

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**T limfociták ioncsatornáinak aktivitása patológiás  
körülmények között**

Jusztus Vivien

Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025

## **T limfociták ioncsatornáinak aktivitása patológiás körülmények között**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Jusztus Vivien okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja keretében

Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Boratkó Anita, PhD  
Dr. Szöllősi András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora  
Dr. Mádi András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A  
épület tanterme, 2025. szeptember 16. 13 óra

## ELŐSZÓ

A CD8<sup>+</sup> T-sejtek szerepet játszanak a tumor növekedés visszaszorításában és az immunterápiában. A T-limfociták ioncsatornái, mint a Kv1.3, KCa3.1 és CRAC (kalcium-felszabadulás aktivált csatorna) a Ca<sup>2+</sup> jelátvitel szabályozásával befolyásolják a T-sejtek Ca<sup>2+</sup>-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<sup>+</sup> csatornák stabilizálják a T-sejtek negatív membránpotenciálját a CRAC csatornán keresztül történő Ca<sup>2+</sup> beáramlás fenntartása érdekében. Akárcsak T-sejtek esetében ezen ioncsatornák kiméra antigén receptorral (CAR) rendelkező T-sejtekben is kiemelkedő szerepet játszhatnak. A T-sejtek genetikai módosítása, hogy CAR-t fejzsek 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 szerepét patológiás állapotokban.

Megvizsgáltuk a Kv1.3, a KCa3.1 és a CRAC expresszióját petefészekrákos (OC) betegek CD8<sup>+</sup> sejtjeiben. Célunk az volt, hogy OC esetében jellemezzük mind a rosszindulatú, mind a jóindulatú daganatos betegek véréből izolált CD8<sup>+</sup> T-limfocita ioncsatornák aktivitását, ezzel egy potenciális biomarkert szolgáltatva a prognosztikában, diagnosztikában. Sikeresen kimutattuk, hogy a Kv1.3 expressziós szintje magasabb volt a rosszindulatú daganatos betegeknél, mint a kontroll vagy jóindulatú daganatos csoportokban, míg a KCa3.1 aktivitása alacsonyabb volt a rosszindulatú daganatos csoportban a többiekhez képest. Kimutattuk, hogy a Ca<sup>2+</sup>-válasz a malignus tumoros betegeknél magasabb a kontroll csoportokhoz képest.

Akárcsak a T-sejteknél, úgy a CAR-T sejtek esetében is kiemelkedő szerepet játszanak a Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák. Megvizsgáltuk, hogy a CAR-T sejt ioncsatornák (Kv1.3 és KCa3.1) milyen szerepet töltenek be a CAR-T sejt általi tumor infiltrációban és eliminációban *in vitro* körülmények között monolayer és 3D sferoid tumormodellben. Sikeresen kimutattuk, hogy a CAR-t expresszáló sejtek specifikusan eliminálják a tumorsejteket. Továbbá, a Kv1.3 (Vm24) és KCa3.1 (TRAM34) inhibitorok alkalmazása jelentősen javította a tumorölési hatékonyságát mind a CEM-CAR, mind a CAR-T sejtek esetében sferoidokban.

## **2. BEVEZETÉS**

### **2.1 Az immunrendszer szerepe, működése**

Az immunrendszer már azelőtt 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 segítik fenntartani az immunhomeosztázist. A nyirokszerveket funkciójuk alapján elsődleges (tímusz, vörös csontvelő) vagy másodlagos nyirokszerveknek (nyirokcsomók, lép, Peyer plakk) nevezzük. A csontvelői hemopoetikus őssejtekből mieloid és limfoid előalakok fejlődnek, majd ezekből alakulnak ki az immunrendszer sejtjei. A mieloid fejlődési útvonalon keletkeznek pl. a dendritikus sejtek, granulociták, makrofágok és a hízósejtek, míg a limfoid fejlődési úton a limfociták elő alakjai differenciálódnak, melyekből végül B sejtek, T sejtek vagy természetes ölő (NK) sejtek jönnek létre.

### **2.2 T sejtek szerepe az immunválasz során**

Az adaptív immunválasz kiemelkedő szereplői a T-sejtek, melyeket két csoportba sorolhatjuk be működésük alapján: citotoxikus ( $CD8^+$ ) és helper ( $CD4^+$ ) T-sejtek. A helper T-sejtek az immunválaszt egyéb immunsejt aktivációja révén (például B-limfocita, makrofág) szabályozzák, irányítják, a citotoxikus T-sejtek pedig képesek felismerni és eliminálni a fertőzött és daganatos sejteket. 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. Az antigén prezentáció következtében számos szignalizációs útvonal indul el a sejtben, mint például a  $Ca^{2+}$ -függő jelátviteli útvonal, amely következtében a sejt proliferálódni, differenciálódni fog.

