store-operated calcium entry) [48]. A SOCE csatornák közül leginkább tanulmányozott a kalcium-felszabadulás aktiválta kalcium csatorna. A CRAC csatorna egy alacsony vezetőképességű (10–30 fS) és magas Ca^{2+} -szelektivitású csatorna, mely szinte az összes állati sejtben expresszálódik. A CRAC csatornát két alegységből épül fel: Orai1 és STIM1 [49]. Az Orai1 egy plazmamembránban lokalizált pórusképző fehérje, míg az endoplazmatikus retikulumban (ER) lokalizálódó STIM1 Ca^{2+} szenzorként funkcionál. Az Orai1 egy alegysége négy darab, citoszolikus N- és C-végekkel rendelkező transzmembrán domént tartalmaz. A STIM1 az ER Ca^{2+} -szenzorként funkcionáló luminális EF-kéz motívumot és két citoplazmatikus coil-coil domént tartalmaz [49-53]. Az intracelluláris Ca^{2+} raktár deplécióját a STIM1 alegység érzékeli, amely konformáció változás után képes az Orai1-hez közvetlenül kötődni, mely a CRAC csatorna aktivációjához vezet, ezáltal extracelluláris Ca^{2+} áramlik be CRAC csatornákon keresztül [53] (5. ábra). A T-sejt aktiváció és az effektor funkciók kulcsfontosságú lépése a Ca^{2+} -ionok CRAC csatornákon keresztüli beáramlása. NK-sejtek (természetes ölősejtek) esetében egy nemrégiben készült tanulmány szintén arról számolt be, hogy a CRAC és a KCa3.1 csatornák közötti kölcsönhatás szükséges az optimális célsejt-eliminációhoz [54, 55].

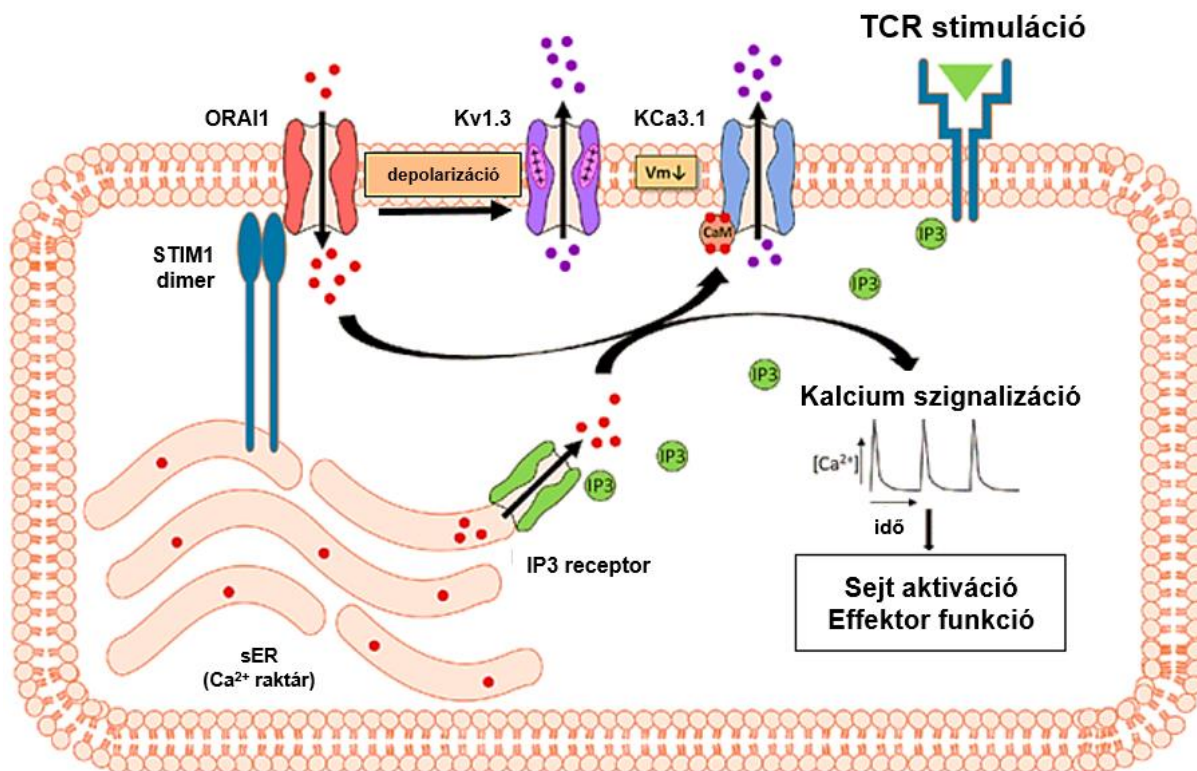


5. ábra: A CRAC csatorna felépítése [53]

A CRAC-csatornát két alegység alkotja: Orai1 és a STIM1. Az intracelluláris Ca^{2+} raktár kiürülését, az endoplazmatikus retikulumban található STIM1 alegység, mint Ca^{2+} szenzor érzékeli, ennek következtében transzlokálódik a plazmamembránban található Orai1 pórusképző alegységhez, ezzel aktiválva CRAC csatornát.

2.8 T limfociták kálium csatornáinak szerepe a T-sejt aktivációban, effektoros funkciók betöltésében

A T-sejtekben kifejeződő ioncsatornák, mint a feszültség-függő Kv1.3, kalcium-függő KCa3.1 és az CRAC ioncsatorna kiemelkedő szerepet játszanak a T-sejtek aktivációja, proliferációja és tumorsejt-ölése során (6. ábra) [13, 23, 56-58]. A T-sejtek antigén felismerésének következtében olyan jelátvitel kaszkád aktiválódik, amely következtében foszfolipáz C aktiválódik (PLC). Az aktivált PLC a foszfatidil-inozitol-biszfoszfátokat (PIP₂) oldható inozitol-1,4,5-trifoszfáttá (IP₃) hidrolizálja. Az IP₃, mint intracelluláris hírvivő az ER membránjában található IP₃ receptorhoz (IP₃R) kötődik, ezáltal Ca²⁺ kiáramlást előidézve az ER-ból az IP₃R-en keresztül. A Ca²⁺ kiürülését a CRAC-csatorna STIM1 alegysége érzékeli, amely konformáció változás után a plazmamembránban található Orai1 csatornához transzlokálódik, majd a CRAC csatorna aktiválódik [51, 53, 59-61]. Ennek következtében az Orai1-en keresztül Ca²⁺ áramlik be az intracelluláris térbe. A megemelkedett intracelluláris Ca²⁺-szint következményeként a sejtmembrán depolarizálódik, amely nem kedvező a Ca²⁺-függő jelátvitel szempontjából. Depolarizáció hatására aktiválódik Kv1.3 feszültségfüggő ioncsatorna, míg a megemelkedett Ca²⁺ koncentráció a Ca²⁺-függő KCa3.1 csatornát aktiválja, ezzel a membránpotenciált kellően negatív értéken tartják (T-sejtek esetében: -50 – -60 mV) a K⁺-efflux által, így biztosítva a hajtóerőt a megfelelő Ca²⁺-függő jelátvitelhez [47, 62-64]. Ezen jelátviteli folyamat hozzájárul bizonyos citokinek, citotoxikus molekulák expressziójához (pl.: interleukin-2 (IL-2), GrB), amely elősegítik T-sejtek aktivációját, proliferációját, effektor funkciók betöltését. Ezen csatornák aktivitása, membránlokalizációja és expressziójuk nagymértékben befolyásolja Ca²⁺-függő jelátvitel hatékonyságát [14, 23, 63, 65-71].



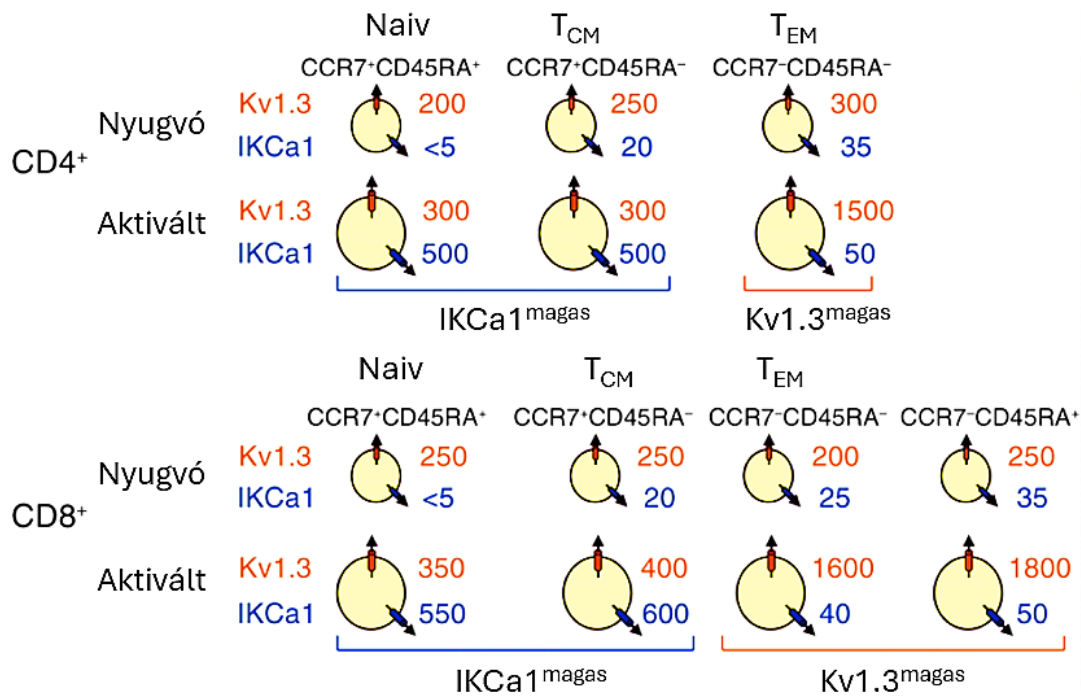
6. ábra: Az ioncsatornák szerepe a T-sejtek aktivációjában [72]

A Kv1.3, KCa3.1 és CRAC (Orai1, STIM1) csatornák által szabályzott Ca^{2+} -függő jelátvitel elősegíti a T-sejtek aktivációját, proliferációját, effektor funkciók betöltését. TCR: T-sejt receptor. IP3: inozitol 1,4,5-triszfoszfát. IP3R: IP3 receptor. sER: sima felületű endoplazmatikus retikulum. STIM1: Sztromális interakciós molekula 1. CaM: Kalmodulin.

2.9 Kv1.3 és KCa3.1 csatornák T-sejt altípus szerinti expressziója

A naiv $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejtek egyaránt expresszálják CD45RA foszfatáz és a CCR7 kemokin receptort, az utóbbi kulcsfehérjeként szolgál a nyirokcsomókba való belépéshez. A nyirokcsomókon belül a naiv sejtek antigénnel találkozás következtében, aktiválódnak és „naiv aktivált” vagy „naiv effektorokká” válnak. A legtöbb naiv effektor sejt elpusztul, de néhányuk hosszú életű központi memóriasejttekké (T_{CM} : $CCR7^+CD45RA^-$) differenciálódik (7. ábra). Az antigénnel való ismételt találkozás autoimmun betegségekben vagy krónikus fertőzések során a T_{CM} sejteket rövid élettartamú effektor memória (T_{EM} : $CCR7^-CD45RA^-$) sejtekké differenciálja. A $CD8^+$ T_{EM} sejtek egy része képes visszanyeri a CD45RA-t és ezáltal $CCR7^-CD45RA^+$ T_{EMRA} sejtekké differenciálódik. A T-sejtekben kifejeződő K^+ csatornák, mint a Kv1.3 és a KCa3.1 száma függ a sejt aktivációs és differenciálódási állapotától [65, 67, 70, 73-77]. Nyugalmi állapotban a $CD4$ és $CD8$ naiv, T_{CM} és T_{EM} sejtek lényegesen több Kv1.3 csatornát (200–300/sejt) expresszálnak, mint a KCa3.1 csatornákat (8–20/sejt). Az antigén vagy

mitogén stimuláció hatására létrejövő naiv-effektor és T_{CM} -effektor sejtek hasonló számú Kv1.3 és KCa3.1 csatornát fejeznek ki (Kv1.3: 400-500/sejt; KCa3.1: 200-500/sejt). Az aktivált $CD4^+$ és $CD8^+$ T_{EM} sejtek Kv1.3 csatornákat magas (1500/sejt), míg az KCa3.1 csatornákat alacsony számban fejezik ki (~ 10/sejt) [76-78]. A csatornák génexpressziós mintázataiban bekövetkező különbségek jelentősen befolyásolják a membránpotenciál és a Ca^{2+} jelátvitel szabályozását, ezáltal a T-sejtek aktivációját és effektor funkcióit [77, 79, 80].



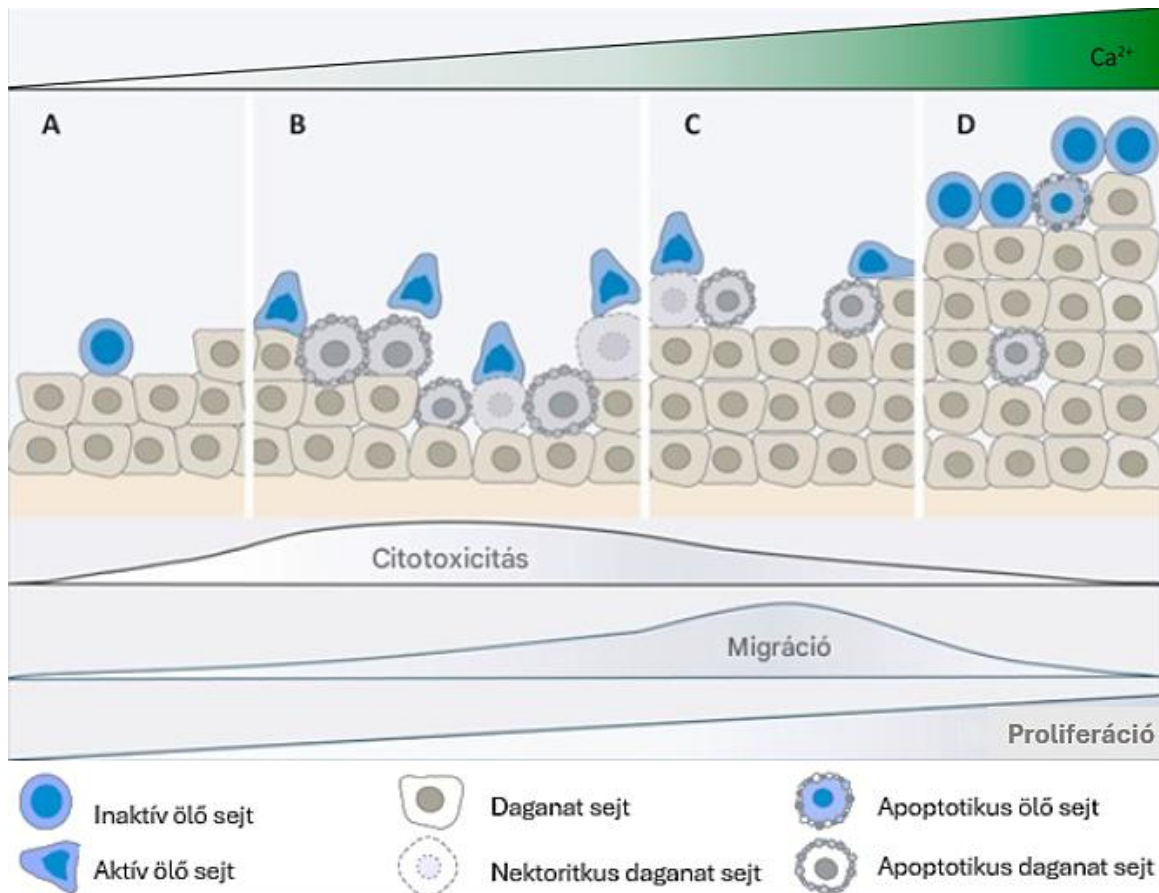
7. ábra: Kv1.3 és KCa3.1 csatornák eloszlása különböző T-sejt aktivációs és differenciálódási állapotban [76].

A négy alcsoport (naiv, T_{CM} , T_{EM} és T_{EMRA}) a CCR7 és a CD45RA expressziója alapján különböztethető meg. T_{CM} : centrális memória T-sejt, T_{EM} : effektor memória T-sejt, T_{EMRA} : $CD45RA^+$ effektor memória T-sejt

2.10 A Ca^{2+} optimum szabályozó szerepe a daganatok elleni küzdelemben

A citotoxikus T-limfociták (CTL) és az NK sejtek szükségesek a szervezet daganat elleni védelméhez [1, 2]. A Ca^{2+} a nyiroksejtek működésének és a rák homeosztázisának kulcsfontosságú metabolikus tényezője. CTL és NK sejtek esetében az intracelluláris ($[Ca^{2+}]_{int}$) és extracelluláris ($[Ca^{2+}]_{ext}$) Ca^{2+} -szint változásai fontosak lehetnek a tumorterápia szempontjából, ugyanis ezen változások befolyásolhatják a sejtek migrációs, proliferációs és citotoxikus folyamatait (8. ábra). A 100 nM-nál kisebb nyugalmi $[Ca^{2+}]_{int}$ érték esetén a CTL- és NK-sejtek citotoxicitása kissé csökkent és migrációs képességük nagy mértékben korlátozott (8. ábra A panel). A $[Ca^{2+}]_{int}$ emelkedés 100-300 nM-ra (NK sejteknél valamivel magasabb) az

optimális citotoxikus potenciál eléréséhez szükséges (8. ábra B panel). A 300 nM feletti $[Ca^{2+}]_{int}$ érték a migrációhoz optimális, azonban a citotoxicitás már kissé csökken (8. ábra C panel). Nagyon magas $[Ca^{2+}]_{int}$ esetén a citotoxicitás és a migráció szuboptimális, míg a proliferáció és az apoptózis dominál (8. ábra D panel) [81, 82].



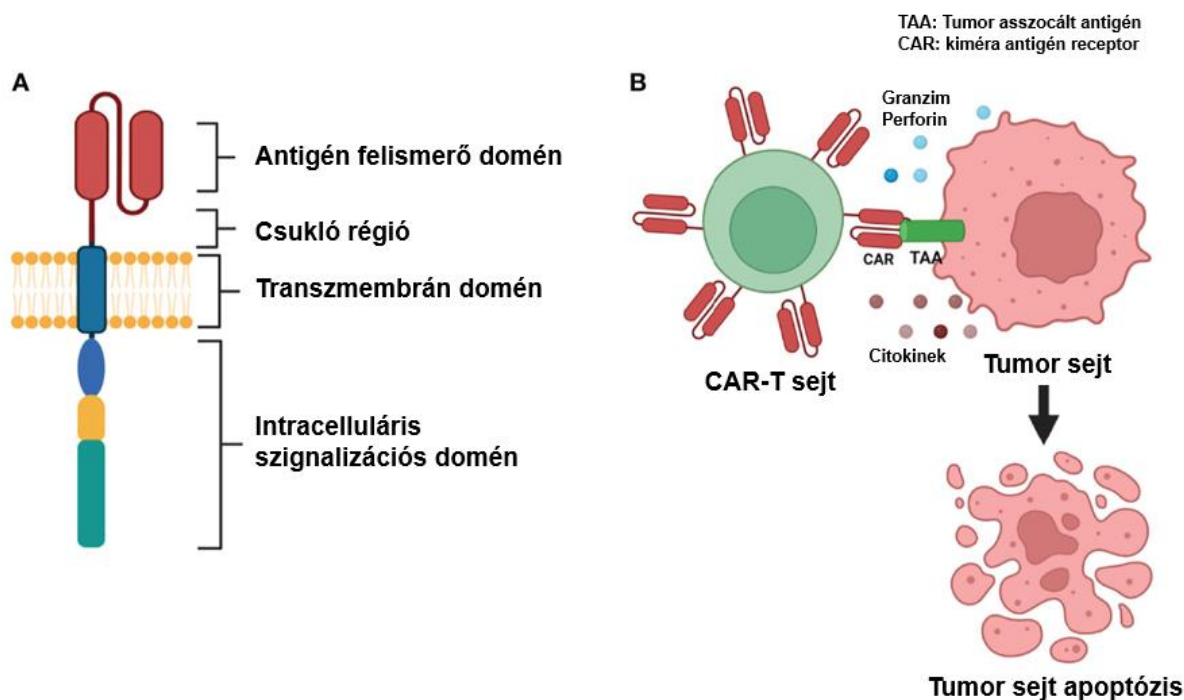
8. ábra: A CTL- és NK-sejtek különböző funkcióihoz szükséges Ca^{2+} optimum koncentráció tartományok [81]

Az intracelluláris Ca^{2+} -szint változásai befolyásolják a sejtek migrációs, proliferációs és citotoxikus folyamatait. (A) Nyugalmi $[Ca^{2+}]_{int}$ értéken (<100 nM) a CTL- és NK-sejtek működése korlátozott. (B) Már nagyon alacsony emelkedésnél, 100-300 nM $[Ca^{2+}]_{int}$ tartomány esetében a citotoxicitás dominál. (C) A 300 nM feletti $[Ca^{2+}]_{int}$ optimális a migrációhoz, míg a nagyon magas $[Ca^{2+}]_{int}$ (>500 nM) esetén a proliferáció dominál (D).