### **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. A nem mucinózus epiteliális petefészekrák leggyakrabban használt biomarkere a karcinóma antigén-125, mint szérummarker, de mucinózus és csírasejtes daganatokban nem informatív. A platina-alapú gyógyszerek rendelkezésre állnak elsődleges kezelésként, de előrehaladott stádiumú betegeknél ez nem bizonyult hatékonynak.

## **2.4 Tumor mikrokörnyezet (TME)**

Az immunrendszer által végzett immunfelügyelet gyakran kudarcot vall, mivel a tumorsejtek képesek átprogramozni a túlélésüket biztosító létfontosságú útvonalakat. A CD8<sup>+</sup> T-sejtek a tumor mikrokörnyezetében jelen lévő immunszuppresszív mechanizmusok, barrierék miatt nem képesek hatékonyan ellátni effektor funkciókat és így eliminálni a rákos sejteket. A TME metabolikus (emelkedett extracelluláris K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, ATP- és adenoszinszint, hipoxia és fokozott savasság) és sejtkomponensek (programozott sejthalál ligand 1) túlreprezentációja révén akadályozza a CD8<sup>+</sup> T-sejtek effektor funkcióit. Immunszuppresszív tényezők: a mieloid szuppresszor sejtek (MDSC), a regulátor T-sejtek, a tumorasszociált makrofágok (TAM) vagy neutrofilek (TAN), a szuppresszív szolubilis faktorok és citokinek.

## **2.5 Ioncsatornák**

Az ioncsatornák olyan pórusformáló fehérjék, biztosítják az ionok szabályozott és szelektív átjutását a sejtmembránon az elektrokémiai gradiens irányában. Az ioncsatornák szelektivitása alapján megkülönböztethetünk nagy szelektivitású (4 alegység), kis szelektivitású (5 alegység) és nem szelektív csatornákat (6 alegység). Kapuzás alapján megkülönböztetünk ligand-kapuzott, intracelluláris hírvivő által kapuzott, feszültség-kapuzott, mechanoszenzitív kapuzott és háttér csatornát. Az ioncsatornák lehetséges állapotai: nyitott, zárt és esetenként inaktív, mely állapotokat különféle konformáció jellemez.

## **2.6 Feszültség-kapuzott kálium csatorna, Kv1.3**

A feszültségfüggő kálium (Kv) csatornák a sejt membránpotenciálját és a különféle jelátviteli folyamatokat szabályozzák. A Kv csatornák négy alegységből állnak össze, melyben egy alegység hat transzmembrán hélixet tartalmaz. Az egyes alegységek ER-ban történő összeszerelődését a tetramerizációs ún. T1 domént teszi lehetővé. Az ionvezetést lehetővé tevő konzervált pórusrégió kialakulásért 5. és 6. transzmembrán szegmens (S5 és S6) közötti hurok és a S6 szegmens bizonyos részei felelősek. Ezen régió tartalmazza a kálium szelektivásáért felelős szelektivitási szűrő szekvenciát. A Kv csatornák feszültség szenzorának negyedik transzmembrán szegmenst tekintjük. Kimutatták, hogy a Kv1.3 ioncsatorna kulcsfontosságú eleme annak az útvonalnak, amely a CD8<sup>+</sup> T-sejtek GrB-termelését és szekrécióját szabályozza.

## **2.7 Kalcium-kapuzott kálium csatorna, KCa3.1**

Közepes vezetőképességű  $K^+$  csatornák közé tartozik a  $Ca^{2+}$ -aktivált KCa3.1 ioncsatorna. A KCa3.1 ioncsatorna 4 alfa alegységet tartalmazó transzmembrán fehérje, ami egyenként 6 transzmembrán szegmenset (S1-S6) tartalmaz. Az ionvezetést lehetővé tevő pórus régió az S5 és S6 között helyezkedik el. A C-terminálnál található egy kalmodulin kötő domén, melyhez  $Ca^{2+}$ -aktivált kalmodulin kapcsolódik, amely aktiválni fogja a csatornát, azaz nyitott állapotba kerül. Az aktivált csatorna hozzájárul  $K^+$  kiáramlás általi membránpotenciál és az az intracelluláris kalcium szint szabályozásához. KCa3.1 csatorna fontos immunszabályozó szerepet játszik különféle sejtbeli folyamatokban, mint a sejtciklus progresszió, T-sejtek proliferációjában, aktivációjában, migrációjában, továbbá azok effektor funkcióját elősegítő gének expressziójában.