2.11 CAR-T sejtek felépítése, CAR generációk

A CAR-T sejtek a T-sejtek génmanipulációjával létrehozott kiméra antigén receptorral rendelkező T-sejtek. Ezen receptorok endogén TCR-rel ellentétben, képesek az MHC/HLA prezentáció hiányában felismerni az antigéneket. A CAR négy fő doménből áll: egy extracelluláris antigén-felismerő ektodoménből, egy csukló régióból, egy a receptor

stabilitásáért és sejtfelszíni kifejeződésért felelős transzmembrán doménből, illetve egy intracelluláris endodoménből, amely lehetővé teszi a szignálfehérjék toborzását és foszforilációját (9. ábra A panel) [83]. A szintetikus CAR receptorokat expresszáló T-sejtek képesek felismerni a tumorsejtek felszínén található specifikus antigént, majd eliminálják a daganatot (9. ábra B panel) [84].

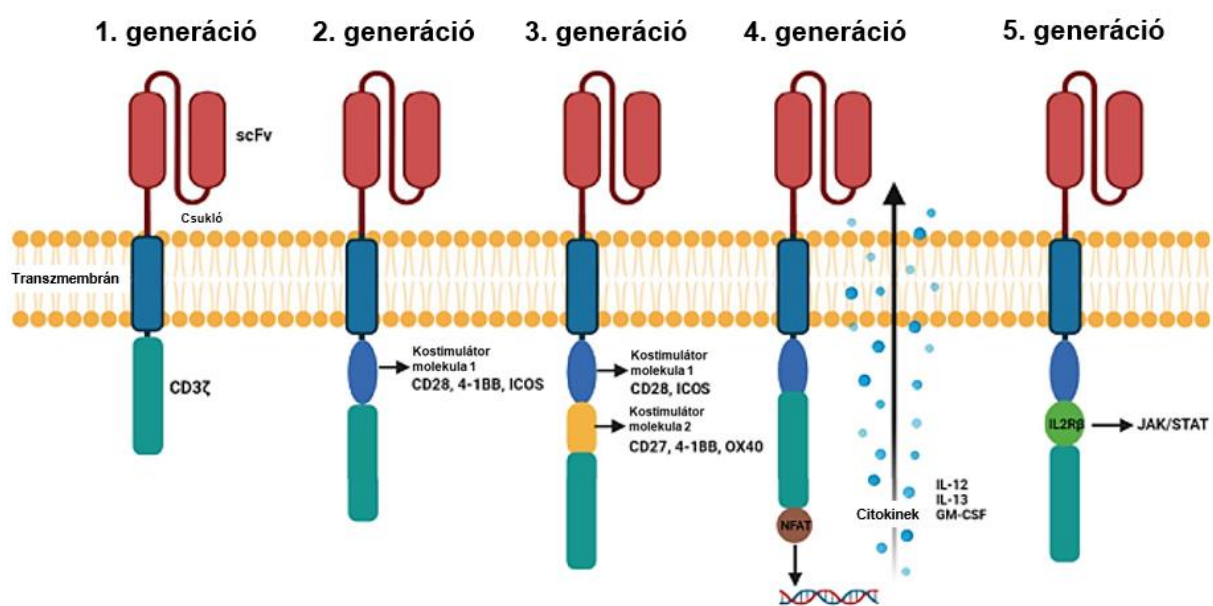


9. ábra: A CAR struktúra alapelveinek (A), a CAR-típusú T-sejtek tumorsejtekre gyakorolt hatásának mechanizmusa (B) [85].

(A) A CAR-ok olyan szintetikus receptorok, amelyek egy antigénkötő doménből, csukló doménből, transzmembrán doménből és intracelluláris jelátviteli doménből állnak. (B) Az extracelluláris antigénkötő domén felismeri a célzott tumor-asszociált antigéneket (TAA) és olyan jelátvitel folyamatot indukál, amely a sejtek apoptózisához/sejthalálhoz vezet.

Az elmúlt évek során a CAR endodomén konformációját sokszor megváltoztatták a CAR-T sejtek aktivitása, proliferációja és terápiás hatékonyságának növelése céljából (10. ábra). Az első generációs kiméra antigén receptorok mindössze egy endodomént (CD3 ζ láncot) tartalmaznak, azonban a második generáció az intracelluláris domén mellé egy kostimulátor (CD28/4-1BB/OX-40) régiót építettek be, amely fokozza a T-sejtek aktiválódását, proliferációját és túlélését. A harmadik generáció esetében két kostimulátor szignalizációs domént kombináltak (CD3-CD28-OX40 vagy a CD3-CD28-41BB) a proinflammatorikus környezetet indukálása, gyors tumor elimináció és a CAR-ok hosszútávú fennmaradása céljából. A 4. generációs CAR, másnéven TRUCK (T cells Redirected for Universal Cytokine

Killing) konstrukciójában a második generáció tulajdonságait kombinálják. Ezek esetében az endodomén NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells,) specifikus kazettát tartalmaz, melyek aktiválásával képesek szabályozni a citokin termelést és az ezáltal sejtaktivációt, proliferációt és effektor funkciókat. Ezen CAR-ok alkalmazása során azonban számos nem kívánt hatás figyelhető meg, mint például a tumoron kívüli aktivációja és a transzgenikus citokinek felszabadulása egészséges szövetekben [86]. Az utolsó, azaz 5. generációs CAR-ok struktúrájába integrálták az IL-2 béta láncát, amely STAT3 transzkripciós faktorttal kötődik, ezáltal indukálva a citokin felszabadulást [85, 87].



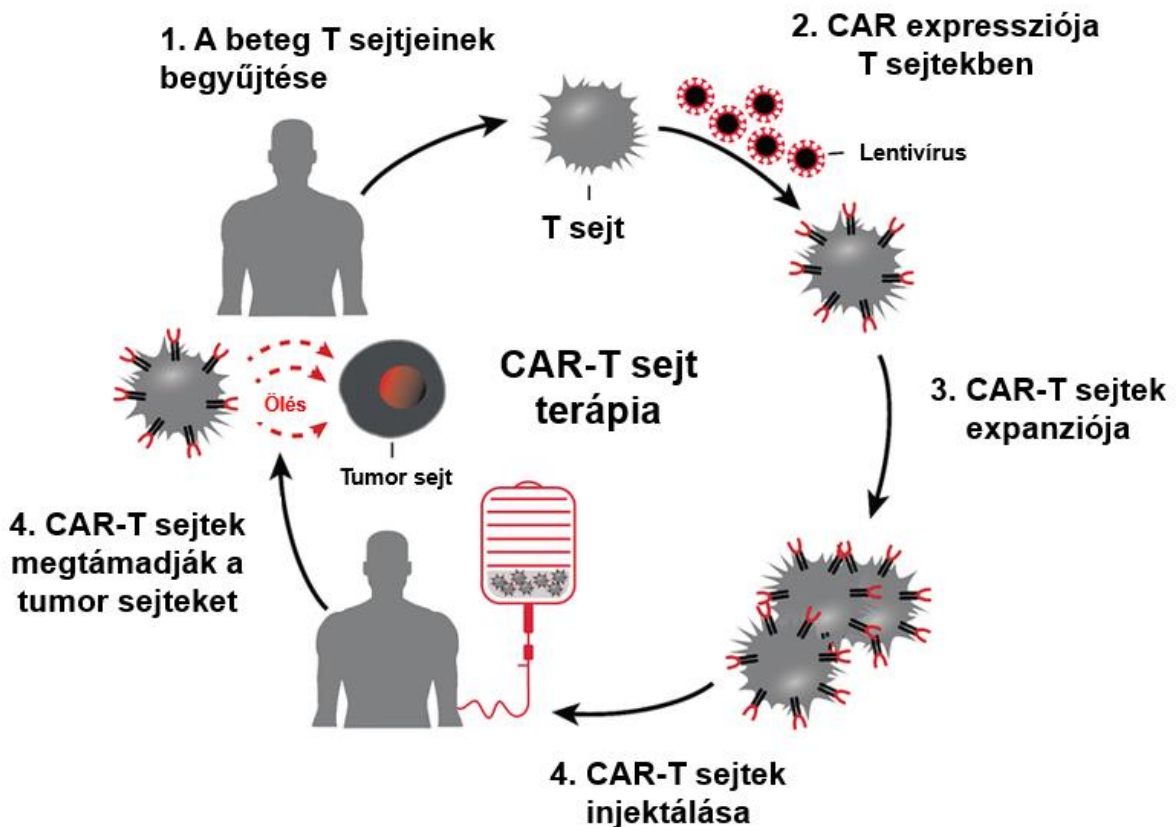
10. ábra: CAR generációk fejlődése [85]

A CAR-T sejterápia hatékonyságának és biztonságosságának javítása érdekében a CAR-T sejtek számos progresszív változáson mentek keresztül a CAR szerkezetének az intracelluláris jelátviteli domének alapján történő módosításával. Jelenleg az 1-3 generációs CAR T sejteket használják terápiás célokra.

2.12 CAR-T sejt terápia

A CAR-T sejt terápia előnye, hogy szisztematikusan és hatékonyan pusztítja el a daganatsejteket anélkül, hogy károsítaná a környező egészséges sejteket [88, 89]. CAR T-sejt terápia jelentős előrelépést jelent a személyre szabott rákkezelésben. Az FDA (Food and Drug Administration) már több, mint hat CAR T-sejt terápiát hagyott jóvá hematológiai malignitások, például a nagy B-sejt limfóma (LBCL) esetén [90]. A terápia első lépése a leukoferezis, amely során leveszik a páciens vérének, majd a T-sejteket szeparálják belőle (11.

ábra). Ezután laboratóriumi körülmények között a T-sejteket genetikailag módosítják, hogy azok expresszálják a kiméra antigén receptort. Az így létrehozott CAR-T sejteket felszaporítják, majd infúzióval visszajuttatják a páciensbe, ahol megkezdik a tumor sejtek felkutatását és eliminálását [91, 92]. A terápia sikerességének ellenére, azonban még számos kihívás maradt a terápia hatékonyságának és biztonságosságának javítására a CAR T-sejtek kimerülése, a toxicitási hatás és a szolid tumorok esetében a korlátozott válasz miatt [93]. Tanulmányok arról számoltak be, hogy sok beteg nem reagál a kezelésre, valamint neurotoxicitástól és citokin-felszabadulási szindrómától szenved [94]. Ráadásul a kihívást jelentő szuppresszív tumoros mikroenvironment megnehezíti e terápia túlélését és megfelelő működését [95]. A CAR-T sejt terápia hatékonysága javítható a különböző immunterápiás szerekkel vagy más terápiás módszerekkel (sugárterápia vagy kemoterápia) történő kombinációjával, amelyek elősegíthetik a tumor eliminációját [91].

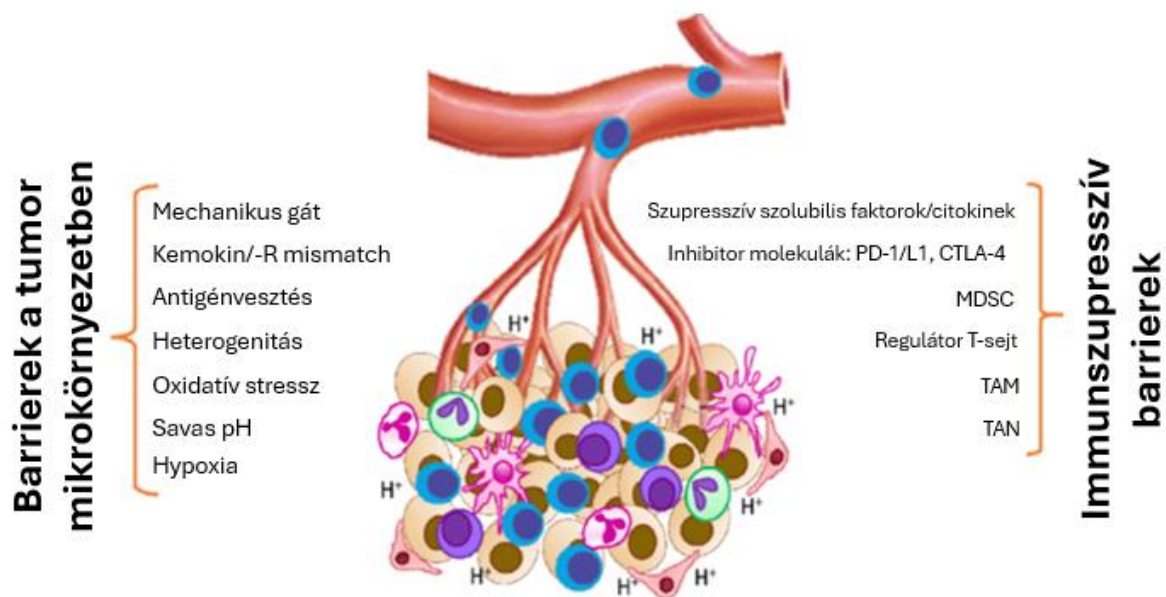


11. ábra: A CAR-T sejt terápia kezelési ciklusa [92]

A CAR-T sejterápia egy olyan személyre szabott sejtalapú terápia, amely a beteg saját T-sejtjeinek CAR-t kifejező módosítását jelenti. A terápia több lépést foglal magába: a betegétől származó T-sejtek begyűjtését, a sejtek tumorspecifikus antigénre irányuló CAR expresszióját, a CAR-T sejtek expanzíóját és tisztítását, valamint a CAR-T sejtek terápiás céllal történő visszainjektálás a betegbe.

2.13 Tumor mikroökönyezet (TME)

Az immunrendszer kettős szerepet játszik a tumorfejlődésben, ugyanis képes azonosítani és ellenőrizni a tumorsejteket egy immunfelügyeletnek nevezett folyamatban, és különböző mechanizmusokon keresztül immunszuppresszióval elősegítheti a tumor progresszióját [96]. Azonban az immunrendszer által végzett immunfelügyelet gyakran kudarcot vall, mivel a tumorsejtek képesek átprogramozni a túlélésüket biztosító létfontosságú útvonalakat. A CD8⁺ T-sejtek a tumor mikroökönyezetében jelen lévő különböző immunszuppresszív mechanizmusok, barrierék miatt nem képesek hatékonyan ellátni az effektoros funkciókat és így eliminálni a rákos sejteket (12. ábra). A TME metabolikus (emelkedett extracelluláris K⁺, H⁺, ATP- és adozinszint, hipoxia és fokozott savasság) és sejtkomponensek, például a programozott sejtthalál ligand 1 (PD-L1) túlreprezentációja révén akadályozza a CD8⁺ T-sejtek effektor funkcióit. Immunszuppresszív tényezők közé sorolhatók mieloid szuppresszor sejtek (MDSC), a regulátor T-sejtek, a tumorasszociált makrofágok (TAM) vagy neutrofilek (TAN), a szuppresszív szolubilis faktorok és citokinek [97]. A megnövekedett extracelluláris K⁺ mellett a hipoxia gátló hatást fejt ki a Kv1.3 csatornákra azáltal, hogy gátolja a csatorna aktiválódását [98]. A tumorsejtek felszínén expresszálódó PD-L1 a T-sejtek PD-1 receptorához kötődik, ezáltal a PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz) útvonalon keresztül KCa3.1 gátlást vált ki [99, 100]. A T-sejtek A_{2A}-receptorához kötődő adozin csökkent KCa3.1 csatorna működést eredményez. Mindazonáltal a regulátor T-sejtek és a tolerogén dendritikus sejtek elnyomják az infiltráló T-limfociták tumorelles választ [23, 99-101].

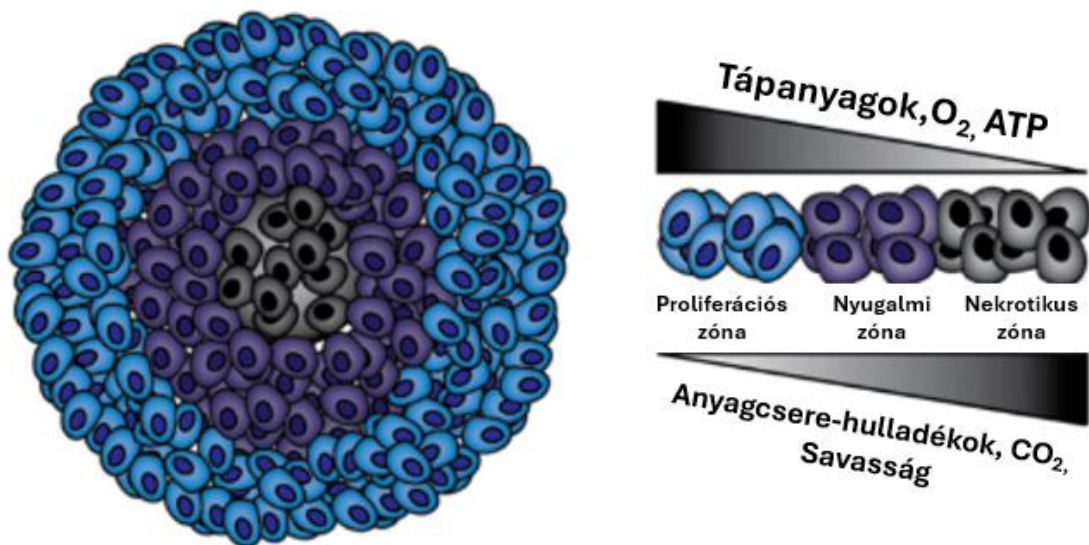


12. ábra: Barrierék a szolid tumorok mikroökönyezetében [97]

A tumor mikrokörnyezete a tumort körülvevő és tumorban kialakuló komplex környezet, amely döntő szerepet játszik a tumor növekedésében, progressziójában, áttétképződésében és a terápiákra adott válaszban.

2.14 Szferoid, *in vitro* tumor modell

A 2D modellrendszerek használata számos hátrányt jelent, míg a tumor xenograft transzplantáció költséges és időigényes eljárás. Ezt a problémát a natív tumor és a tumor mikrokörnyezet jellemzőit utánzó, több sejttípust is tartalmazó 3D-s tumor modellek kifejlesztésével kívánják megoldani. Az 500 μm -nél nagyobb átmérőjű tumorszferoidokat gyakran jellemzik hipoxiás területek és nekrotikus központok, és olyan faktorokat termelnek, amelyek fokozzák a rosszindulatú sejtek proliferációját és túlélését (13. ábra). A szferoidoknak számos alkalmazási területe van, felhasználhatók a TME és az angiogenesis modellezésére, xenograft modellként és biobank-ként, gyógyszeresűrésre és terápiás szerek fejlesztésének elősegítésére [102, 103].



3. ábra: Tumor szferoidok szerkezete és biológiája [104]

A tumor szferoidok 3D gömb alakú struktúrák, amelyeket gyakran használnak modellként a daganatok biológiájának és a gyógyszerrezisztenciának a tanulmányozására. Képesek a szolid tumorok kulcsfontosságú jellemzőit utánozni, beleértve a sejtek heterogenitását, jelátvitelét és az extracelluláris mátrixszal való kölcsönhatásokat. A tumor szferoidokban a külső szélén található a proliferatív zóna, ahol a sejtek aktívan osztódnak és növekednek, mivel elegendő tápanyaghoz és oxigénhez jutnak. A szferoid mélyebb rétegei, a perifériától távolabb, nyugalmi zónát és végül nekrotikus zónát alkotnak, ahol a sejtosztódás leáll, és a sejtek a csökkent oxigén- és tápanyagellátás miatt elhalhatnak.