## **2.8 CRAC-csatorna**

A SOCE (store-operated calcium entry) csatornák közül leginkább tanulmányozott a „kalcium-felszabadulás aktiválta kalcium” (CRAC) csatorna. A CRAC csatorna egy nagyon  $Ca^{2+}$  szelektív csatorna, amely két alegységből épül fel: Orai1 és STIM1 alegységekből. Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  raktár kiürülését a STIM1 alegység érzékeli, amely konformáció változás után képes az Orai1-hez közvetlenül kötődni, ez vezet a CRAC csatorna aktivációjához, ezáltal extracelluláris  $Ca^{2+}$  áramlik be CRAC csatornákon keresztül. A T-sejt aktiváció és az effektor funkciók kulcsfontosságú lépése a  $Ca^{2+}$  -ionok CRAC csatornákon keresztüli beáramlása. A CRAC és a KCa3.1 csatornák közötti kölcsönhatás szükséges az optimális célsejt-eliminációhoz.

## **2.9 T limfociták kálium csatornáinak szerepe a T sejt aktivációban, effektoros funkciók betöltésében**

A T-sejt ioncsatornák, mint a Kv1.3, KCa3.1 és az Orai1 ioncsatorna kiemelkedő szerepet játszik T-sejtek aktivációja, proliferációja és tumor-ölése során. A T-sejtek antigén felismerésének következtében olyan jelátvitel kaszkád aktiválódik, amely következtében inozitol-1,4,5-trifoszfát ( $IP_3$ ) szabadul fel, amely az ER membránjában található  $IP_3$  receptorhoz ( $IP_3R$ ) kötődik, ezáltal  $Ca^{2+}$  kiáramlást idéz elő  $IP_3R$ -en keresztül. A  $Ca^{2+}$  kiürülését a CRAC csatorna STIM1 alegysége érzékeli, amely Orai1 csatornához transzlokálódik, ezáltal aktiválva a CRAC csatornát, melynek következtében  $Ca^{2+}$  áramlik be az i.c. térbe. A megemelkedett i.c.  $Ca^{2+}$ -szint a sejtmembránt depolarizálja, amely hatására aktiválódik Kv.1.3

ioncsatorna, míg a megemelkedett kalcium koncentráció a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{KCa3.1}$  csatornát aktiválja, ezzel a membránpotenciált kellően negatív értéken tartják (T-sejtek esetében:  $-50 - -60$  mV) a kálium-efflux által, így biztosítva a hajtóerőt a megfelelő  $\text{Ca}^{2+}$ -függő jelátvitelhez.

## **2.10 Kv1.3 és KCa3.1 csatornák T sejt altípus szerinti expressziója**

A naiv  $\text{CD4}^+$  és  $\text{CD8}^+$  T-sejtek egyaránt expresszálják  $\text{CD45RA}$  foszfatáz és a  $\text{CCR7}$  kemokin receptort, az utóbbi kulcsfontosságú szolgál a nyirokcsomókba való belépéshez, ahol a naiv sejtek antigénnel találkozás következtében, aktiválódnak és „naiv aktivált” vagy „naiv effektorokká” válnak. A T-sejtekben kifejeződő  $\text{Kv1.3}$  és a  $\text{KCa3.1}$  csatornák száma függ a sejt aktivációs és differenciálódási állapotától. Nyugalmi állapotban a  $\text{CD4}$  és  $\text{CD8}$  naiv,  $\text{T}_{\text{CM}}$  ( $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$ ) és  $\text{T}_{\text{EM}}$  ( $\text{CCR7}^-\text{CD45RA}^-$ ) sejtek lényegesen több  $\text{Kv1.3}$  csatornát expresszálnak, mint a  $\text{KCa3.1}$  csatornát. A naiv-effektor és  $\text{T}_{\text{CM}}$ -effektor sejtek hasonló számú  $\text{Kv1.3}$  és  $\text{KCa3.1}$  csatornát fejeznek ki. Az aktivált  $\text{CD4}^+$  és  $\text{CD8}^+$   $\text{T}_{\text{EM}}$  sejtek  $\text{Kv1.3}$  csatornát magas, míg az  $\text{KCa3.1}$  csatornát alacsony számban fejezik ki. A  $\text{CD8}^+$   $\text{T}_{\text{EM}}$  sejtek egy része  $\text{T}_{\text{EMRA}}$  ( $\text{CCR7}^-\text{CD45RA}^+$ ) sejtekké differenciálódik, amelyet magas  $\text{Kv1.3}$  és alacsony  $\text{KCa3.1}$  expresszió jellemez.