3. CÉLKITŰZÉS

Doktori értekezésemben a T limfociták ioncsatornáinak szerepét vizsgáltam patológias körülmények között két különböző aspektust szem előtt tartva:

3.1 Kv1.3, KCa3.1 és Orai1 ioncsatornák aktivitása daganatos betegek CD8⁺ T-sejtjeiben

A T-sejt ioncsatornák különböző expressziós mintázattal rendelkezhetnek a különféle daganatokban. Számos esetben ezen csatornák biomarkerként szolgálhatnak a daganatos megbetegedésekben. Az eddigi kutatások többsége tumor infiltráló T-limfocitákat (TIL) vizsgált ezen adatok feltárására. Célunk az volt, hogy:

1. Ovárium tumoros (malignus és benignus) betegek és egészséges donorok perifériás véréből izolált CD8⁺ T-limfociták Kv1.3, KCa3.1 expressziós szintjének jellemezzük patch-clamp módszerrel.
2. Ovárium tumoros (malignus és benignus) betegek és egészséges donorok CD8⁺ sejtjei Ca²⁺-válaszát vizsgáljuk, ezáltal az Orai1 ioncsatornák funkcionális expresszióját jellemezve FURA-2 alapú Ca²⁺-imaging módszer segítségével.

3.2 CAR-T sejtek ioncsatornáinak (Kv1.3, KCa3.1, CRAC) szerepe a tumor infiltráció és elimináció során

Korábban leírták, hogy a T-sejtek migrációja és az effektor funkciója során az Kv1.3, KCa3.1 és Orai1 csatornák fontos szerepet játszanak a Ca²⁺ jelátvitel szabályozásával. Akár csak T-sejtek esetén, CAR-T sejtekben is kiemelkedő szerepet játszhatnak ezen ioncsatornák. Célunk az volt, hogy:

1. A kiméra antigén receptort expresszáljuk CCRF-CEM és humán perifériás vérből izolált, aktivált T-sejtekben, majd a CAR funkcionalitását validáljuk Calcein-Red AM alapú 2D ölési assay-vel, CEM-CAR sejtekkel.
2. A létrehozott CEM-CAR sejtek Kv1.3/KCa3.1 és CRAC ioncsatorna expresszióját meghatározzuk és farmakológiai mérésekkel azonosítjuk.
3. CEM-CAR és CAR-T sejtek ioncsatornáinak szerepét vizsgáljuk (Kv1.3 és KCa3.1) tumor ölési és infiltrációs képességükben Live-or-Dye alapú 3D szferoid assay-vel, specifikus ioncsatorna gátlószerek segítségével.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Egészséges és beteg donorok

Az OC vizsgálatokat 44 és 71 év közötti, petefészekrákos betegek (4 rosszindulatú (malignus) és 3 jóindulatú (benignus) daganatos beteg) perifériás vérén végeztük. A vizsgálatba való bekerülési kritérium volt a szöveti biopsziával megerősített pozitív OC diagnózis, valamint az, hogy a vérvétel időpontját megelőzően nem volt kemo- vagy sugárterápia. Az OC daganat stádiuma a betegek esetében T2 és T3 volt, N0 és N1 csomóstátusszal. A vizsgálati alanyok adatait a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Nőgyógyászati és Szülészeti Klinikáján gyűjtötték és kezelték. OC vizsgálatokhoz perifériás vért vettek továbbá 5 egészséges női donortól (HD), akik 40 és 55 év közötti korosztályba tartoztak. A vizsgálatot és a beleegyező nyilatkozatokat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatási Etikai Bizottsága hagyta jóvá (RKEB/IKEB sz.:5091-2018; 6627-2023).

4.2 PBMC izolálása, aktiválása

A perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC) teljes vérből izoláltuk a korábban leírtak szerint [23, 105]. Röviden, a PBMC-ket teljes vér centrifugálásával izoláltuk SepMate PBMC izoláló cső (STEMCELL Technologies, Cambridge, MA, USA) segítségével, Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA) sűrűséggradiens alkalmazásával. A PBMC izolálás során a frissen levett emberi vért kétszeresére hígítottuk HBSS-sel (Hank's Balanced Salts Modified: (Sigma H4891), Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes, 15 mM HEPES-t adtunk hozzá, pH = 7,4). A SepMate™ PBMC izoláló csőbe (STEMCELL Technologies, USA) 15 ml Histopaque-1077-et mértünk. A hígított vért a SepMate csőbe mértük a Ficoll rétegre. Centrifugálás után az opálos réteget, amely perifériás mononukleáris sejteket tartalmazta, 50 ml-es csőbe helyeztük át, majd kétszer mostuk HBSS-sel, és RPMI (Roswell Park Memorial Institute) médiumban (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) reszuszpendáltuk. A perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBMC-k) 10% magzati borjúsérummal, 15 mM HEPES-sel, 2 mM L-glutaminnal, 1 mM Na-piruváttal és 200 egység streptomocinnel/penicillinnel kiegészített RPMI tápfolyadékban tartottuk. Az aktiválást 48 órán keresztül végeztük 24 lyukú sejtenyésző plate-ben, amelyet egér anti-humán CD3 és CD28 antitestekkel (mindkettő 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BioLegend, San Diego, CA, USA) [15] vontunk be. A létrehozott CAR-T sejtek esetében a 2. napon a T-sejtek expanzióját humán interleukin-7 (IL-7; 10 ng/ml) és humán interleukin-15 (IL-15; 5 ng/ml) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) segítségével támogattuk. A

vizsgálatot és a beleegyező nyilatkozatokat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatási Etikai Bizottsága hagyta jóvá RKEB/IKEB sz.:5091-2018; 6627-2023.

4.3 Sejtenyésztés

A HEK293T és MCF-7 sejteket (HEK293T: CRL-3216, MCF-7: HTB-22; ATCC, Manassas, VA, USA) 2 mmol/l GlutaMAX-szal és 10% magzati borjúsérummal (FCS) és antibiotikumokkal kiegészített Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (DMEM) tenyésztettük.

A T-limfoblaszt Jurkat-E6-1 (később Jurkat, (TIB-152; ATCC, Manassas, VA, USA)) és a CD19⁺ B-limfoblasztoid Raji sejteket (CCL-86; ATCC, Manassas, VA, USA) 2 mmol/l GlutaMAX és 10% FCS és antibiotikumokkal kiegészített RPMI táptalajban tenyésztettük.

A CCRF-CEM (CCL-119; ATCC, Manassas, VA, USA) T-limfocita sejteket ATCC-formulált RPMI-1640 táptalajban (ATCC, Manassas, VA, USA) tenyésztettük, amelyet 10% magzati szarvasmarha-sérummal (FBS) és antibiotikumokkal egészítettünk ki.

Primer humán T-sejteket és a CAR-T sejteket 25 mM HEPES-sel, 2 mmol/l GlutaMAX-szal, 10% FCS-vel és antibiotikumokkal kiegészített RPMI táptalajban tenyésztettük. A sejtvonalakat ~80%-os konfluencia mellett tenyésztettük, 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban tároltuk és 2-3 naponta passzáltuk,

4.4 Transzformálás

A kódoló plazmidokat (10 ng) 105 µl saját laboratóriumunkban előállított TOP10 (E. coli törzs) kompetens sejtekhez adtuk, majd 20 percig jégen inkubáltuk. A 20 perc letelte után 42°C-on hőshockot alkalmaztunk (60 s), majd ismét jégre helyeztük a mintákat. A sejteket hozzáadtuk 800 µl SOC (Super Optimal growth with Catabolites repression) médiumhoz, majd 1 órán át, 37 °C-on ráztattuk 200 rpm-en. Az 1 óra letelte után a mintákat 4000 rpm-en, 5 percig, szobahőmérsékleten lecentrifugáltuk, majd a pelletet szélesztettük a szilárd táptalajra. A petriben lévő sejteket 12-16 órán keresztül, 37°C-on növesztettük. A mintákat későbbi felhasználásra 4 °C-on tároltuk.

4.5 Plazmid preparálás

A nagyobb mennyiségű plazmid DNS kinyeréséhez a PureYield Plasmid Maxiprep System-et (Promega Corporation, USA) alkalmaztunk. A transzformálás során kinőtt baktérium telepekből a megfelelő antibiotikum tartalmú LB (Luria Bertani Broth) vagy TB (Terrific Broth) tápoldatba (100 ml) oltottunk le egy-egy telepet, és 16 órán keresztül, 37°C-on, 200rpm-en

rázattuk. Másnap begyűjtött sejteket 10 percig 5000 g-n centrifugáltuk, majd a pelletet 12 ml Cell Resuspension oldatban felszuszpendáltuk. A mintákat ezután 12 ml Cell Lysis oldattal homogenizáltunk, majd 3 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a mintákhoz 2 ml Neutralization oltatot adtunk, majd a sejtlyízátumot 14000g sebességgel centrifugáltuk, 20 percig szobahőmérsékleten. A vákuumszívó berendezésre illesztettük BlueYield Cleaning és PureYield Maxi Binding Column oszlopokat illesztettük. A lizátumot az oszlopra töltöttük, majd bekapcsoltuk a vákuumot. A BlueYield Cleaning oszlopot eltávolítottuk, majd a PureYield Maxi Binding oszlopra 5 ml Endotoxin Removal Wash oldatot adtunk, majd a vákuummal leszívtuk. Az oszlopra 20 ml Column Wash oldatot adtunk, majd a vákuum segítségével az oszlop membránját 5 percig szárítottuk. A kikötő oszlopot egy 50 ml-es centrifugacsőbe helyeztük, amelyre 0,5 ml NFW-et (nukleáz mentes víz) pipettáztunk, majd kilengős rotorú centrifugában lecentrifugáltuk szobahőmérsékleten, 2000 g-n, 5 percig. A folyamatot újból megismételtük 0,5 ml NFW oszlopra adása után. A cső tartalmát egy RNáz/DNáz mentes eppendorf-csőbe helyeztük és Nanodrop 2000 segítségével kvantitáltuk a DNS koncentrációt.

4.6 A CD8⁺ sejtek monoklonális antitest adhéziója

Az aktivált PBMC-ket egér anti-humán CD8 monoklonális, primer antitesttel (1 µg/ml, Biologend, USA) jelöltük, majd a jelölt sejteket kecske anti-egér IgG, spoliklonális antitesttel (10 µg/ml Thermo Fisher Scientific Inc., Budapest, Magyarország) bevont bakteriális minőségű petri-csészébe helyeztük [106]. Az elektrofiziológiai felvételek előtt a sejteket háromszor mostuk extracelluláris oldattal.

4.7 Retrovirális transzdukció, CD19⁺ MCF és CAR-T sejtvonalak létrehozása

72 órával a transzfekció előtt $3,5 \times 10^5$ HEK293T sejtet raktunk ki 10 cm-es tenyésztőedénybe, 10% FBS-sel és 1% L-glutaminnal kiegészített DMEM médiumba (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA). A vírusvektor részecskéket a HEK293T sejtekben, az sGFP konjugált, CD19-specifikus CAR-t kódoló pBMN retrovírus vektorokkal (4 µg, pBMN-sGFP-CAR, Xiaolei Su lab (Yale University, New Haven, CT, USA)) vagy humán CD19 markert kódoló MSCV vektorral (4 µg; MSCV-hCD19;127889; Addgene, Watertown, Massachusetts, USA), PAX2 csomagoló plazmiddal (4 µg; 12260; Addgene, Watertown, Massachusetts, USA) és VSVG plazmiddal (4 µg; 14888; Addgene, Watertown, Massachusetts, USA) történő transzfekciójával állítottuk elő jetPrime transzfekciós reagens (Polyplus, Illkirch, Franciaország) segítségével. A retrovírust tartalmazó felülúszókat 48 óra elteltével begyűjtöttük. A vírus-borított plate-et állítottunk elő centrifugálással (2000 g, 120 min). A

CCRF CEM és T-sejteket ($2,5 \times 10^4$ sejt/cm²) retrovírus részecskékkel (250 µl/cm²) RetroNectin bevonatú (Takara, Kusatsu, Japán) lemezen transzdukáltunk. T-sejtek esetében IL-7-et (10 ng/ml) és IL-15-öt (5 ng/ml) adtunk a médiumhoz a perzisztencia növelésének céljából. 72 órás inkubációt követően használtuk fel a sejteket a kísérletekhez.

4.8 Elektrofiziológiai mérések

A CAR-T sejtekben a KCa3.1 és Kv1.3 áramok mérése patch-clamp technika teljes-sejt feszültség-zár konfigurációjában történt szobahőmérsékleten (23-25 °C) Multiclamp 700 B/Axopatch 200 A erősítővel, amely egy Axon Digidata1440 digitalizátorral (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) volt csatlakoztatva a személyi számítógéphez. pClamp 10.6 szoftvert (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) használtunk az áram rögzítéséhez és a későbbi elemzéshez. Az aszpartátos külső oldat a következőket tartalmazta (mmol/l-ben): 145 Na-aszpartát, 5 KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,0 MgCl₂, 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH = 7,4). A patch-clamp pipetta oldat (belső oldat) összetétele a következő volt (mM-ben): 145 K-aszpartát, 10 K₂EGTA, 8,5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES (szabad Ca²⁺ koncentráció 1 µM, pH = 7,2). A patch-clamp pipettákat (4-6 MΩ) GC150F-15 bórszilikát kapillárisokból (Harvard Apparatus, Kent, Egyesült Királyság) húztuk. Az áramokat egy 200 ms-os rámpa protokollal, 15 másodpercenként váltottuk ki, amely -120 mV-tól +50 mV-ig terjedtek, a tartófeszültség -70 mV volt [23]. A KCa3.1 csatornák ($G_{KCa3.1}$) és a Kv1.3 ($G_{Kv1.3}$) csatornák teljes-sejt vezetőképességét a korábban leírtak szerint számoltuk ki [37]. Minden egyes sejt esetében a konduktanciát három egymást követő rámpa-protokoll átlagaként számoltuk ki.

4.9 Ioncsatornák farmakológia azonosítása

A farmakológiai mérésekhez a következő gátlószereket adtuk a sejtekhez: Vm24 (1 nM, specifikus Kv1.3 blokkoló) és TRAM34 (KCa3.1 specifikus, 200 nM). A TRAM34-et DMSO-ban oldottuk, majd 150 mM KCl-t, 1 mM MgCl₂-t, 2,5 mM CaCl₂-t, 5,5 mM glükózt és 10 mM HEPES-t tartalmazó, magas K⁺ tartalmú oldatban hígítottuk (pH 7,35). A normál extracelluláris oldat 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz és 10 mM HEPES, pH 7,35 volt. Az oldatcserét gravitációval hajtott perfúziós rendszerrel végeztük. A Vm24-et aszpartát külső oldattal oldottuk (lásd 4.8). A farmakológiai mérésekhez használt belső oldat összetétele megegyezett a patch-clamp mérésekével. A TRAM34-et Heike Wulfftól (UC Camp Davis, USA) kaptuk, a rekombináns Vm24-et laboratóriumunkban állították elő.

4.10 Intracelluláris Ca²⁺-mérés

Az intracelluláris Ca²⁺ válaszok méréséhez az NT (nem transzdukált) CEM, CEM-CAR és NT T-sejteket 1 µM FURA-2-AM-mel (Thermo Fisher Scientific Inc., Budapest, Magyarország) töltöttük. A sejteket először 0 majd 2 mM Ca²⁺-os oldattal (143,3 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 10 mM HEPES, 5,5 mM glükóz, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, pH 7,35) perfundáltuk a sejtek integritásának ellenőrzése céljából, majd 1 µM thapsigargin (TG, ER-ban lévő SERCA pumpa antagonistája) (Thermo Fisher Scientific Inc.) tartalmazó 0 mM Ca²⁺ oldatot perfundáltunk az ER kiürítéséhez, majd 2 mM Ca²⁺ (143,3 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 10 mM HEPES, 5,5 mM glükóz, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,35) oldatot alkalmaztunk, amely 1 µM TG-t tartalmazott, CRAC-on keresztüli Ca²⁺-beáramlás és intracelluláris Ca²⁺ emelkedés detektálásához. Az ioncsatorna-inhibitorok NT T-sejtek intracelluláris Ca²⁺-válaszaira gyakorolt hatásának vizsgálatához 1 nM Vm24/ 1 µM TRAM34-et adtunk az 1 µM TG-t tartalmazó 2 mM Ca²⁺-oldathoz. Az NT CEM, CEM-CAR és NT T-sejtek Ca²⁺-válaszának amplitúdóját a FURA-2 csúcs és az alapjel (2 mM Ca²⁺ TG-vel kiegészített oldat hozzáadása előtti átlagaként számított érték) 340 nm/380 nm-es intenzitásarány közötti különbség meghatározásával számoltuk.

4.11 Áramlási citometria

A CD19-specifikus CAR expressziót az sGFP (superfolder zöld fluoreszcens fehérje) pozitívitas igazolta. A CD19 pozitívitas vizsgálatához a sejteket centrifugáltuk (400g, 5 perc, 4°C) és 1%-os PFA-val fixáltuk, majd 10 percig jégen és sötétben inkubáltuk. Ezt mosási lépés követte 1x PBS-sel centrifugálva. Az Fc-receptorok blokkolásához a sejteket purified anti-CD16/CD32 antitesttel (1µg/10⁶ sejt/ 100 µl térfogatban 1× PBS-ben, amely 10% BSA-t tartalmazott) 10 percig jégen inkubáltuk. A sejteket centrifugáltuk (400g), PBS-szel mostuk, majd 30 percig jégre helyeztük Alexa Fluor 647 anti-humán CD19 (katalógusszám: 302220, HIB19; Biolegend) antitest jelenlétében. A kiértékelést mintánként legalább 10⁴ sejten végeztük NovoCyte 3000RYB (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) áramlási citométerrel és NovoExpress szoftverrel (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) segítségével.

4.12 Calcein Red-alapú ölési assay

A citotoxicitás vizsgálatához a célsejteket 1 µM Calcein Red AM oldatban reszuszpendáltuk a gyártó protokollja alapján (<https://www.biolegend.com/en-gb/products/calcein-red-am-18901>, letöltés dátuma: 2024. január). Ezt követte 30 perces inkubáció szobahőmérsékleten, sötétben. A sejteket lecentrifugáltuk (400g, 5 perc, RT), 1× PBS-szel mostuk, majd tápfolyadékban

reszuszpendáltuk és 10 percig inkubáltuk. A sejteket 8 lyukú ibidi kamrába (ibidi GmbH, Németország) raktuk ki. A CEM-CAR effektor sejteket és a Raji, NT MCF-7 és CD19 MCF-7 célsejteket 2:1 E:T (effektor : target) arányban helyeztük a kamrákba, és 3 órán át koinkubáltuk azokat. A célsejtek Calcein Red festődésének kimutatásához konfokális felvételeket készítettünk Nikon konfokális mikroszkóppal (gerjesztés: 561 nm-es He-Ne lézervonal, detektálás: 576 nm-es LP szűrő). A sejtek átlagos Calcein Red fluoreszcencia-intenzitását ImageJ 1.54F szoftverrel határoztuk meg.

4.13 Agaróz-alapú szferoid növesztés

A Jurkat, Raji és CD19 MCF-7 sejteket (5×10^3 sejt/ml 55 μ l médiumban) 1%-os agaróz géllal bevont 96 lyukú 3D μ -Plate-re (ibidi GmbH, Németország) pipettáztuk a gyártó protokollja szerint (https://ibidi.com/img/cms/downloads/an/AN32_Generation_of_spheroids.pdf, letöltés dátuma: 2024.szeptember). A szuszpenziókat szobahőmérsékleten 10 percig, 1000g sebességgel centrifugáltuk, majd a sejteket 5-7 napig tenyésztettük. A CD19⁻ szferoidokat CD19-negatív Jurkat sejtvonalból, míg a CD19⁺ szferoidokat Raji és CD19 MCF-7 sejtvonalból generáltuk.