## **2.11 A $\text{Ca}^{2+}$ optimum szabályozó szerepe a daganatok elleni küzdelemben**

CTL és NK sejtek esetében az intracelluláris ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ ) és extracelluláris ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -szint változásai befolyásolhatják a sejtek migrációs, proliferációs és citotoxikus folyamatait. A  $100$  nM-nál kisebb nyugalmi  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$  érték esetén a citotoxicitás kissé csökkent és migrációs képességük nagy mértékben korlátozott. A  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$  emelkedés ( $100-300$  nM) az optimális citotoxikus potenciál eléréséhez szükséges. A  $300$  nM feletti  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$  érték a migrációhoz optimális, azonban a citotoxicitás már kissé csökken. Nagyon magas  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$  esetén a proliferáció és az apoptózis dominál.

## **2.12 CAR-T sejtek felépítése, generációi**

A CAR T-sejtek a T-sejtek génmanipulációjával létrehozott kiméra antigén receptorral (CAR) rendelkező T-sejtek. A CAR négy fő doménből áll: egy extracelluláris antigén-felismerő ektodoménből, egy csukló régióból, egy transzmembrán doménből és egy intracelluláris endodoménből. A CAR-T sejtek képesek felismerni a tumorsejtek felszínén található specifikus antigént, majd eliminálni a daganatot. Az elmúlt évek során a CAR endodomén konformációja

sokat változott a CAR-T sejtek aktivitása, proliferációja és terápiás hatékonyságának céljából. Ebből kifolyólag napjainkban 5 különböző CAR generációt különböztethetünk meg.

### **2.13 CAR-T sejt terápia**

CAR T-sejtes terápia jelentős előrelépést jelent a személyre szabott rákkezelésben. Az FDA már több, mint hat CAR T-sejtes terápiát hagyott jóvá hematológiai malignitások, például a nagy B-sejtes limfóma esetén. 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 CAR-T sejt terápia hatékonysága javítható a különböző immunterápiás szerekkel vagy más terápiás módszerekkel (sugárterápia vagy kemoterápia) történő kombinációjával, amelyek elősegíthetik a tumor eliminációját.

### **2.14 Sferoid, *in vitro* tumor modell**

A 2D modellrendszerek használata korlátolt, míg a tumor xenotranszplantáció költséges és időigényes eljárás. Ezt a problémát a natív tumor és a TME jellemzőit utánzó 3D-s tumormodellek kifejlesztésével lehetne megoldani. A sferoidoknak számos alkalmazási területe van, felhasználhatók a TME és az angiogenezis modellezésére, xenograft modellként és biobankként, gyógyszerészítésre és terápiás szerek fejlesztésének segítésére.

### **3. CÉLKITŰZÉS**

Doktori értekezésemben a T limfociták ioncsatornáinak szerepét vizsgáltam patológiai körülmények között, melyhez két különféle megközelítést alkalmaztam:

#### **3.1 Kv1.3, KCa3.1 és Orai1 ioncsatornák aktivitása daganatos betegségekben.**

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<sup>+</sup> T-limfociták Kv1.3, KCa3.1 expressziós szintjének jellemzése patch-clamp módszerrel.
2. Ovárium tumoros (malignus és benignus) betegek és egészséges donorok CD8<sup>+</sup> sejtjei Ca<sup>2+</sup>-válaszának vizsgálata, ezáltal az Orai1 ioncsatornák funkcionális expressziójának jellemzése FURA-2 alapú Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup> jelátvitel szabályozásával. Akár csak T-sejtek esetén, CAR-T sejtekben is kiemelkedő szerepet játszhatnak ezen ioncsatornák. Célunk az volt, hogy:

1. A kiméra antigén receptor (CAR) expressziója CCRF-CEM és humán perifériás vérből izolált, aktivált T-sejtekben és funkcionalitásának validálása Calcein-Red AM alapú 2D ölési assay által CEM-CAR sejtekkel.
2. A létrehozott CEM-CAR sejtek Kv1.3/KCa3.1 és CRAC ioncsatorna expressziójának meghatározása és farmakológiai azonosítása.
3. CEM-CAR és CAR-T sejtek ioncsatornái szerepének vizsgálata (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 Humán alanyok**

Az OC vizsgálatokat 44 és 71 év közötti, azonosítatlan petefészekrákos betegek (4 rosszindulatú és 3 jóindulatú 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. 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 PBMC-eket teljes vér centrifugálásával izoláltuk SepMate PBMC izoláló cső segítségével, a STEMCELL Technologies weboldaláról letöltött protokoll alapján: (<https://www.stemcell.com/products/brands/sepmate-pbmc-isolation.html/>, letöltés dátuma: 2021.szeptember). A PBMC-eket 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 sejtenyészítő platen, anti-humán CD3 és CD28 antitestekkel (mindkettő 10 µg/ml). A 2. napon a T-sejtek expanszióját ezt követően IL-7 (10 ng/ml) és IL-15 (5 ng/ml) segítségével támogattuk.

### **4.3 Sejt kezelés**

A HEK293T és MCF-7 sejteket 2 mmol/l GlutaMAX-szal és 10% FCS és antibiotikumokkal kiegészített DMEM médiumban tenyésztettük.

A T-limfoblaszt Jurkat-E6-1 és a CD19<sup>+</sup> B-limfoblasztoid Raji sejteket 2 mmol/l GlutaMAX és 10% FCS és antibiotikumokkal kiegészített RPMI médiumban tenyésztettük.

A CCRF-CEM sejteket RPMI-1640 táptalajban tenyésztettük, amelyet 10% FBS-sel és antibiotikumokkal egészítettünk ki.

Az primer humán T-sejteket és a CAR-T sejteket 25 mM HEPES-sel, 2 mmol/l GlutaMAX-szal, 10% FCS-sel és antibiotikumokkal kiegészített RPMI táptalajban tenyésztettük. Az összes sejtet 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó inkubátorban tároltuk.

#### **4.4 Transzformálás**

A kódoló plazmidokat (10 ng) 105 µl TOP10 kompetens sejtekhez adtuk, majd 20 percig jégen inkubáltuk. 42°C-on hősokkot alkalmaztunk (60 s), majd ismét jégre helyeztük a mintákat. A sejteket hozzáadtuk 800 µl SOC médiumhoz, majd 1 órán át, 37 °C-on rázattuk 200 rpm-en. A sejteket megfelelő antibiotikum tartalmú agar táptalajra szélesztettük. A petriben lévő sejteket 16 órán keresztül, 37°C-on növesztettük. A mintákat későbbi felhasználásra 4 °C-on tároltuk.

#### **4.5 Plazmid preparálás**

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

#### **4.6 A CD8<sup>+</sup> sejtek monoklonális antitest adhéziója**

Az aktivált PBMC-ket egér anti-humán CD8 primer antitesttel jelöltük, majd a jelölt sejteket kecske anti-egér IgG-vel bevont bakteriális minőségű petri-csészében inkubáltuk felhasználásig.

#### **4.7 Retrovirális transzdukció, CD19<sup>+</sup> MCF és CAR T sejtvonalak létrehozása**

A CCRF-CEM, T és MCF-7 sejtek retrovirális transzdukciójához a Polyplus weboldaláról (<https://www.polyplus-sartorius.com/products/jetprime/>, letöltés dátuma: 2022.szeptember) és a Takara weboldaláról letöltött protokollt alkalmaztuk ([https://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/T100A\\_B\\_e.v1705.pdf](https://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/T100A_B_e.v1705.pdf), letöltés dátuma: 2022.szeptember) Az transzfekció során alkalmazott plazmidok: CD19-specifikus CAR-t kódoló pBMN retrovírus vektor, humán CD19 markert kódoló MSCV vektor, PAX2 csomagoló plazmid és VSVG plazmid. T-sejtek esetében IL-7, IL-15-öt adtunk a médiumhoz. 72 órás inkubációt követően a sejteket további kísérletekre használtuk fel.