4.14 Szferoid-alapú ölési és infiltrációs assay

A CEM-CAR és CAR-T sejtek háromdimenziós sejtkultúrákban történő infiltrációját és tumorölési képességét Live-or-Dye 640/662 (Biotium, Fremont, CA, USA) alapú ölési teszttel határoztuk meg. A Live-or Dye 640/662 egy olyan festék, amely képes behatolni az elhalt sejtekbe, melyek membránjai sérültek és kovalensen megjelölik az intracelluláris fehérjék szabad aminjait. A szferoidokat 24 órán keresztül effektor sejtekkel együtt koinkubáltuk, a CEM-CAR/CAR-T sejtek száma megegyezett a szferoidok növesztéséhez használt célsejtek kezdeti számával. A megfelelő mintákhoz ioncsatorna-inhibitorokat, TRAM34-et (1 μ M, KCa3.1), Vm24-et (10 nM, Kv1.3) adtunk. A TRAM34, a Vm24 és a DMSO citotoxikus hatásának vizsgálatához az effektor sejtek nélküli szferoidok szolgáltak kontrollként. 24 óra elteltével a 3D kokultúrákat Live-or-Dye 640/662 festékkel jelöltük a gyártói protokoll szerint. A szferoidokról Nikon-STORM konfokális mikroszkóppal 10 μ m vastagságban z-stack felvételeket készítettünk. Az ImageJ-t használtunk a Live-or-Dye 640/662 jelölődés és sGFP pozitív CAR-T sejtek szferoidba történő infiltrációjának a meghatározására [103]. A szferoid minden egyes szeletére meghatároztuk az össz-sejtszámot (total cell # (TC)), a CEM-CAR vagy CAR-T (# of CAR T cells (CC)) sejtek számát és a Live-or-Dye pozitív sejtek számát (# of dead cells (DC)). Mintánként legalább 3 szferoidot elemeztünk. A sejtek számából meghatároztuk a

CEM-CAR és CAR-T sejtek infiltrációs rátáját (IR) ($IR = CC / (TC-CC)$), az ölési rátát (KR) ($KR = DC / (TC-CC)$) és az ölési hatékonyságot (KE) ($KE = KR / IR$). A citotoxikus hatás méréséhez a halott sejtek százalékos arányát (Live-or-Dye pozitív sejtek) használtuk, amelyet az összes sejt és az elhalt sejtek számából számoltunk ki. Az antagonisták proliferációra gyakorolt hatásának nyomon követése érdekében kiszámítottuk a szferoidok TC-jének és átmérőjének (μm) változását ioncsatorna-inhibitorok (Vm24, TRAM34) jelenlétében és jelenléte nélkül.

4.15 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez és ábrázoláshoz a GraphPad Prism 9.3.1 szoftvert használtuk (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA). Több csoport összehasonlításához egyirányú ANOVA vagy Anova on Ranks tesztet végeztünk, két csoport összevetéséhez a kétmintás t- vagy Mann-Whitney-próbát alkalmaztunk. A különbségeket $p < 0,05$ esetén szignifikánsnak tekintettük. Az adatokat átlag \pm az átlag standard hibája (SEM) formában mutattuk be.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Kv1.3, KCa3.1 és Orai1 ioncsatornák aktivitása daganatos betegek CD8⁺ T-sejtjeiben

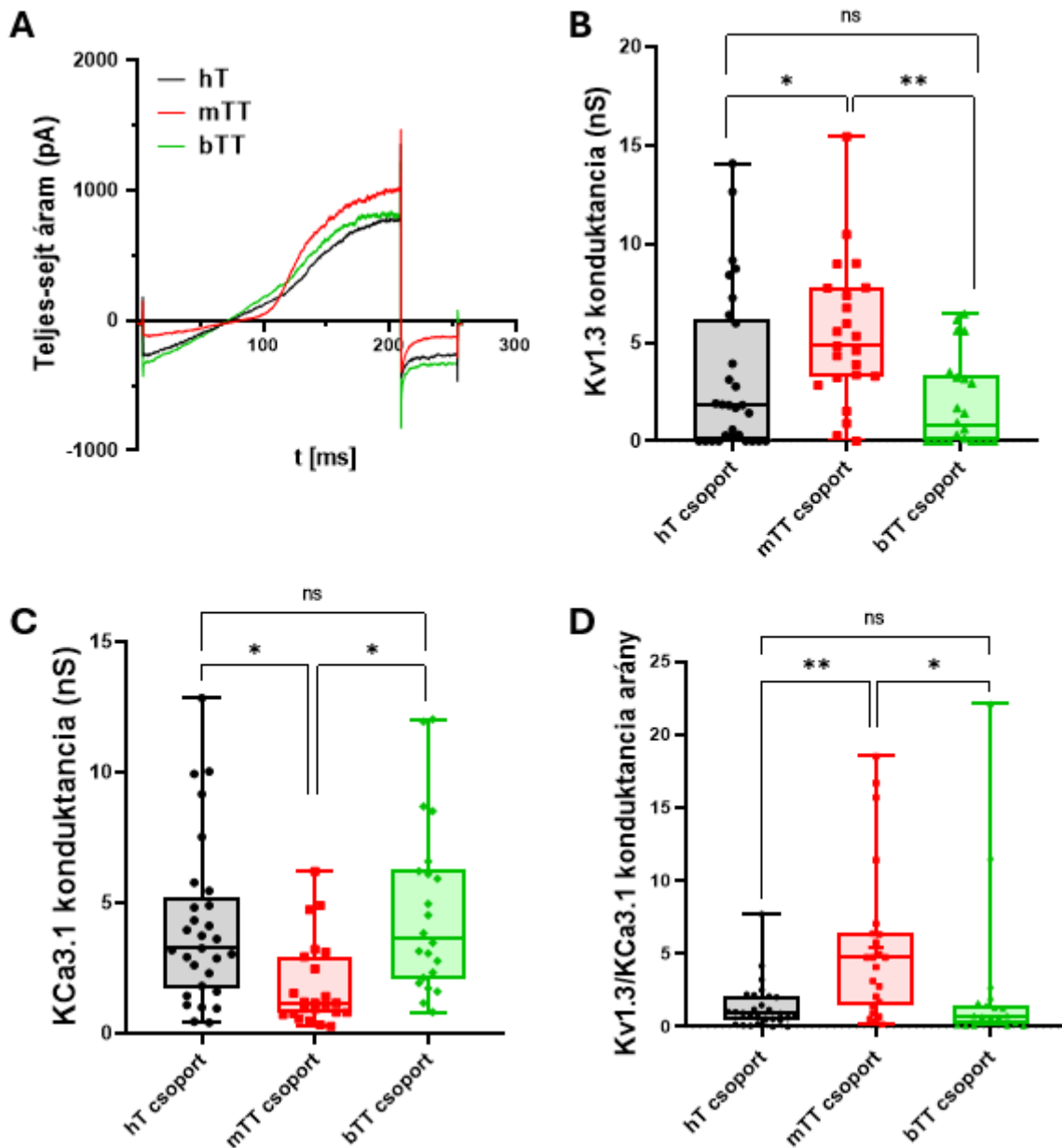
5.1.1 Malignus betegek véréből izolált CD8⁺ T-sejtek alacsony KCa3.1 és magas Kv1.3 konduktanciával rendelkeznek

A Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák fontos szerepet játszanak a T-limfociták Ca²⁺-válaszának szabályozásában a T-sejt receptor specifikus antigénnel történő érintkezése során [23, 105, 107-110]. Az ioncsatornák alapvető szerepet játszanak a T-sejtek effektor funkcióiban, és nélkülözhetetlenek az olyan folyamatokban, mint például a daganatok sejtjeinek eliminációja [37, 111, 112]. A mesterséges T-sejtes immunterápia kudarcot vallott a humán petefészekrák kezelésében: a T-sejtek képtelenek voltak a tumorba vándorolni, ami a betegek saját T-sejtjeinek ioncsatorna-expressziójában bekövetkezett változásnak is tulajdonítható [113].

Ezen okból kifolyólag a sejtek Ca²⁺-válaszát kialakító ioncsatornák aktivitását kívántuk vizsgálni. A Kv1.3 és a KCa3.1 csatornák funkcionális expressziós szintjét patch-clamp technikával határoztuk meg és a teljes-sejt konduktanciával jellemeztük az egészséges donorok és olyan betegek perifériás véréből izolált aktivált T-sejtjeiben, akiknél a petefészekben tumoros növekedést diagnosztizáltak (14. ábra A panel). A patológiai jelentések alapján (amelyeket a műtét után kaptunk meg) a daganatos betegekből származó CD8⁺ T-sejtjeiket két csoportba soroltuk: az egyik jóindulatú (bTT: benignus tumoros betegből származó T-sejt), a másik rosszindulatú (mTT: malignus tumoros beteg T-sejtje) daganat. Megfigyeltük, hogy a Kv1.3 szintje az mTT-k esetében szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges betegekből vagy a jóindulatú daganatos betegekből izolált CD8⁺ sejtekben (a teljes-sejt konduktancia értékei: $2,63 \pm 0,88$ nS egészséges T-sejtek (hT-k) (5 donor, N = 29), $5,33 \pm 0,76$ nS mTT (4 beteg, N = 23) és $2,46 \pm 0,6$ nS bTT (3 beteg, N = 22) esetében, p értékek: 0,035 a hT vs. mTT és 0,002 az mTT vs. bTT esetében) (14/B ábra). A KCa3.1 esetében az ellenkezője volt megfigyelhető: a konduktancia jóval alacsonyabb volt az mTT-kben, míg a hT-kben és a bTT-kben a KCa3.1 szintje azonos volt ($4,11 \pm 0,58$ nS a hT-ben, $1,82 \pm 0,34$ nS az mTT-ben, $4,7 \pm 0,7$ nS a bTT csoportban, a p értékek 0,012 voltak a hT vs. mTT és 0,003 az mTT vs. bTT esetében) (14/C ábra).

Továbbá azt találtuk, hogy a különböző minták sejtjeinek teljes-sejt kapacitásai statisztikailag nem különböztek egymástól (a teljes-sejt kapacitás értékek $6,5 \pm 0,43$ pF a hT-k, $5,4 \pm 0,41$ pF az mTT-k, $6,2 \pm 0,52$ pF a bTT-k esetében, a p érték 0,175 volt): ezek az adatok azt mutatják,

hogy a T-sejtek aktivációja teljes volt és valószínű, hogy az ioncsatornák expressziójának különbözősége a CD8 sejtek aktivációján kívül inkább más funkciókat is módosíthat.

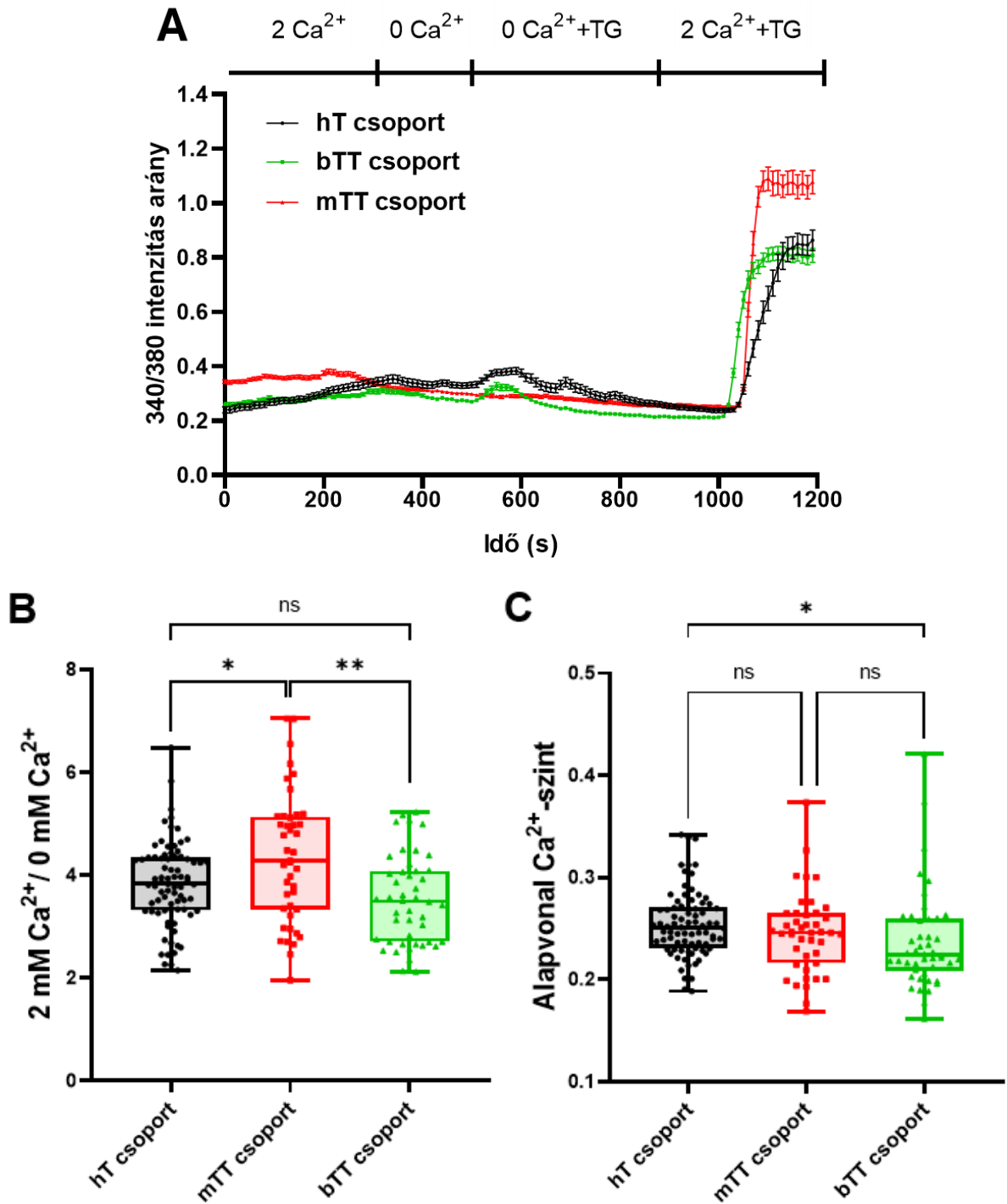


4. ábra: A *KCa3.1* és a *Kv1.3* különböző expressziós szintjei egészséges donorokból és tumoros betegekből származó $CD8^+$ T-sejtekben. (A) Egy hT-ben, egy mTT-ben és egy bTT-ben, feszültség-rámpa protokoll alkalmazása során (lásd Anyag és módszerek rész) rögzített teljes-sejt áramgörbék. (B,C) A *KCa3.1* (B) és a *Kv1.3* (C) csatornák teljes-sejt vezetőképességének box-plotja egészséges donorokban (hT-k), malignus (mTT-k) és benignus (bTT-k) tumoros betegeknél. (D) A *Kv1.3* és *KCa3.1* teljes-sejt vezetőképesség arány box-plotja egyedi sejtekben. Minden egyes grafikonon egy szimbólum egy egyedi sejtre meghatározott átlagértéket jelöl. Az adatok átlag \pm SEM-et ábrázolják; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; n.s.: nem szignifikáns.

A 14 ábra D panelje a Kv1.3 és a KCa3.1 konduktancia arányát ábrázolja, mely által láthatóvá vált, hogy az mTT-k KCa3.1_{low}Kv1.3_{high} fenotípust mutatnak, míg a hT-k és bTT-k jellemzően KCa3.1_{high} és Kv1.3_{low} fenotípusúak voltak (a p értékek 0,002 a hT-k és mTT-k között, 0,03 a bTT-k és mTT-k között).

5.1.2 Az mTT-k magasabb CRAC-függő Ca²⁺ választ mutatnak

Amint azt korábban leírtuk, ez a három csatorna - Kv1.3, KCa3.1 és CRAC - képes a Ca²⁺-szint változásainak szabályozására az antigénfüggő aktiváció korai lépései során vagy más effektor funkciókban. Ezért megvizsgáltuk az egészséges donorokból és tumoros betegekből származó CD8-sejtek általi SOCE mechanizmust. A FURA-2 Ca²⁺-imaging módszerrel a Ca²⁺-raktár ER-t Ca²⁺-mentes oldatban thapsigargin jelenlétében ürítettük ki, majd a TG-vel együtt Ca²⁺-t adtunk vissza extracellulárisan a sejtekhez (15/A ábra). Mivel a TG közvetlenül serkenti az Orai1-STIM1 összeszerelődését a CRAC kialakításához, nem tudja befolyásolni a CD3/TCR-en keresztül történő jelátviteli lépéseket; csak a SOCE-n keresztül történő Ca²⁺ beáramlással van összefüggésben és ezáltal tükrözi a CRAC csatornák expressziós szintjét. A hT-k, mTT-k és bTT-k Ca²⁺-válaszának reprezentatív méréseit a 15. ábra A panele mutatja: minden görbe egy donor esetében, egy kísérletben mért több sejt átlagát jelenti. Érdekes módon az alapvonal minden csoportban azonos volt, de a Ca²⁺ jel az extracelluláris oldatba történő Ca²⁺ visszaadás után a malignus tumoros betegekből izolált CD8⁺ sejteknél volt a legmagasabb. A sejtek Ca²⁺-válaszának számszerűsítéséhez a Ca²⁺ visszaadása előtti (alapvonal) és utáni (csúcs) arányát határoztuk meg. Amint az a 15/B. ábrán látható, a CD8⁺ sejtek CRAC-függő Ca²⁺ válasza sokkal magasabb volt az mTT csoportban, mint a hT és bTT csoportban. Az intracelluláris Ca²⁺ alapszintje azonban az összes csoportban hasonló volt (15/C ábra).

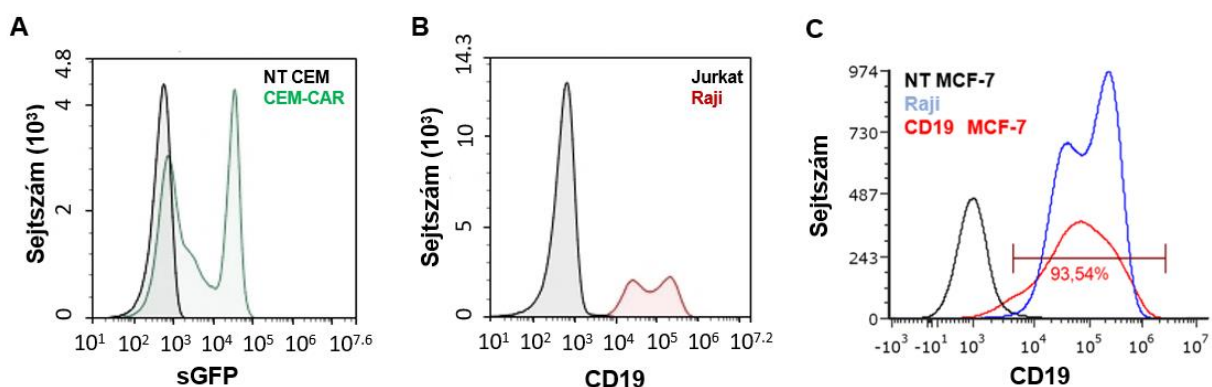


5. ábra: Az mTT-k thapsigargin által kiváltott Ca²⁺-válasza magasabb, mint a hT-ké és a bTT-ké. (A) A hT-k, mTT-k és bTT-k TG által kiváltott Ca²⁺ válasza. Az adatpontok a FURA-2 340 nm/380 nm-es intenzitásarányának átlagát jelölik számos sejt esetében (15 ≤ n). (B) A hT-k, mTT-k és bTT-k 2Ca²⁺/0Ca²⁺ intenzitásarányának box-plotja. (C) A hT, mTT és bTT csoportok Ca²⁺ intenzitás arány alapjelének (baseline) box-plotja. Minden pont egy-egy sejthez tartozó értéket jelöl. Az adatok átlag ± SEM-et ábrázolják; *: p < 0,05; **: p < 0,01; n.s.: nem szignifikáns.