#### **4.8 Elektrofiziológiai mérések**

A CAR-T sejtekben a KCa3.1 és Kv1.3 áramok mérése whole-cell voltage-clamp konfigurációban történt. A mérésekhez aszpartát külső oldatot (145 Na-aszpartát) alkalmaztunk, továbbá a pipettát 145 K-aszpartátot tartalmazó belső oldattal töltöttük fel. Az áramokat egy 200 ms-os rámpa protokollal váltottuk ki, amely -120 mV-tól +50 mV-ig terjedt -70 mV tartófeszültség mellett 15 másodpercenként. A KCa3.1 csatornák ( $G_{KCa3.1}$ ) és a Kv1.3

(G<sub>Kv1.3</sub>) csatornák egész sejtvesztő képességét a korábban leírtak szerint számoltuk ki. Minden egyes sejt esetében a konduktanciát három egymást követő mérés 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. A farmakológiai mérésekhez magas K<sup>+</sup> tartalmú oldatot/normál extracelluláris oldatot alkalmaztunk. Az oldatcserét gravitációval hajtott perfúziós rendszerrel végeztük. A Vm24-et aszpartát külső oldattal oldottuk. A farmakológiai mérésekhez használt belső oldat megegyezett a patch-clamp mérésekével. A TRAM34-et Heike Wulfftól (UC Camp Davis, USA) kaptuk, a rekombináns Vm24-et laboratóriumunkban állítottuk elő.

#### **4.10 Intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-mérés**

Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> válaszok méréséhez az NT (nem transzdukált) CEM, CEM-CAR és NT T sejteket 1 μM FURA-2-AM-mel töltöttük. A sejteket 0 mM Ca<sup>2+</sup> oldattal perfundáltuk a sejtek integritásának ellenőrzése céljából, majd 1 μM thapsigargin (TG) tartalmazó 0 mM Ca<sup>2+</sup> oldatot perfundáltunk az ER kiürítéséhez, majd 2 mM Ca<sup>2+</sup> oldatot alkalmaztunk, amely 1 μM TG-t tartalmazott, az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> emelkedés aktiválásához a CRAC-on keresztül. Az ioncsatorna-inhibitorok NT T-sejtek intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-válaszaira gyakorolt hatásának vizsgálatához 1 nM Vm24/ 1 μM TRAM34-et adtuk az 1 μM TG-t tartalmazó 2 mM Ca<sup>2+</sup>-oldathoz. Az NT CEM, CEM-CAR és NT T sejtek Ca<sup>2+</sup>-válaszának amplitúdóját a FURA-2 csúcs és az alapjel 340 nm/380 nm-es intenzitásarány közötti különbség meghatározásával számoltuk.

#### **4.11 Áramlási citometria**

A CD19-specifikus CAR expressziót az sGFP pozitivitás igazolta. A CD19 pozitivitás vizsgálatához Alexa Fluor 647 anti-humán CD19 antitestet alkalmaztunk. A kiértékelést NovoCyte 3000RYB áramlási citométerrel és NovoExpress szoftverrel segítségével végeztük.

#### **4.12 Calcein Red-alapú killing assay**

A citotoxicitás vizsgálatához a célsejteket 1 μM Calcein Red AM oldatban reszuszpendáltuk. A CEM-CAR effektor sejteket és a Raji, NT MCF-7 és CD19 MCF-7 célsejteket 2:1 effektor:target arányban 3 órán át koinkubáltuk. 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 formáció

A CD19-negatív Jurkat szferoidok, a CD19<sup>+</sup> Raji és CD19 MCF-7 szferoidok létrehozásához az ibidi weboldaláról letöltött protokollt alkalmaztuk ([https://ibidi.com/img/cms/downloads/an/AN32\\_Generation\\_of\\_spheroids.pdf](https://ibidi.com/img/cms/downloads/an/AN32_Generation_of_spheroids.pdf), letöltés dátuma: 2023. április).

#### 4.14 Szferoid-alapú killing és infiltrációs assay

A CEM-CAR és CAR-T sejtek háromdimenziós sejt kultúrákban történő infiltrációját és tumorölési képességét Live-or-Dye 640/662 alapú ölési teszttel határoztuk meg. A szferoidokat 24 órán keresztül CEM-CAR/CAR-T effektor sejtekkel koinkubáltuk. A szükséges mintákhoz ioncsatorna-inhibitorokat, például TRAM34-et (1  $\mu$ M), Vm24-et (10 nM) adtunk. A TRAM34, a Vm24 és a DMSO citotoxikus hatásának vizsgálatához az effektor sejtek nélkül inkubált 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  $\mu$ m vastagságban z-stack felvételeket készítettünk. Az ImageJ szoftver segítségével 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)), majd ezen 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 ( $\mu$ m) 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. Több csoport összehasonlításához egyirányú ANOVA vagy Mann-Whitney-tesztet végeztünk. A különbségeket  $p < 0,05$  esetén szignifikánsnak tekintettük. Az adatokat átlag  $\pm$  az átlag standard hibája (SEM) formában mutattuk be.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

### 5.1 A CD8<sup>+</sup> malignus tumorsejtek alacsony KCa3.1 és magas Kv1.3 konduktanciával rendelkeznek

A CD8<sup>+</sup> T és az NK tumorinfiltrációja elkerülhetetlen a tumorsejtek eliminációjához. Korábban már kimutatták, hogy a fej-nyaki tumoros betegek véréből izolált CD8<sup>+</sup> sejtekben alacsonyabb a KCa3.1 csatorna aktivitása: ez a csökkent kalmodulin expresszióknak vagy az adenosin A<sub>2A</sub> receptoron keresztül történő gátlásának tulajdonítható.

Kísérleteink segítségével mi is kimutattuk, hogy a KCa3.1 teljes-sejt vezetőképesség alacsonyabb azokban a CD8<sup>+</sup> T-sejtekben, amelyek rosszindulatú (malignus) petefészekdaganatos (OC) 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 adenosin gátolni az A<sub>2A</sub>R-PKA útvonalon keresztül, még hozzá a KCa3.1 aktivitásának csökkentésével. A tumor által termelt adenosin magas szérumbeli koncentrációja gátolhatja a CD8 sejtek KCa3.1 csatornáit, mivel az adenosin 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> sejtek KCa3.1 downregulációja a tumor számára előnyös lehet, ugyanis alacsony KCa3.1 aktivitás esetén a CD8<sup>+</sup> 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

A CD8<sup>+</sup> sejtek immunválasza részben a Ca<sup>2+</sup>-válaszon alapul, amelyet a Kv1.3 és KCa3.1 csatornák szabályoznak. Korábban több kutatócsoport is kimutatta, hogy az i.c. és e.c. Ca<sup>2+</sup> koncentráció határozottan befolyásolja a CD8<sup>+</sup> sejtek célsejt-ölő hatékonyságát: a citoszolikus Ca<sup>2+</sup> szint mérsékelt emelkedése szükséges. Itt azt kaptuk, hogy a malignus tumoros betegek sejtjeinek CRAC-hoz köthető Ca<sup>2+</sup>-válasza sokkal magasabb az egészséges donorok és benignus tumoros betegek sejtjeihez képest. Feltételezzük, hogy a mTT sejtek magasabb Ca<sup>2+</sup> válasza és ennek következtében a fokozott CRAC-expresszió gyengítheti a tumorsejt-ölő képességüket.

Úgy véljük, hogy eredményeink hozzájárulhatnak a CD8<sup>+</sup> 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 funkcionális információt szolgáltatnak a T-sejtekben lévő ioncsatornákról egyedi sejt szinten, ami kívánatosabb lehet a T-sejt-technológiára támaszkodó újszerű immunterápiák tervezésénél.

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

A CAR T-sejt-alapú terápiás rendszerek alkalmazása, fejlesztése és optimalizálása az utóbbi években egyre népszerűbbé vált. A CAR T-sejt-alapú kezelések alacsony hatékonyságúak a szolid tumorok ellen, ugyanis a tumorok szuppresszív tulajdonságai megakadályozzák a sejtek infiltrációját és effektor funkcióját. A T-sejtek ioncsatornáit, mint például a Kv1.3, KCa3.1 és CRAC csatornákat, részt vesznek számos T-sejt funkció szabályozásában, mint például a migráció és a tumorölés, amelyek fontosak a daganat felszámolásában. 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 a CEM-CAR sejteink Kv1.3 és KCa3.1 csatornák expresszióját, mely eredmények igazolták, hogy a CAR-T sejtek mind a Kv1.3, mind a KCa3.1 ioncsatornákat expresszálják, és a konduktancia szint/csatornaszám mindkettő esetében hasonló volt a primer aktivált T sejtekben leírtakhoz. Ebből kifolyólag a CCRF CEM sejtek alkalmasabbak voltak a CAR-expresszáló T-sejtek viselkedésének modellezésére, azonban a T-sejteket is bevontuk a vizsgálatunkba.