5.2 CAR-T sejtek ioncsatornáinak (Kv1.3, KCa3.1) szerepe a tumor infiltráció és elimináció során

5.2.1 CEM-CAR T-sejtek előállítása és validálása

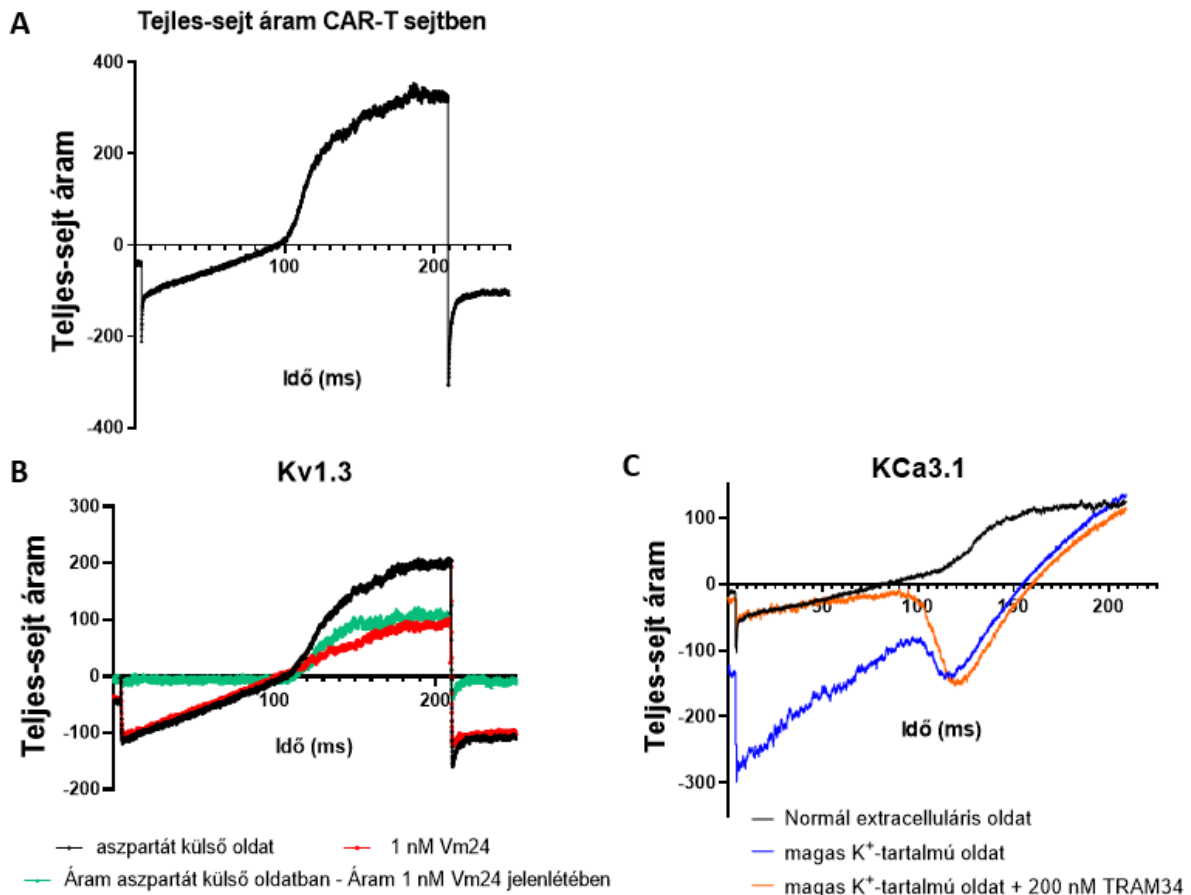
Először azt vizsgáltuk, hogy a CD19-specifikus CAR-ok képesek-e tumorsejtet specifikusan felismerni és eliminálni, ha azokat egy CD19⁺ sejtvonallal együtt tenyésztjük (2D assay). A 3. generációs sGFP-CD19-CAR konstruktot, amely a CD8 transzmembrán régiót, a CD28, a 4-1BB kostimulátor domént, a CD3 ζ intracelluláris szignáldomént és az sGFP-t (superfolder zöld fluoreszcens fehérje) kódolja, VSVG pszeudotípusú retrovírus részecskébe csomagoltuk, és CCRF-CEM T-sejt vonalakba transzdukáltuk, ezáltal CD19-specifikus CAR-T sejt vonalat generáltunk (CEM-CAR). A CEM-CAR csoportban a transzdukció hatékonysága több mint 60% volt (16/A. ábra), melyet a transzdukciót követő 3. napon, áramlási citometriával határoztunk meg. Kontrollként NT CEM sejteket használtunk. A magasabb CAR-pozitív sejtarány elérése érdekében leszortoltuk az sGFP⁺ sejteket (CAR-t expresszáló CEM sejtek), és később ezt a homogén sejt populációt használtuk különböző kísérletekhez (a szortolt populáció 98%-a volt sGFP pozitív). Ezután, hogy megfelelő célsejteket válasszunk ki a CAR-expresszáló sejtünk számára, a célsejteként szolgáló Raji sejtek CD19 pozitivitását Alexa Fluor-647-tel konjugált egér anti-humán CD19 direkt immunfluoreszcens jelöléssel igazoltuk. A Raji sejtek teljes populációja kifejezte a CD19 fehérjét (16/B ábra), negatív kontrollként CD19⁻ Jurkat sejteket alkalmaztunk. A hCD19 konstruktot MCF-7 emlődaganatos sejt vonalba transzdukáltuk, és a transzdukció hatékonysága több mint 93% volt (16/C. ábra), amit szintén Alexa Fluor-647-gyel konjugált egér anti-humán CD19 jelöléssel igazoltunk.



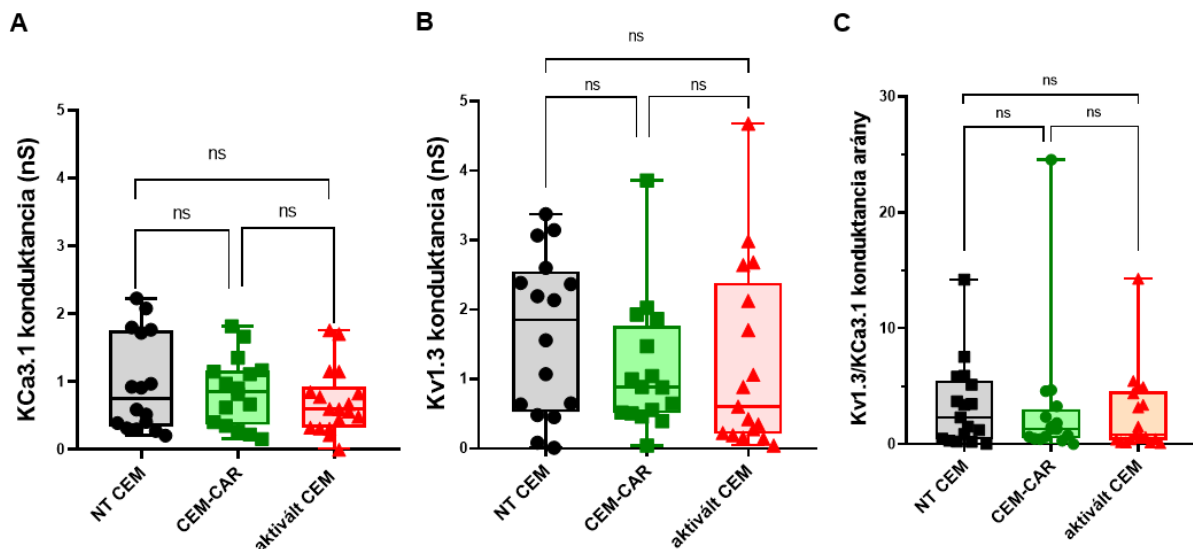
6. ábra: CAR és CD19 expressziójának áramlási citometriás hisztogramja. (A) Az sGFP fluoreszcens jel segítségével detektált CD19-specifikus CAR expresszió a CEM sejtekben (fekete: NT-CEM, zöld: CEM-CAR T). (B) Egér anti-humán CD19-Alexa647 antitesttel jelölt Raji (piros) és Jurkat (kontroll, fekete) sejtek. (C) CD19 MCF-7 (piros), NT MCF-7 (fekete, negatív kontroll) és Raji (kék, pozitív kontroll) sejtek egér anti-humán CD19-Alexa647 antitesttel jelölve.

5.2.2 A CEM-CAR sejtek Kv1.3, KCa3.1 és CRAC ioncsatornák expressziója

Amint azt korábban említettem, mind a KCa3.1, mind a Kv1.3 döntő szerepet játszik a T-sejtek különböző effektor funkcióiban. Ezért CEM-CAR sejtekben patch-clamp módszerrel határoztuk meg a K⁺ ioncsatornák aktivitását, amelyek a Ca²⁺-függő jelátvitelben kiemelt szerepet játszanak. Feszültség-rámpa protokollt alkalmaztunk (-120 mV és + 50 mV között) a kálium-áramok rögzítésére CEM-CAR/NT-CAR sejtekben (17/A ábra): az áram negatív feszültségeknél (-50 - -60 mV között) megfordult, és kb. -50 mV felett markáns kifelé irányuló áramot észleltünk. Továbbá farmakológiai vizsgálatokat végeztünk specifikus ioncsatornagátlószerekkel (Vm24: Kv1.3, TRAM34: KCa3.1) a csatornák azonosítására. Az 1 nM Vm24 alkalmazása teljesen blokkolta a kifelé irányuló áramot (17. ábra B panel, a zöld vonal jelzi a kontroll és a Vm24 kezelt áramgörbék különbségét), mely a Kv1.3 csatorna jelenlétére utal. A TRAM34 jelenlétében és nélkül, magas K⁺-tartalmú oldatban végzett teljes-sejt árammérések igazolták, hogy a CEM-CAR sejtek membránjában funkcionális KCa3.1 csatornák áramai vannak jelen (17/C ábra). A Kv1.3 és KCa3.1 konduktanciák összehasonlítása és azok aránya a CEM-CAR, NT CEM és aktivált CEM sejtek között nem mutatott szignifikáns különbségeket (18. ábra).



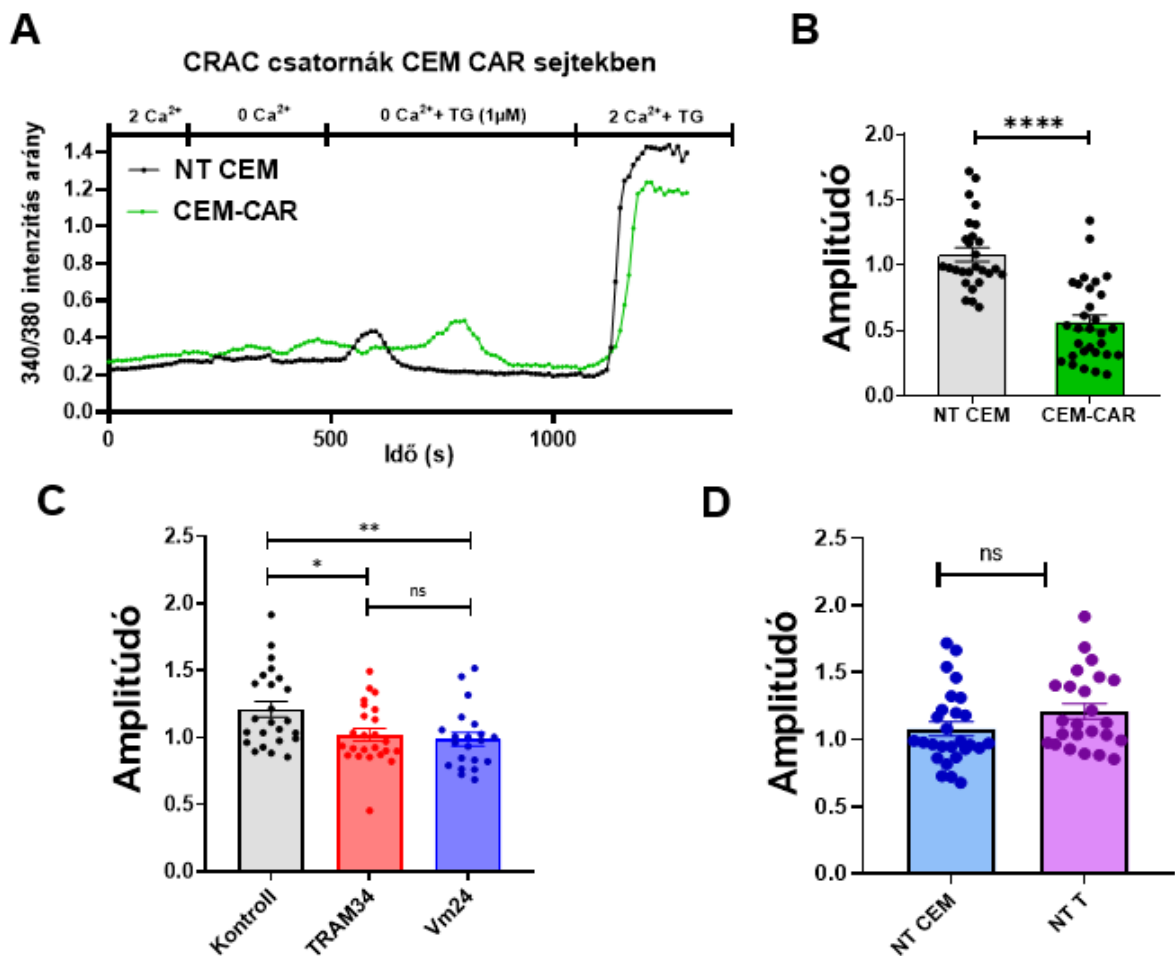
17. ábra: A Kv1.3 és KCa3.1 csatornák azonosítása CEM-CAR T-sejtekben. (A) CD19-CAR-t expresszáló CEM-sejtekben rögzített tejles-sejt áramgörbe, 200 ms hosszúságú, -120 mV-tól +50 mV-ig terjedő feszültség-rámpa protokollal a tartópotenciál -70 mV volt (lásd Anyagok és módszerek). (B) Az áramgörbét 1 nM Vm24 nélkül (fekete vonal) és jelenlétében (piros vonal) regisztráltuk aszpartátos külső oldatban az A panelben leírt rámpa protokollal. A zöld vonal a fekete és piros mérések különbségét, azaz a Kv1.3 tejles-sejt áramot mutatja. (C) Az áramgörbét normál extracelluláris oldatban (fekete vonal), majd magas K⁺-tartalmú oldatban (kék vonal) és végül 200 nM TRAM34-ot tartalmazó magas K⁺-tartalmú oldatban oldott (narancssárga vonal) rögzítettük. Ugyanazt a feszültség-rámpa protokollt alkalmaztuk, mint az A-ban és B-ben.



18. ábra: A *Kv1.3* és a *KCa3.1* konduktancia azonos *CEM* és a *CEM-CAR* sejtekben. A *KCa3.1* (A) és a *Kv1.3* (B) csatornák teljes-sejt konduktanciájának box-plotja NT *CEM* ($n=16$), aktivált *CEM* ($n=17$) és *CEM-CAR* ($n=16$) sejtekben. (C) A *Kv1.3* és *KCa3.1* vezetőképesség arányának box-plotja az egyes sejtekben. Minden ábrán egy szimbólum az egyes sejtekre meghatározott átlagértéket jelöli. Minden egyes sejt esetében a konduktanciát három egymást követő mérés átlagaként számoltuk ki. n.s.: nem szignifikáns.

5.2.3 Csökkent Ca^{2+} -válasz a *CEM-CAR* sejtek esetén

A CRAC aktiváció számos, a T-sejtek effektor funkciójával kapcsolatos útvonalban játszik szerepet, ezért a *CEM-CAR* és a kontroll NT *CEM* sejtek thapsigargin által indukált Ca^{2+} -választ vizsgáltuk FURA-2 Ca^{2+} -imaging módszerrel. Egy *CEM-CAR* és egy NT *CEM* sejt TG által indukált reprezentatív Ca^{2+} választ a 19/A ábra mutatja. A 19/B ábrán látható grafikon jól reprezentálja, hogy a *CEM-CAR* sejtek szignifikánsan alacsonyabb CRAC-specifikus választ mutattak az NT *CEM* sejtekhez képest ($p < 0,0001$, $n = 27$ az NT *CEM* és 30 a *CEM-CAR* sejtek esetében). Ezek arra utalnak, hogy a CAR jelenléte befolyásolja a Ca^{2+} beáramlást a CRAC csatornán keresztül, ami hatással lehet az effektor funkcióra, ahogyan arról korábban már beszámoltunk [58]. Továbbá a TRAM34 ($p = 0,019$, $n = 24$) és Vm24 ($p = 0,007$, $n = 21$) alkalmazása szignifikánsan csökkentette a CRAC-specifikus választ az NT T-sejtekben ($n = 24$) (19/C. ábra). Az NT *CEM* és az NT T-sejtek TG által kiváltott Ca^{2+} -válasza nem mutat különbséget (19/D ábra).

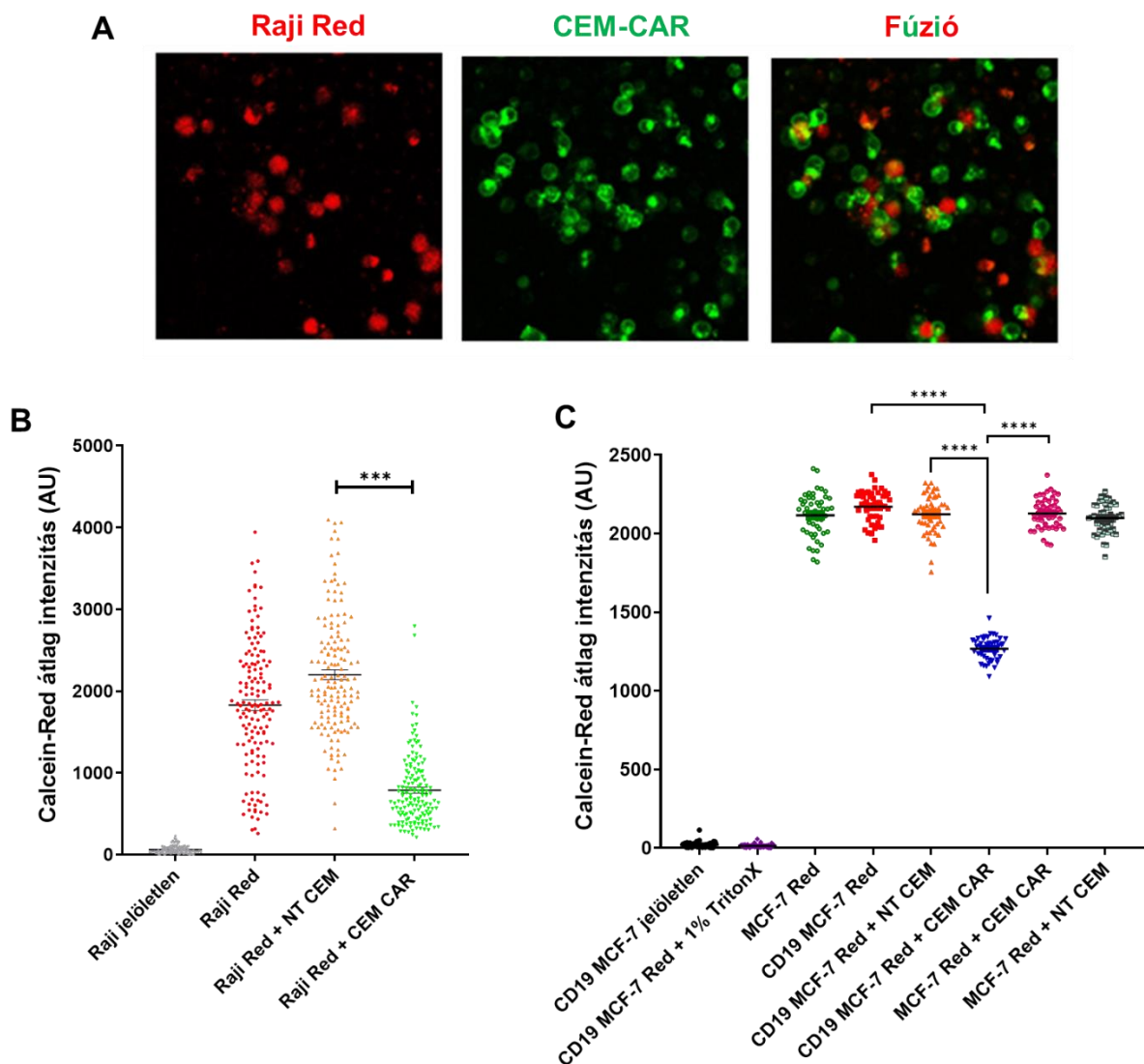


19. ábra: A CEM-CAR sejtek csökkent thapsigargin által kiváltott Ca^{2+} választ mutatnak. (A) Az egyes görbék a CEM-CAR (zöld) sejt és NT CEM sejt (fekete) TG által kiváltott Ca^{2+} -válaszát ábrázolják. Az adatpontok a FURA-2 340 nm/380 nm-es intenzitásarányát jelölik. (B) A TG által kiváltott Ca^{2+} amplitúdók box-plotja NT CEM és CEM-CAR sejtekben. (C) A TG által kiváltott Ca^{2+} amplitúdók boxplotja aktivált T-sejtekben TRAM34 (1 μ M) és Vm24 (1 nM) jelenlétében. (D) Ca^{2+} amplitúdók NT CEM és NT T-sejtekben. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$; n.s.: nem szignifikáns.

5.2.4 A CEM-CAR sejtek felismerik és eliminálják a CD19⁺ Raji és MCF-7 célsejteket

A célsejteliminációs képesség megismerésére Calcein Red AM-alapú ölési tesztet végeztünk, amelyben a Raji (CD19⁺), MCF-7 (CD19⁻) és CD19⁺ MCF-7 sejteket Calcein Red AM életképességi festékkel töltöttük meg, és CEM-CAR T-sejtekkel inkubáltuk 2:1 effektor-célsejt arányban 3 órán keresztül. Kontrollként töltetlen Raji, MCF-7 és CD19 MCF-7 sejteket, és NT CEM-sejtekkel együtt inkubált, Calcein Red-dal töltött Raji, MCF-7 és CD19 MCF-7 sejteket alkalmaztunk. Pozitív kontrollként a Calcein Red-dal töltött sejteket CD19 MCF-7 1%-os TritonX-szel inkubáltuk. Az inkubációt követően konfokális mikroszkóppal rögzítettük a

fluoreszcens felvételeket sejtekről (20/A. ábra). A CEM-CAR sejtek tumorsejt-ölő hatékonyságát a Calcein Red pozitív (Raji, MCF-7, CD19 MCF-7) sejtek átlagos fluoreszcencia-intenzitásával jellemeztük: az elemzés azt mutatta, hogy a Raji (20/B ábra, $p < 0,001$) és CD19 MCF-7 (20/C ábra, $p < 0,0001$, $n=50$) sejtek szignifikánsan alacsonyabb fluoreszcencia-intenzitással rendelkeztek, amikor CEM-CAR sejtekkel együtt inkubáltuk őket. Ez egyértelműen azt mutatja, hogy a CEM-CAR sejtek képesek felismerni a Raji és a CD19 MCF-7 sejtek CD19 célantigénjét, és monolayer-kokultúrában tumorelles választ indukálni.



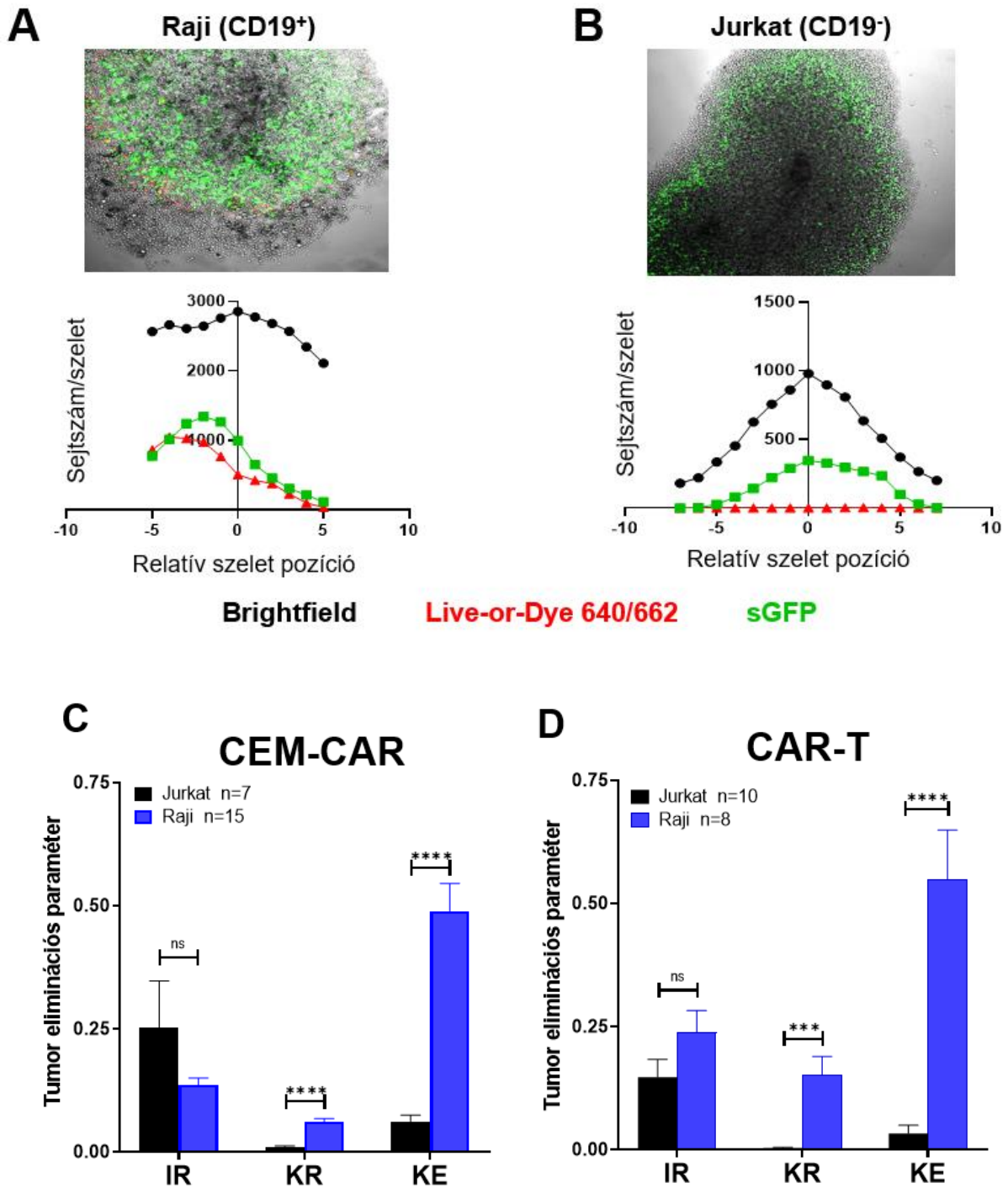
20. ábra: A CEM-CAR sejtek eliminálják a Raji és a CD19⁺ MCF-7 célsejteket. (A) Konfokális felvételek Calcein Red-AM-mel (piros, Raji Red) töltött Raji (CD19⁺) sejtekről és CEM-CAR T-sejtekről (zöld: sGFP-CD19-CAR, CEM-CAR T), amelyeket 3 órán keresztül koinkubáltunk. (B) A Calcein Red átlagos fluoreszcencia-intenzitása Raji sejtekben 3 órás inkubáció után (Raji jelöletlen: nincs Calcein Red-AM, Raji Red: csak Raji sejtek, Raji Red + NT CEM: Raji Red és NT CEM sejtek koinkubálása, Raji Red + CEM-CAR: Raji Red és CEM-CAR T sejtek koinkubálása). (C) A Calcein Red átlagos fluoreszcencia-intenzitása MCF-7 és CD19 MCF-7

sejtekben (CD19 MCF-7 jelöletlen: nincs Calcein Red-AM, CD19 MCF-7 Red + 1% TritonX: CD19-MCF7 sejtek Calcein Red-AM-mel töltve, 1% TritonX-szel inkubálva, MCF-7 Red: csak MCF-7 sejtek, CD19 MCF-7 Red: csak CD19 MCF-7 sejtek, CD19 MCF-7 Red + CEM NT: CD19 MCF-7 Red és CEM NT ko-inkubációja, CD19 MCF-7 Red + CEM CAR: CD19 MCF-7 Red és CEM CAR ko-inkubációja, MCF-7 Red + CEM CAR: MCF-7 Red és CEM CAR sejtek ko-inkubációja, MCF-7 Red + CEM NT: MCF-7 Red és CEM NT sejtek ko-inkubációja. Egy szimbólum az egy sejtre meghatározott Calcein Red átlagos intenzitását jelöli. Vízszintes vonalak: átlag \pm SEM; $N \geq 100$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$

5.2.5 A CEM-CAR és a CAR-T sejtek a CD19⁺ Raji szferoidokba vándorolnak és eliminálják a CD19⁺ Raji szferoid sejtjeit.

A 2D kultúrában végzett sikeres validálás arra ösztönzött minket, hogy a CAR-expresszálo sejtek *in vitro* tumor szferoidokba, mint *in vitro* tumormodellbe való infiltrációját és a tumor sejtek CAR-sejtek általi elpusztítási hatékonyságát megvizsgáljuk. Ezért CD19⁺ és CD19⁻ szferoidokat (negatív kontroll) tenyésztettünk Raji, illetve Jurkat sejtekből, és CEM-CAR/CAR-T sejtekkel kezeltük. A szferoidokat átlagosan 3-5 napig növesztettük (a kezdeti sejtek száma $5-10 \times 10^3$ volt), és 400-800 μm közötti méretűre növekedtek, a tumorokra jellemző, jól látható nekrotikus maggal (fekete foltok vagy pontok a képeken, 21. ábra A és B). Az eljárás standardizálása érdekében 1×10^4 CEM-CAR vagy CAR-T sejtet pipettáztunk az egyetlen szferoidot tartalmazó sejtenyésztő well-be, melyet 24 órás inkubáció követett. A Raji (CD19⁺, 21/A ábra, fent) és Jurkat (CD19⁻, 21/B ábra, fent) sejtekből származó, CEM-CAR sejtek által infiltrált tumorszferoidok középső z-stack konfokális mikroszkópos képei azt mutatják, hogy a CAR-expresszálo sejtek (zöld, sGFP jel) a perifériás és pericentrális régióba vándoroltak. A 21. ábra A és B hisztogramjai (mindkét ábra alján) a Raji- és Jurkat-szferoidok egy-egy szeletében lévő sejtek számát mutatják, ahol az origót (0. pozíció) arra a konfokális metszetre állítottuk be, ahol a legtöbb sejtet (TC legmagasabb) detektáltuk. Minden konfokális szeletben meghatároztuk a teljes sejtsszámot (TC), az sGFP⁺ sejtek számát (CC, CAR-expresszálo) és a Live-or-Dye 640/662 festéket tartalmazó elpusztult sejtek számát (DC). A CEM-CAR és a CAR-T sejtek elpusztítási hatékonyságának kiértékeléséhez kiszámítottuk a tumoreliminációs paramétereket (IR: infiltrációs ráta, KR: ölési ráta és KE: ölési hatékonyság, lásd az Anyagok és módszerek részt). A mérések 2 (CAR-T) vagy 3 (CEM-CAR) különböző napon történtek. A CEM-CAR sejtek azonos mértékben infiltrálták a CD19⁻ (7 szferoid) és CD19⁺ (15 szferoid) szferoidokat, így az IR nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget ($p=0,57$). Az ölési arány ($p<0,0001$) és az ölési hatékonyság ($p<0,0001$) azonban csak a CD19⁺ szferoidokban volt mérhető (21/C ábra), ami a CEM-CAR sejtek specifikus célsejt-felismerésére és eliminációjára utal. Ennek a CEM-CAR T-sejt modellnek a sikeres

alkalmazása arra ösztönzött bennünket, hogy humán, primer T-sejtekből CAR-T sejteket hozzunk létre, és teszteljük a tumorölő képességüket. A CAR-T sejtek esetében hasonló eredményt tapasztaltunk: a CAR-T sejtek tumorinfiltráló képessége a szferoidokba a CD19 marker jelenlététől függetlenül azonos volt, így a két szferoid típus (Raji (8 szferoid) vs. Jurkat (10 szferoid)) között az IR nem volt statisztikailag szignifikáns (21/D ábra). A KR ($p=0,002$) és a KE ($p<0,0001$) is elhanyagolható (gyakorlatilag nulla) volt a Jurkat szferoidok esetében, ellentétben a Raji szferoidokkal. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a CAR-T sejtek a CD19⁺ célsejteket is specifikusan felismerték és eliminálták.



21. ábra: A CEM-CAR T- és CAR-T-sejtek eliminálják a tumor szferoidok sejtjeit. Konfokális felvételek a (A) Raji (CD19⁺) és (B) Jurkat (CD19⁻) tumor szferoidokba infiltrált CEM-CAR sejtekről (felső sor). A képek a z-stack képsorozat középső szeletét mutatják. A hisztogramok az összes (fekete), a halott (Live-or-Dye 640/662 pozitív sejtek, piros) és a CEM-CAR (sGFP-CD19-CAR expresszáló, zöld) sejtek számát mutatják egy szeletben a relatív szelet pozíciójának függvényében (0. pozíció: középső szelet, alsó sor). (C) A CEM-CAR sejtek tumoreliminációját jellemző infiltrációs ráta (IR), az ölési ráta (KR) és az ölési hatékonyság (KE) 24 óra elteltével, 15 Raji (kék) és 7 Jurkat (fekete) szferoid esetében. (D) A CAR-T sejtek tumoreliminációs paraméterei (IR, KR és KE) ábrázolva (inkubáció: 24 óra) 8 Raji (kék) és 10 Jurkat (fekete)

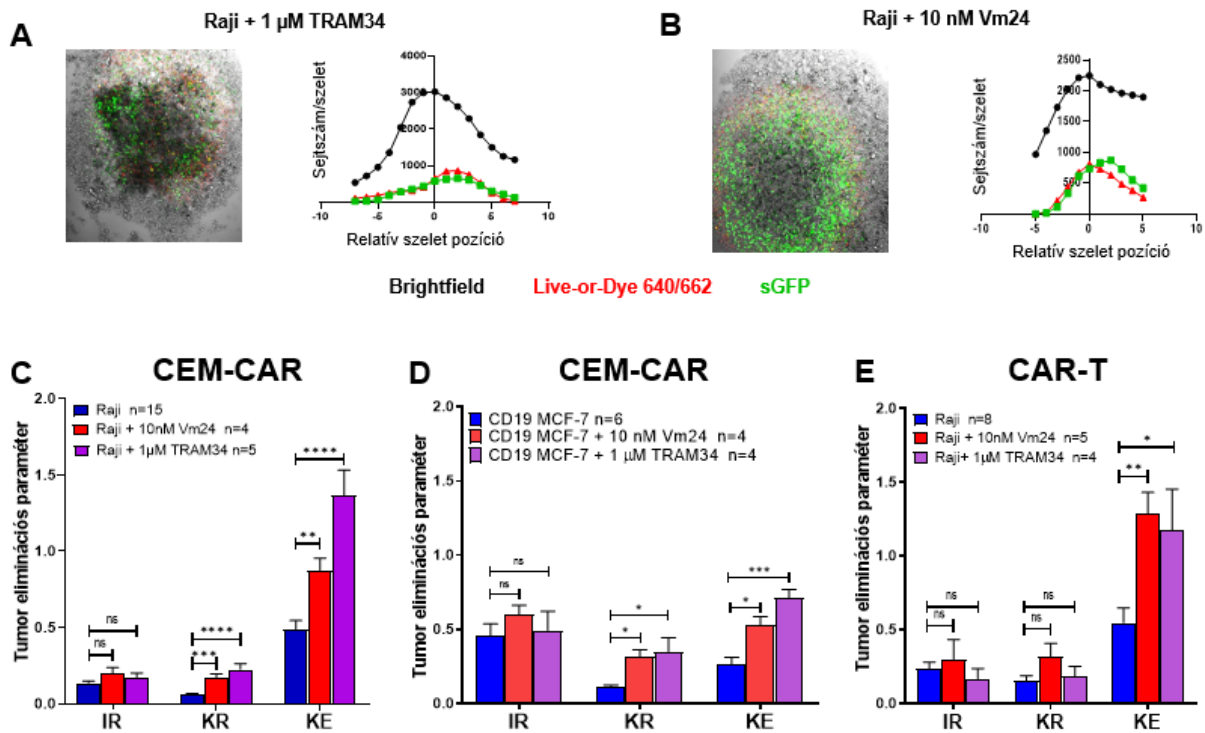
*szferoid esetében. Az adatokat átlag ± SEM-mel ábrázoltuk; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; n.s.: nem szignifikáns.*

5.2.6 A Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák gátlása serkenti a CD19 specifikus CEM-CAR és CAR-T sejtek ölési hatékonyságát.

Amint azt korábban részleteztük, a T-limfociták K^+ ioncsatornái fontos szerepet játszhatnak a CAR-T sejtek által végzett tumoreliminációban, amelyek a Ca^{2+} jelátvitel modulációján keresztül vesznek részt az effektor funkciókban. Kimutattuk, hogy a CEM-CAR és a CAR-T sejtek képesek voltak beszivárogni a tumor szferoidokba és tumorelles hatást kifejteni. Ezt követően a CD19-specifikus CEM-CAR és CAR-T sejtek tumorölő aktivitásának ioncsatorna-függését vizsgáltuk: Vm24-et, a Kv1.3 specifikus blokkolóját és TRAM-34-et, a KCa3.1 szelektív antagonistáját használtuk. A 24 órás szferoid-alapú tumor ölési vizsgálat során 10 nM Vm24-et használtunk (ellentétben a patch-clamp kísérletekkel, ahol 1 nM volt), melynek kettős oka volt: 1.) Vm24 peptid lehetséges degradációja, 2.) mérete (kb. 4 kD) miatt a diffúziója meglehetősen korlátozott lehet a tumor szferoidokba(n). Ezért a K_d érték 1000-szeresét, míg a TRAM34 esetében 50-szörös K_d értéket használtunk, mivel ez a kis molekula stabilabb, mint a peptidil eredetűek [114, 115]. In vivo alkalmazva egyik inhibitornak sem volt káros hatása [114, 116].

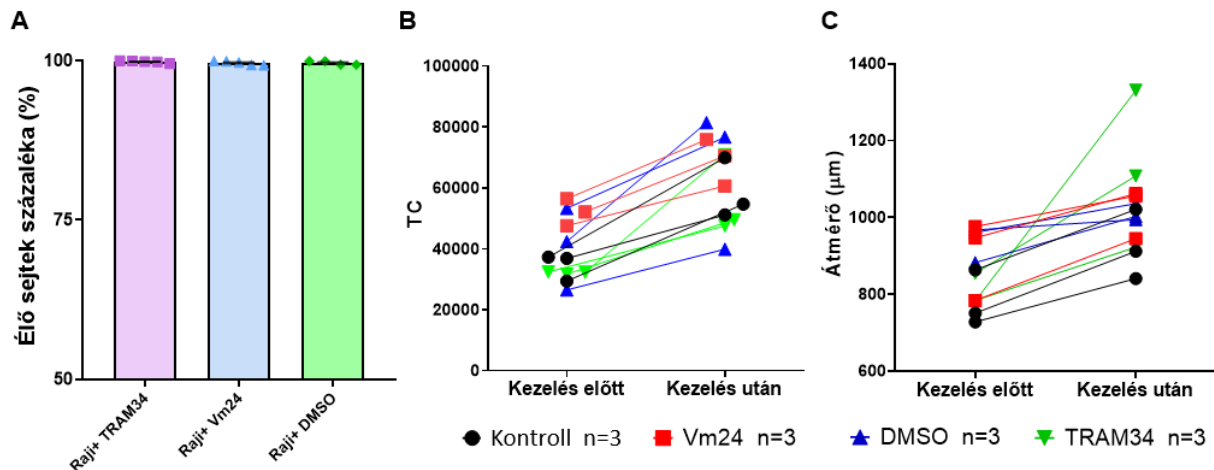
A Raji tumor szferoidok középső z-szeletének konfokális mikroszkópos felvételei azt mutatják, hogy a CEM-CAR sejtek mindkét inhibitor jelenlétében képesek voltak „behatolni” a tumorsejt szferoidba (22. ábra A és B, bal oldal). A 22. A ábra (jobb) és a B. ábra (jobb) hisztogramjai világosan mutatják, hogy az infiltráló sejtek száma TRAM34 (1 μ M) vagy Vm24 (10 nM) jelenlétében korrelál az elhalt sejtek számával (Live-or-Dye 640/662 pozitív sejtek). A korábbiakhoz hasonlóan minden szferoid esetében meghatároztuk az IR, KR és KE értékeket, és azt kaptuk, hogy a Vm24 (4 szferoid) vagy a TRAM34 (5 szferoid) hozzáadása nem változtatta meg a CEM-CAR CD19⁺ Raji szferoidokba történő tumorinfiltráló képességét (22/C ábra) a kezeltlen szferoidokhoz képest (kontroll, 15 szferoid). A tumor modell Vm24-gyel vagy TRAM34-gyel történő inkubálása azonban szignifikánsan növelte a CEM-CAR sejtek KR ($p=0,0004$, Vm24, 4 szferoid; $p<0,0001$, TRAM34, 5 szferoid) és KE ($p=0,009$, Vm24 és $p<0,0001$, TRAM34) értékét. Az 22/D ábra a tumor eliminációjának paramétereit (IR, KR, KE) mutatja CD19 MCF-7 szferoidok esetében, mely esetében az IR nem változott jelentősen, de a Vm24 és a TRAM34 hozzáadása jelentősen megnövelte a KR-t (Vm24: $p= 0,0322$, 4 szferoid; TRAM34: $p=0,0126$, 4 szferoid) és KE paramétert (Vm24: $p= 0,0112$; TRAM34: $p=0,0002$) a CEM-CAR sejtek jelenlétében a kezeltlen kontroll szferoidokhoz (6 szferoid) képest. Bár az

IR és KR paraméterek nem változtak jelentősen, mind a Vm24 ($p=0,007$), mind a TRAM34 ($p=0,028$) alkalmazása javította a CAR-T sejtek ölési hatékonyságát (KE paraméter) az *in vitro* CD19⁺ Raji tumor szferoidokkal szemben (22/E ábra).



22. ábra: A K^+ csatorna gátlás fokozza a tumor szferoidok eliminációját. Konfokális felvételek a CEM-CAR sejtek Raji (CD19⁺) tumorszferoidokba való infiltrációjáról 1 μM TRAM34 (A) és 10 nM Vm24 (B) jelenlétében (felső sor). A képek a z-stack sorozatképek középső szeletét ábrázolják. A histogramok az összes (fekete), az elpusztult (Live-or-Dye 640/662 pozitív sejtek, piros) és a CEM-CAR (sGFP-CD19-CAR expresszáló, zöld) sejtek számát mutatják egy szeletben a relatív szelet pozíciójának függvényében (0 pozíció: középső szelet, alsó sor). (C) A CEM-CAR sejtek tumoreliminációja TRAM34 (1 μM , KCa3.1 blokkoló) vagy Vm24 (10 nM, Kv1.3 gátlószerrel) IR, KR és KE paraméterekkel ábrázolva 24 óra elteltével: 15 Raji (kék) és 4 Raji 10 nM Vm24 jelenlétében (piros, Raji + 10 nM Vm24), 3 Raji DMSO-val (zöld, Raji + DMSO) és 5 Raji 1 μM TRAM34-gyel (lila, Raji + 1 μM TRAM34) szferoid esetében. (D) A CEM-CAR sejtek tumoreliminációjának paraméterei (IR, KR és KE) Vm24 és TRAM34 jelenlétében, CD19 MCF-7 szferoidok esetében: 6 CD19 MCF-7 (kék), 4 CD19 MCF-7 10 nM Vm24-gyel (piros, CD19 MCF-7 + 10 nM Vm24) és 4 CD19 MCF-7 1 μM TRAM34-gyel együtt inkubálva (lila, CD19 MCF-7 + 1 μM TRAM34). (E) A TRAM34-gyel és Vm24-gyel inkubált CAR-T sejtek tumoreliminációs paraméterei (IR, KR és KE) láthatóak (inkubáció: 24 óra) 8 Raji (kék, Raji) és 5 Raji 10 nM Vm24-gyel (piros, Raji + 10 nM Vm24) inkubált, valamint 4 Raji 1 μM TRAM34-gyel (lila, Raji + 1 μM TRAM34) inkubált szferoid esetében. Az adatok átlag \pm SEM-et ábrázolják; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$; n.s.: nem szignifikáns.

Ezen felül kimutattuk, hogy Raji sejtek életképessége nem változott az az inhibitorok (Vm24, TRAM34) vagy csak DMSO (0,1%) jelenlétében: az elpusztult sejtek aránya nem haladta meg az 1%-ot a vizsgált szferoidokban (23/A ábra). A Vm24 (3 szferoid), a TRAM34 (3 szferoid) és a DMSO (3 szferoid) jelenléte szintén nem volt hatással az összsejtszámra (TC) (23/B ábra) és a szferoidok növekedésére (23/C ábra), azaz nem volt hatással a proliferációra a kezeletlen kontrollhoz (3 szferoid) képest.



23. ábra: A TRAM34, a Vm24 és a DMSO Raji sejtekre gyakorolt citotoxikus hatásának vizsgálata. Az oszlopdiaagram az élő sejtek százalékos arányát mutatja az összes sejt számához viszonyítva minden egyes mintában, a Live-or-Dye 640/662 festéssel vizsgálva, 24 órás DMSO-val (Raji + 0,1 % DMSO, mint a TRAM34 esetében), 1 μ M TRAM34-gyel (Raji + TRAM34) és 10 nM Vm24-gyel (Raji + 10 nM Vm24) történő inkubációt követően. Ezek a mérések kontrollként szolgáltak a 23C ábrán látható kísérletekhez. Az adatpontok legalább 3 szferoidra vonatkozó átlag \pm SEM értékek. A straggered-plot ábrák a Raji szferoidok teljes sejtszámát (TC) (B) és átmérőjét (C) mutatják a 10 nM Vm24, 1 μ M TRAM34 és 0,1% DMSO 24 órás kezelése előtt és után.

Ezen felül megvizsgáltuk az sGFP⁺ (CEM-CAR-ok) és a Live-or-Dye 640/662 (halott sejtek) kolokalizációját CD19⁺ Raji szferoidokban TRAM34 és Vm24 jelenlétében a vegyületek off-target hatásának vizsgálata céljából. A kolokalizációra számított Pearson korrelációs együttható $0,12 \pm 0,038$ volt a TRAM34 esetében és $0,097 \pm 0,004$ a Vm24 esetében. Ez egyértelműen azt mutatja, hogy a megnövekedett KE nem a CAR sejtek elhalásának köszönhető az antagonistáhozadásakor.

6. DISZKUSSZIÓ

6.1 A Kv1.3 csatorna magas aktivitásához rossz prognózis társul ovárium tumor esetén

A CD8⁺ T és az NK (természetes ölő) sejtek tumorinfiltrációja szükségszerű a tumorsejtek eliminációjához. Korábban kimutatták, hogy a fej-nyaki tumoros (HNC) betegek véréből izolált CD8⁺ sejtekben alacsonyabb a KCa3.1 csatorna aktivitása: ez a csökkent kalmodulin expresszióknak vagy az adenzin A_{2A} receptoron (A_{2A}R) keresztül történő gátlásának tulajdonítható [107, 108, 117, 118]. Kísérleteink segítségével mi is kimutattuk, hogy a KCa3.1 teljes-sejt vezetőképesség alacsonyabb azokban a CD8⁺ T-sejtekben, amelyek rosszindulatú (malignus) petefészekdaganatos donoroktól származnak, azonban benignus donorok esetén nem. A KCa3.1 ioncsatornák szerepet játszanak a kemokin által indukált kemotaxisban, valamint a T-sejtek „random-walk” mozgásában, melyeket egyaránt képes az adenzin gátolni az A_{2A}R-PKA útvonalon keresztül, még hozzá a KCa3.1 aktivitásának csökkentésével. A tumor által termelt adenzin magas szérumbelbeli koncentrációja gátolhatja a CD8 sejtek KCa3.1 csatornáit, mivel az adenzin felezési ideje nagyon rövid, legfeljebb néhány másodperc, így ez magyarázat teljességgel kizárható. Az OC betegekből izolált PBMC-vel kapott eredmények egyértelműen azt bizonyítják, hogy a CD8⁺ sejtek működésének gátlása nem csak a tumor közelében, illetve a tumorban történik meg: a KCa3.1 csatornák működése a tumortól távolabb is leszabályozódik, ezzel támogatja a tumor a saját túlélését. A CD8⁺ sejtek KCa3.1 downregulációja a tumor számára előnyös lehet, ugyanis alacsony KCa3.1 aktivitás esetén a CD8⁺ T-sejtek migrációs képessége meglehetősen lecsökken. Ez magyarázhatja, hogy a citotoxikus T-sejtek miért nem képesek beszivárogni a tumorba: bár a kemokin gradiens révén felfedezik a tumor helyét, nem képesek a szómához vándorolni, hogy a tumor „magját” eltávolítsák [107].

A CD8⁺ sejtek immunválasza részben a Ca²⁺-válaszon alapul, amelyet a Kv1.3 és KCa3.1 csatornák szabályoznak. Korábban több kutatócsoport is kimutatta, hogy az intra- és extracelluláris Ca²⁺ koncentráció határozottan befolyásolja a CD8⁺ sejtek célsejt-ölő hatékonyságát: a citoszolikus Ca²⁺ szint mérsékelt emelkedése szükséges [54, 55, 82, 119]. Itt azt kaptuk, hogy a malignus tumoros betegek sejtjeinek CRAC-hoz köthető Ca²⁺-válasza sokkal magasabb az egészséges donorok és benignus tumoros betegek sejtjeihez képest. Feltételezzük, hogy a mTT sejtek magasabb Ca²⁺ válasza és ennek következtében a fokozott CRAC-expresszió gyengítheti a tumorsejt-ölő képességüket.

Úgy véljük, hogy eredményeink hozzájárulhatnak a CD8⁺ T-sejtek működésének és ioncsatornáik tumoros betegségekben betöltött szerepének megértéséhez, és ezek az adatok egyértelműen figyelemre méltó kapcsolatot mutatnak a daganat rosszindulatúsága és a Kv1.3 és KCa3.1 konduktancia aránya között. Továbbá adataink (az immunfluoreszcens technikákkal ellentétben) funkcionális információt szolgáltatnak a T-sejtekben lévő ioncsatornákról egyedi sejt szinten, ami kívánatosabb lehet a T-sejt-technológiára támaszkodó újszerű immunterápiák tervezésénél.

6.2 A CAR-T sejtek Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornáinak gátlása növeli a tumorölés hatékonyságát

A CAR T-sejt-alapú terápiás módszerek alkalmazása, fejlesztése és optimalizálása az utóbbi években egyre népszerűbbé vált. A figyelemre méltó klinikai eredmények ellenére a kezelésben részesülő betegek még mindig az életet veszélyeztető toxikus mellékhatásoknak vannak kitéve [86]. Továbbá a szolid tumorok mikrokörnyezete, az extracelluláris mátrix gátolhatja a kis molekulák tumorsejteken/ben lévő célpontokhoz kötődését, például a terápiás antitestek esetében. A CAR T-sejt-alapú kezelések alacsony hatékonyságúak a szolid tumorok ellen, ami annak tulajdonítható, hogy a tumorok szuppresszív tulajdonságai megakadályozzák e sejtek infiltrációját és effektor funkcióját [85, 93, 120, 121]. A T-sejtek ioncsatornáik, mint például a Kv1.3, KCa3.1 és CRAC csatornák, számos T-sejt funkció szabályozásában vesznek részt, mint például a migráció és a tumorölés, amelyek esszenciálisak a daganat felszámolásában. Ezen ioncsatornák gátlása megváltoztatja a T-sejtek proliferációját és effektor funkcióit, ezért "finomhangolóként" szolgálhatnak [56, 68, 69]. Keveset tudunk azonban arról, hogy ezek az ioncsatornák milyen szerepet játszanak a CAR-T sejtek daganatellenes válaszában, és így a tumorsejtek felismerésében, a tumor infiltrációjában és a daganatsejt eliminálásában.

Először is elektrofiziológiai és farmakológiai módszerekkel megvizsgáltuk, hogy a CD19-specifikus (3. generációs) CEM-CAR sejteink expresszálják-e a Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornákat. Eredményeink azt mutatták, hogy a CAR-T sejtek mind a Kv1.3, mind a KCa3.1 ioncsatornákat expresszálják, és a teljes-sejt konduktancia, illetve csatornaszám (700 vs. 550 KCa3.1, 500 vs. 350 Kv1.3 CEM illetve T-sejtben) mindkettő esetében hasonló volt a primer aktivált T-sejtekben leírtakhoz [77, 78, 112]. A T-sejtek tipikus modellrendszerének tekintett Jurkat sejtek nem tekinthetők a T-sejt modelljének: a KCa3.1 helyett egy másik Ca²⁺-függő K⁺-csatornát, nevezetesen a KCa2.2-t expresszálják [78]. Bár e két csatorna biofizikai tulajdonságai hasonlóak (fél-aktivációs Ca²⁺-koncentráció, konduktancia), valószínűleg a csatorna intracelluláris terminálisaihoz kötődő membránlokalizációt szabályozó vagy

szignálfehérjék teljesen eltérőek lehetnek. Következésképpen a CCRF CEM sejtek alkalmasabbak voltak a CAR-expresszálo T-sejtek viselkedésének modellezésére a további kísérletek során, azonban a T-sejteket is bevontuk a vizsgálatainkba.

Eredményeink az mutatták, hogy a Ca^{2+} beáramlás csökkent a CEM-CAR sejtekben a kontroll NT CEM sejtekhez képest, és hasonlót figyelhettünk meg a CAR-T és NT T-sejtek esetében is [58] (19. ábra). Amint azt korábban említettük, a CTL-ekben a csökkent Orai1 expresszió elősegíti a célsejtek eliminációját [82]. Az Orai1 csatornák gátlása azonban nem lehetséges a nagy affinitású és szelektív inhibitorok hiánya miatt, ezért nem tudtuk megvizsgálni a szerepét CAR-t expresszálo sejtekben. Ezek alapján úgy véljük, hogy az Orai1 funkcionális expressziójának genetikai manipulációja (knock-down vagy nemvezető Orai1 mutánsok expressziója) modalitást jelenthet az új CAR-T sejt generációk kifejlesztésében.

Ezután megvizsgáltuk a CEM-CAR sejtek célsejt-ölő képességét monolayer (2D) kultúrában és kimutattuk, hogy a CAR-receptor specifikusan felismeri a célsejtként alkalmazott $CD19^+$ Raji és $CD19^-$ MCF-7 sejteket. A CEM-CAR sejtek még a rövid időtartamú inkubáció során is képesek voltak a célsejteket eliminálni, azonban a tumor védekező mechanizmusai e sejtek tumorokba történő *in vivo* migrációját megakadályozhatja. A szolid tumor vs. CAR-T sejt modellezésének céljából $CD19^+$ Raji, MCF-7 és $CD19^-$ Jurkat sejtekből tumor szferoidokat hoztunk létre: ezek nekrotikus maggal rendelkeztek, és sűrű sejtstruktúrát mutattak, ami valószínűleg TME-szerű miliót is eredményezett [102-104].

Kimutattuk, hogy a CEM-CAR és CAR-T sejtek a $CD19$ sejt felszíni marker jelenlététől függetlenül képesek bejutni a szferoidokba, azonban tumorölés csak a $CD19^+$ Raji szferoidokban következett be: ez egyértelműen bizonyítja, hogy a CEM-CAR és CAR-T sejtek tumorelles válasza specifikus antigénfelismerésen keresztül történt. Bevezettük az ölési hatékonyságot azaz KE-t, mint paramétert, amely az elölt sejtek egy CAR-T sejtre jutó számának becslése: ez a Raji szferoidok esetében a Jurkat-hez képest jelentősen magasabb volt, ami tovább bizonyítja a CAR-t expresszálo CEM és T-sejtek $CD19$ antigénre adott specifikus válaszát.

A $Kv1.3$ gátlása Vm24-gyel valamint a $KCa3.1$ gátlása a TRAM34 által jelentősen növelte a $CD19$ -specifikus CEM-CAR és CAR-T sejtek eliminációs hatékonyságát a szferoidokban (Raji, $CD19^-$ MCF-7). Korábban a CTL- és NK-sejtek esetében arról számoltak be, hogy az intracelluláris és extracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásai szabályozó szerepet játszanak ezen sejtek migrációjában, proliferációjában és citotoxikus funkcióiban. CTL-ekben az

optimális citotoxicitási tartományhoz alacsony $[Ca^{2+}]_{int} < 300 \text{ nM}$ ($23 - 625 \text{ }\mu\text{M}$ a $[Ca^{2+}]_{ext}$) érték társul, ami a granzim B-t tartalmazó lítikus granulumok felszabadulásának az optima is. Ugyanakkor magas $[Ca^{2+}]_{int}$ érték ($>300 \text{ nM}$) ($[Ca^{2+}]_{ext}$: $0,5-1,0 \text{ mM}^+$) esetén a migráció dominál, míg a célsejtekkel szembeni citotoxicitás már csökken [82]. Úgy gondoljuk, hogy a Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák gátlása hozzájárul ennek a Ca^{2+} optimumnak a citotoxicitási tartományba való eltolódásához, ami a CEM-CAR és CAR-T sejtek hatékonyabb daganatellenes válaszát eredményezi. Mivel a Raji/CD19 MCF-7 szferoidokhoz a gátlószereket a CEM-CAR/CAR-T sejtekkel egyidejűleg adtuk, és nem tudtunk változást kimutatni sem a CEM-CAR, sem a CAR-T sejtek infiltrációjában, feltételezzük, hogy e sejtek migrációját nem akadályozza jelentősen az ioncsatornák gátlása.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Disszertációmban T-limfociták ioncsatornáinak aktivitását patológiás körülmények között két eltérő megközelítéssel. Az egyik szempontból a különféle tumoros betegekből izolált T-sejteket vettem alá vizsgálatoknak, másrészt a tumorsejteket specifikusan felismerni és eliminálni képes CAR-T sejteket vizsgáltam.

Az értekezés első felében petefészek daganatos betegek perifériás véréből izolált CD8⁺ T-sejtek Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák aktivitását vizsgáltuk, ahol arról számoltunk be, hogy a petefészek tumor típusa (jóindulatú vs. rosszindulatú) meghatározza a CD8⁺ T-sejtek ioncsatorna expressziós mintázatát. Feltételezzük, hogy az alacsonyabb KCa3.1 és a magasabb CRAC aktivitás hozzájárul a CD8⁺ sejtek effektor funkcióinak gátlásához a tumorölésben. Mivel a teljes K⁺ konduktancia azonos volt az mTT-kben, e sejtek aktivációja feltételezhetően nem szupresszálódik a nem daganatos antigén stimulációjára. Végül feltételezzük, hogy a malignus daganatos betegek CD8⁺ sejtjeinek csökkent KCa3.1 funkciója a megemelkedett Kv1.3/CRAC aktivitással együtt diagnosztikai jelentőséggel bírhat. Úgy véljük, hogy a CD8⁺ sejtek megváltozott Kv1.3 és KCa3.1 aktivitása az OC-ben biomarkerként szolgálhat a diagnosztikában, valamint, hogy a CRAC-on keresztüli fokozott Ca²⁺ válasz hozzájárulhat a CD8⁺ funkció károsodásához.

Az értekezés második felében sikeresen igazoltuk, hogy mind a KCa3.1, mind a Kv1.3 ioncsatornák expresszálódnak és funkcionálisak a CD19-specifikus CEM-CAR sejtekben. A CEM-CAR sejtek Ca²⁺ válaszanak csökkenése, a NT kontrollhoz képest, amelyhez a csökkent Orail expresszió járulhat hozzá, a célsejtek eliminációjának megkönnyítése érdekében. A CEM-CAR és CAR-T sejtek specifikusan felismerték a tumorsejtet és eliminálták azt 2D és 3D kultúrákban egyaránt, valamint a Kv1.3/KCa3.1 csatornák gátlása hatékonyabb tumorölést segíti elő. Ezen eredmények alapján úgy véljük, hogy az ioncsatornák modulációja a CAR-T sejterápiában újszerű megközelítés lehet a jobb terápiás eredmény elérése érdekében, ami tovább javítható a PD-1/PD-1L és/vagy CTLA4/B7 ellen irányuló immunellenőrzési pont stratégiák kombinációjával [122]. Mivel ez a két csatorna a normál T-sejtekben is jelen van, a K⁺ blokkolók szisztémás alkalmazása in vivo korlátozott, azonban expressziójuk megfelelő genetikai modulációja lehetőséget jelenthet a CAR-T sejterápiában.

8. SUMMARY

In my dissertation, I investigated the ion channel activity of T lymphocytes under pathological conditions using two different approaches. In one approach, I have investigated samples isolated from different tumor patients, and in the other, I have investigated CAR-T cells that are able to specifically recognize and eliminate tumor cells.

In the first part of this thesis, we investigated the Kv1.3 and KCa3.1 ion channel activity of CD8⁺ T cells isolated from peripheral blood of ovarian cancer patients, where we report that ovarian tumor type (benign vs. malignant) determines the ion channel expression pattern of CD8⁺ T cells. We hypothesize that lower KCa3.1 and higher CRAC activity contribute to impaired CD8⁺ effector function in tumor killing. Since the total K⁺ conductance was identical in mTTs, the activation of these cells is not suppressed upon stimulation of non-tumor antigen. Finally, we hypothesize that the decreased KCa3.1 function activity of CD8⁺ cells from malignant tumors in combination with increased Kv1.3/CRAC activity may be of diagnostic significance. We speculate that altered Kv1.3 and KCa3.1 activity of CD8⁺ cells in OC may serve as biomarkers for diagnostics and that an enhanced Ca²⁺ response via CRAC may contribute to impaired CD8⁺ function.

In the second part, we successfully demonstrated that both KCa3.1 and Kv1.3 ion channels are expressed and functional in CD19-specific CEM-CAR cells. Reduction in Ca²⁺ response of CEM-CAR cells compared to NT control, which may be contributed by reduced Orai1 expression to facilitate target cell elimination. CEM-CAR and CAR-T cells specifically recognized and eliminated tumor cells in both 2D and 3D cultures, however inhibition of Kv1.3/KCa3.1 channels promotes more efficient tumor killing. Based on these results, we propose that modulation of ion channels in CAR-T cell therapy may be a novel approach to achieve better therapeutic outcome.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Hajdu Péter Bélának, aki szakmai tudásával és tapasztalataival irányította tudományos munkámat. Megtanított számos a molekuláris biológiai módszer, elektrofiziológiai mérések elsajátítására és megértésére.

Köszönetem fejezem ki Prof. Dr. Panyi Györgynek, aki munkacsoportunk vezetőjeként és a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi intézetigazgatójaként lehetővé tette, hogy munkámat ebben a munkacsoportban és intézetben végezhessem.

Köszönetemet szeretném kifejezni Szilágyi Anikónak és Nagy Cecíliának a kísérletek és mérések előkészítésénél nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni a munkacsoportunk tagjainak, hogy mindig készségesen segítették munkámat, valamint a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának.

És nem utolsó sorban, szeretném megköszönni páromnak és családomnak, akik mindenben támogattak.

10. TÁRGYSZAVAK

CAR-T sejt

Kv1.3 csatorna

KCa3.1 csatorna

CRAC csatorna

Tumor elimináció

Tumor szferoid

TRAM34

Vm24

KEYWORDS

CAR-T cell

Kv1.3 channel

KCa3.1 channel

CRAC channel

Tumor elimination

Tumor spheroid

TRAM34

Vm24

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 349-50.
2. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 351-3.
3. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
4. Weiskopf, D., B. Weinberger, and B. Grubeck-Loebenstien, *The aging of the immune system*. Transpl Int, 2009. **22**(11): p. 1041-50.
5. Knight, J. and Y. Nigam, *The lymphatic system. Part 3--The lymphatic system and immunity*. Nurs Times, 2008. **104**(15): p. 22-3.
6. Nigam, Y. and J. Knight, *The lymphatic system. Part 2--the lymphatic organs*. Nurs Times, 2008. **104**(14): p. 26-7.
7. Whitacre, J.M., J. Lin, and A. Harding, *T Cell Adaptive Immunity Proceeds through Environment-Induced Adaptation from the Exposure of Cryptic Genetic Variation*. Front Genet, 2012. **3**: p. 5.
8. Leandro De Castro, F.J.V.Z., *Learning and Optimization Using the Clonal Selection Principle*. IEEE Transactions on Evolutionary Computation 2002. **6**(3): p. 239 - 251.
9. Kumar, B.V., T.J. Connors, and D.L. Farber, *Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life*. Immunity, 2018. **48**(2): p. 202-213.
10. Davies, A.J., et al., *The morphology of immune reactions in normal, thymectomized and reconstituted mice. I. The response to sheep erythrocytes*. Immunology, 1969. **16**(1): p. 57-69.
11. Weissman, I.L., *Thymus cell migration*. J Exp Med, 1967. **126**(2): p. 291-304.
12. Pabst, R., *The bone marrow is not only a primary lymphoid organ: The critical role for T lymphocyte migration and housing of long-term memory plasma cells*. Eur J Immunol, 2018. **48**(7): p. 1096-1100.
13. Janeway Jr, C.A., *Immunobiology*. 2020, Abingdon: Taylor and Francis.
14. Feske, S., H. Wulff, and E.Y. Skolnik, *Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity*. Annual Review of Immunology, 2015. **33**(1): p. 291-353.
15. Joglekar, A.V. and G. Li, *T cell antigen discovery*. Nature Methods, 2021. **18**(8): p. 873-880.
16. Treanor, B., *B-cell receptor: from resting state to activate*. Immunology, 2012. **136**(1): p. 21-7.
17. Yam-Puc, J.C., et al., *Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation*. F1000Res, 2018. **7**: p. 429.
18. Lewis, R.S., *Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes*. Annual Review of Immunology, 2001. **19**(1): p. 497-521.
19. Svensson, M., B. Stockinger, and M.J. Wick, *Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4229-36.
20. Feske, S., H. Wulff, and E.Y. Skolnik, *Ion channels in innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 291-353.
21. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.

22. Singh V, K.A., Navik U, Allawadhi P, Bharani KK, Weiskirchen R. , *Apoptosis and Pharmacological Therapies for Targeting Thereof for Cancer Therapeutics*. Sci, 2022. **4(2)**: p. 15.
23. Jusztus, V., et al., *Activity of Potassium Channels in CD8+ T Lymphocytes: Diagnostic and Prognostic Biomarker in Ovarian Cancer?* International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25(4)**: p. 1949.
24. Hille, B., *Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches*. Biophys J, 1978. **22(2)**: p. 283-94.
25. Hurteaux, C., et al., *TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia*. EMBO J, 2004. **23(13)**: p. 2684-95.
26. Beckstein, O., et al., *Ion channel gating: insights via molecular simulations*. FEBS Letters, 2003. **555(1)**: p. 85-90.
27. Teichert, R.W. and B.M. Olivera, *Natural products and ion channel pharmacology*. Future Med Chem, 2010. **2(5)**: p. 731-44.
28. Deutsch, C., *The birth of a channel*. Neuron, 2003. **40(2)**: p. 265-76.
29. Deutsch, C., *Potassium channel ontogeny*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 19-46.
30. Xu, J., et al., *The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight*. Hum Mol Genet, 2003. **12(5)**: p. 551-9.
31. Alexander, S.P., et al., *The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels*. Br J Pharmacol, 2015. **172(24)**: p. 5904-41.
32. McCoy, J.G. and C.M. Nimigean, *Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818(2)**: p. 272-85.
33. Sewing, S., J. Roeper, and O. Pongs, *Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits*. Neuron, 1996. **16(2)**: p. 455-63.
34. Liman, E.R., et al., *Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel*. Nature, 1991. **353(6346)**: p. 752-6.
35. Doyle, D.A., et al., *The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*. Science, 1998. **280(5360)**: p. 69-77.
36. Gutman, G.A., et al., *International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels*. Pharmacol Rev, 2005. **57(4)**: p. 473-508.
37. Hu, L., et al., *Blockade of Kv1.3 Potassium Channels Inhibits Differentiation and Granzyme B Secretion of Human CD8+ T Effector Memory Lymphocytes*. PLoS ONE, 2013. **8(1)**: p. e54267.
38. Eil, R., et al., *Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function*. Nature, 2016. **537(7621)**: p. 539-543.
39. Gubic, S., et al., *Discovery of K(V) 1.3 ion channel inhibitors: Medicinal chemistry approaches and challenges*. Med Res Rev, 2021. **41(4)**: p. 2423-2473.
40. Van, N.T.H., W.K. Kim, and J.H. Nam, *Challenges in the Therapeutic Targeting of K_{Ca} Channels: From Basic Physiology to Clinical Applications*. Int J Mol Sci, 2024. **25(5)**.
41. Trombetta-Lima, M., I.E. Krabbendam, and A.M. Dolga, *Calcium-activated potassium channels: implications for aging and age-related neurodegeneration*. Int J Biochem Cell Biol, 2020. **123**: p. 105748.
42. Ishii, T.M., et al., *A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94(21)**: p. 11651-6.

43. Friebel, K., et al., *Functional role of the KCa3.1 potassium channel in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients*. J Cell Physiol, 2015. **230**(7): p. 1677-88.
44. Raychaudhuri, S.K., H. Wulff, and S.P. Raychaudhuri, *KCa3.1(-/-) Mice Do Not Develop CIA: Regulatory Role for KCa3.1 in Autoimmune Arthritis*. J Cell Physiol, 2016. **231**(11): p. 2313-4.
45. Chimote, A.A., et al., *A defect in KCa3.1 channel activity limits the ability of CD8⁺ T cells from cancer patients to infiltrate an adenosine-rich microenvironment*. Science Signaling, 2018. **11**(527): p. eaaq1616.
46. Agarwal, J.J., et al., *TRAM-34, a putatively selective blocker of intermediate-conductance, calcium-activated potassium channels, inhibits cytochrome P450 activity*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63028.
47. Lin, Y., et al., *Regulatory role of KCa3.1 in immune cell function and its emerging association with rheumatoid arthritis*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 997621.
48. Frischauf, I., et al., *The STIM1: Orai Interaction*. Adv Exp Med Biol, 2016. **898**: p. 25-46.
49. Li, Z., et al., *Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits*. Cell Res, 2011. **21**(2): p. 305-15.
50. Yamashita, M., et al., *STIM1 activates CRAC channels through rotation of the pore helix to open a hydrophobic gate*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14512.
51. Yeung, P.S., et al., *Mapping the functional anatomy of Orai1 transmembrane domains for CRAC channel gating*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(22): p. E5193-E5202.
52. Yeung, P.S., M. Yamashita, and M. Prakriya, *Molecular basis of allosteric Orai1 channel activation by STIM1*. J Physiol, 2019.
53. Yeung, P.S., M. Yamashita, and M. Prakriya, *Pore opening mechanism of CRAC channels*. Cell Calcium, 2017. **63**: p. 14-19.
54. Olivas-Aguirre, M., et al., *Reduction of Ca²⁺ Entry by a Specific Block of KCa3.1 Channels Optimizes Cytotoxic Activity of NK Cells against T-ALL Jurkat Cells*. Cells, 2023. **12**(16): p. 2065.
55. Koshy, S., et al., *Blocking KCa3.1 channels increases tumor cell killing by a subpopulation of human natural killer lymphocytes*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76740.
56. Conforti, L., *The ion channel network in T lymphocytes, a target for immunotherapy*. Clinical Immunology, 2012. **142**(2): p. 105-106.
57. Gascoigne, N.R., T. Zal, and S.M. Alam, *T-cell receptor binding kinetics in T-cell development and activation*. Expert Rev Mol Med, 2001. **2001**: p. 1-17.
58. Medyouni, G., et al., *Inhibition of K(+) Channels Affects the Target Cell Killing Potential of CAR T Cells*. Cancers (Basel), 2024. **16**(22).
59. Shim, A.H., L. Tirado-Lee, and M. Prakriya, *Structural and functional mechanisms of CRAC channel regulation*. J Mol Biol, 2015. **427**(1): p. 77-93.
60. Lunz, V., C. Romanin, and I. Frischauf, *STIM1 activation of Orai1*. Cell Calcium, 2019. **77**: p. 29-38.
61. Butorac, C., et al., *A novel STIM1-Orai1 gating interface essential for CRAC channel activation*. Cell Calcium, 2019. **79**: p. 57-67.

62. Lin, C.S., et al., *Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation*. J Exp Med, 1993. **177**(3): p. 637-45.
63. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy, *The functional network of ion channels in T lymphocytes*. Immunological Reviews, 2009. **231**(1): p. 59-87.
64. Rader, R.K., et al., *T cell activation is regulated by voltage-dependent and calcium-activated potassium channels*. J Immunol, 1996. **156**(4): p. 1425-30.
65. Panyi, G., *Ion channels and lymphocyte activation*. Immunology Letters, 2004. **92**(1-2): p. 55-66.
66. Panyi, G., C. Beeton, and A. Felipe, *Ion channels and anti-cancer immunity*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2014. **369**(1638): p. 20130106.
67. Pérez-García, M.T., P. Ciudad, and J.R. López-López, *The secret life of ion channels: Kv1.3 potassium channels and proliferation*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2018. **314**(1): p. C27-C42.
68. Zweifach, A. and R.S. Lewis, *Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(13): p. 6295-6299.
69. Prakriya, M. and R.S. Lewis, *CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity*. Cell Calcium, 2003. **33**(5-6): p. 311-321.
70. Toth, A., et al., *Functional consequences of Kv1.3 ion channel rearrangement into the immunological synapse*. Immunol Lett, 2009. **125**(1): p. 15-21.
71. Nicolaou, S.A., et al., *The Ca(2+)-activated K(+) channel KCa3.1 compartmentalizes in the immunological synapse of human T lymphocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(4): p. C1431-9.
72. Sarmay, G., *Biologia Futura: Emerging antigen-specific therapies for autoimmune diseases*. Biol Futur, 2021. **72**(1): p. 15-24.
73. Zweifach, A. and R.S. Lewis, *Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6295-9.
74. Panyi, G., et al., *K⁺ Channel Blockers: Novel Tools to Inhibit T Cell Activation Leading to Specific Immunosuppression*. Current Pharmaceutical Design, 2006. **12**(18): p. 2199-2220.
75. Varga, Z., P. Hajdu, and G. Panyi, *Ion channels in T lymphocytes: An update on facts, mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases*. Immunology Letters, 2010. **130**(1-2): p. 19-25.
76. Wulff, H., et al., *The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS*. J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1703-13.
77. Beeton, C. and K.G. Chandy, *Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis*. Neuroscientist, 2005. **11**(6): p. 550-62.
78. Valle-Reyes, S., et al., *Differential Activity of Voltage- and Ca²⁺-Dependent Potassium Channels in Leukemic T Cell Lines: Jurkat Cells Represent an Exceptional Case*. Frontiers in Physiology, 2018. **9**.
79. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.

80. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
81. Kaschek, L., et al., *A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity*. *Semin Cell Dev Biol*, 2021. **115**: p. 10-18.
82. Zhou, X., et al., *A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity*. *J Physiol*, 2018. **596**(14): p. 2681-2698.
83. Asmamaw Dejenie, T., et al., *Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy*. *Hum Vaccin Immunother*, 2022. **18**(6): p. 2114254.
84. Alnefaie, A., et al., *Chimeric Antigen Receptor T-Cells: An Overview of Concepts, Applications, Limitations, and Proposed Solutions*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022. **10**: p. 797440.
85. Kandra, P., et al., *Utility and Drawbacks of Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T) Therapy in Lung Cancer*. *Frontiers in Immunology*, 2022. **13**.
86. Sterner, R.C. and R.M. Sterner, *CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies*. *Blood Cancer J*, 2021. **11**(4): p. 69.
87. Dotti, G., et al., *Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells*. *Immunol Rev*, 2014. **257**(1): p. 107-26.
88. June, C.H., et al., *CAR T cell immunotherapy for human cancer*. *Science*, 2018. **359**(6382): p. 1361-1365.
89. Fésüs V., N.Á., Alpár D., & Bödör C., *Az adoptív sejtttranszfer sikere a hematológiában: A kiméra antigénreceptorral felruházott T-sejtek*. *Hematológia–Transzfuziológia*, 2019. **52**(3): p. 178–187. .
90. Leick, M.B., M.V. Maus, and M.J. Frigault, *Clinical Perspective: Treatment of Aggressive B Cell Lymphomas with FDA-Approved CAR-T Cell Therapies*. *Molecular Therapy*, 2021. **29**(2): p. 433-441.
91. Levine, B.L., et al., *Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy*. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017. **4**: p. 92-101.
92. Piccchi, D., et al., *Towards novel reimbursement models for expensive advanced therapy medicinal products (ATMPs)*. *Swiss Med Wkly*, 2020. **150**: p. w20355.
93. Marofi, F., et al., *CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities*. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021. **12**(1).
94. Davila, M.L., et al., *Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(224): p. 224ra25.
95. Wagner, J., et al., *CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality?* *Mol Ther*, 2020. **28**(11): p. 2320-2339.
96. Kunimasa, K. and T. Goto, *Immunosurveillance and Immunoediting of Lung Cancer: Current Perspectives and Challenges*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(2).
97. Yazdanifar, M., R. Zhou, and P. Mukherjee, *Emerging immunotherapeutics in adenocarcinomas: A focus on CAR-T cells*. *Curr Trends Immunol*, 2016. **17**: p. 95-115.
98. Tajima, N., et al., *Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1alpha and the von Hippel-Lindau protein*. *J Physiol*, 2006. **571**(Pt 2): p. 349-59.
99. Verma, N.K., et al., *Obstacles for T-lymphocytes in the tumour microenvironment: Therapeutic challenges, advances and opportunities beyond immune checkpoint*. *eBioMedicine*, 2022. **83**: p. 104216.

100. Chirra, M., et al., *How the Potassium Channel Response of T Lymphocytes to the Tumor Microenvironment Shapes Antitumor Immunity*. *Cancers*, 2022. **14**(15): p. 3564.
101. Henze, J., et al., *Enhancing the Efficacy of CAR T Cells in the Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer*. *Cancers*, 2020. **12**(6): p. 1389.
102. Gilazieva, Z., et al., *Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine*. *Cancers*, 2020. **12**(10): p. 2727.
103. Sharma, M., et al., *Quantitative and Qualitative Image Analysis of In Vitro Co-Culture 3D Tumor Spheroid Model by Employing Image-Processing Techniques*. *Applied Sciences*, 2021. **11**(10): p. 4636.
104. Kamatar, A., G. Gunay, and H. Acar, *Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids*. *Polymers (Basel)*, 2020. **12**(11).
105. Chimote, A.A., et al., *Nanovesicle-targeted Kv1.3 knockdown in memory T cells suppresses CD40L expression and memory phenotype*. *Journal of Autoimmunity*, 2016. **69**: p. 86-93.
106. Matteson, D.R. and C. Deutsch, *K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion*. *Nature*, 1984. **307**(5950): p. 468-471.
107. Chimote, A.A., et al., *A defect in KCa3.1 channel activity limits the ability of CD8(+) T cells from cancer patients to infiltrate an adenosine-rich microenvironment*. *Sci Signal*, 2018. **11**(527).
108. Chimote, A.A., et al., *Selective inhibition of KCa3.1 channels mediates adenosine regulation of the motility of human T cells*. *J Immunol*, 2013. **191**(12): p. 6273-80.
109. Chimote, A.A., et al., *Kv1.3 Channels Mark Functionally Competent CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Cancer*. *Cancer Res*, 2017. **77**(1): p. 53-61.
110. Voros, O., G. Panyi, and P. Hajdu, *Immune Synapse Residency of Orai1 Alters Ca²⁺ Response of T Cells*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(21): p. 11514.
111. Wang, T., et al., *Granzyme B-induced neurotoxicity is mediated via activation of PAR-1 receptor and Kv1.3 channel*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43950.
112. Wulff, H., et al., *The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS*. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. **111**(11): p. 1703-1713.
113. Kershaw, M.H., et al., *A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(20 Pt 1): p. 6106-15.
114. Varga, Z., et al., *Vm24, a Natural Immunosuppressive Peptide, Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells*. *Molecular Pharmacology*, 2012. **82**(3): p. 372-382.
115. Gurrola, G.B., et al., *Structure, function, and chemical synthesis of Vaejovis mexicanus peptide 24: a novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes*. *Biochemistry*, 2012. **51**(19): p. 4049-61.
116. Vera, O.D., H. Wulff, and A.P. Braun, *Endothelial KCa channels: Novel targets to reduce atherosclerosis-driven vascular dysfunction*. *Front Pharmacol*, 2023. **14**: p. 1151244.
117. Chimote, A.A., et al., *A Compartmentalized Reduction in Membrane-Proximal Calmodulin Reduces the Immune Surveillance Capabilities of CD8(+) T Cells in Head and Neck Cancer*. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 143.

118. Newton, H.S., et al., *Targeted knockdown of the adenosine A(2A) receptor by lipid NPs rescues the chemotaxis of head and neck cancer memory T cells*. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021. **21**: p. 133-143.
119. Aldrich R., C.K.G., Grissmer S., Gutman G.A., Kaczmarek L.K., Wei A.D. and Wulff H., *Calcium- and sodium-activated potassium channels (KCa, KNa) in GtoPdb v.2023.1*. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE, 2023. **2023(1)**.
120. Mata, M., et al., *Inducible Activation of MyD88 and CD40 in CAR T Cells Results in Controllable and Potent Antitumor Activity in Preclinical Solid Tumor Models*. *Cancer Discovery*, 2017. **7**(11): p. 1306-1319.
121. Hartmann, J., et al., *Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts*. *EMBO Molecular Medicine*, 2017. **9**(9): p. 1183-1197.
122. Lao, Y., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy-How to Overcome Drug Resistance?* *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(15).



Nyilvántartási szám: DEENK/186/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Jusztus Vivien

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10090179

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Jusztus, V.**, Szőőr, Á., Hajdu, P.: Role of CAR-T cell K⁺ channels in tumor infiltration and elimination.
J. Immun. "Accepted by Publisher", 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jimmun/vkaf084>
IF: 3.6 (2023)
2. **Jusztus, V.**, Medyouni, G., Bagosi, A., Lampé, R., Panyi, G., Matolay, O., Maka, E., Krasznai, Z. T., Vörös, O., Hajdu, P.: Activity of Potassium Channels in CD8⁺ T Lymphocytes: diagnostic and Prognostic Biomarker in Ovarian Cancer?
Int. J. Mol. Sci. 25 (4), 1-8, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25041949>
IF: 4.9 (2023)

További közlemények

3. Medyouni, G., Vörös, O., **Jusztus, V.**, Panyi, G., Vereb, G., Szőőr, Á., Hajdu, P.: Inhibition of K⁺ Channels Affects the Target Cell Killing Potential of CAR T Cells.
Cancers (Basel). 16 (22), 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers16223750>
IF: 4.5 (2023)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,5**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.05.07.