Kimutattuk, hogy a Ca<sup>2+</sup> beáramlás csökkent a CAR-T sejtekben a kontroll NT CEM sejtekhez képest, és hasonló eredményt figyeltünk meg a CAR-T és NT T sejtek esetében. Amint arról korábban beszámoltunk, a CTL-ekben a csökkent Orai1 expresszió elősegíti a célsejtek eliminációját. Az Orai1 csatornák célba juttatása azonban nem megoldott a nagy affinitású és szelektív inhibitorok hiánya miatt, ezért nem tudtuk vizsgálni a szerepét CAR-expresszáló sejtekben.

Ezután megvizsgáltuk a CEM-CAR sejtek célsejt-ölő képességét monolayer (2D) kultúrában, és sikeresen kimutattuk, hogy a CAR-receptor specifikusan felismeri a target CD19<sup>+</sup> Raji és CD19 MCF-7 sejteket és még a rövid távú inkubáció során is képesek voltak a célsejteket eliminálni. A szolid tumor vs. CAR-T sejt modellezésének céljából CD19<sup>+</sup> Raji, MCF-7 és

CD19<sup>-</sup> Jurkat sejtekből tumor szferoidokat hoztunk létre: ezek nekrotikus maggal rendelkeztek, és sűrű sejtstruktúrát mutattak, ami valószínűleg TME-szerű miliót is eredményezett.

Kimutattuk, hogy a CEM-CAR és CAR-T sejtek a CD19 sejtfelszíni marker jelenlététől függetlenül képesek bejutni a szferoidokba, azonban tumorölés csak a CD19<sup>+</sup> Raji szferoidokban következett be: ez egyértelműen bizonyítja, hogy a CEM-CAR és CAR-T sejtek tumorelles válasza specifikus antigénelismerésen 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 expresszáló 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). CTL- és NK-sejtek esetében i.c. és e.c. Ca<sup>2+</sup> koncentráció változásai szabályozó szerepet játszanak ezen sejtek migrációjában, proliferációjában és citotoxikus funkcióiban. CTL-ekben az optimális citotoxicitási tartományhoz alacsony [Ca<sup>2+</sup>]<sub>int</sub> (<300 nM) érték társul, ami a granzim B-t tartalmazó lítikus granulumok felszabadulásának az optimuma is. Ugyanakkor magas [Ca<sup>2+</sup>]<sub>int</sub> érték (>300 nM) esetén a migráció dominál, míg a célsejtekkel szembeni citotoxicitás már csökken. Úgy gondoljuk, hogy a Kv1.3 és KCa3.1 ioncsatornák gátlása hozzájárul ennek a kalcium 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.

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<sub>d</sub> érték 1000-szeresét, míg a TRAM34 esetében 500-szoros K<sub>d</sub> értéket használtunk, mivel ez a kis molekula stabilabb, mint a peptidil eredetűek. Azt is meg kell említenünk, hogy ez a hatóanyag-koncentráció nem volt hatással a célsejtek, valamint a CAR sejtek életképességére.

## 6. 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T-sejtek ioncsatorna expressziós mintázatát. Feltételezzük, hogy az alacsonyabb KCa3.1 és a magasabb CRAC aktivitás hozzájárul a CD8<sup>+</sup> sejtek effektor funkcióinak gátlásához a tumorölésben. Mivel a teljes K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> sejtjeinek csökkent KCa3.1 funkciója a megemelkedett Kv1.3/CRAC aktivitással együtt diagnosztikai jelentőséggel bírhat. Úgy véljük, hogy a CD8<sup>+</sup> sejtek megváltozott Kv1.3 és KCa3.1 aktivitása az OC-ben biomarkerként szolgálhat a diagnosztikában, valamint, hogy a CRAC-on keresztüli fokozott Ca<sup>2+</sup> válasz hozzájárulhat a CD8<sup>+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> válaszána csökkenése, a NT kontrollhoz képest, amelyhez a csökkent Orail expresszió járulhat hozzá, a célsejtek eliminációjának megkönnyítése érdekében. Az 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 segít elő. Ezen eredmények alapján úgy véljük, hogy az ioncsatornák modulációja a CAR-T sejtherápiában 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. Mivel ez a két csatorna a normál T-sejtekben is jelen van, a K<sup>+</sup> blokkolók szisztémás alkalmazása in vivo korlátozott, azonban expressziójuk megfelelő genetikai modulációja lehetőséget jelenthet a CAR-T sejtherápiában.



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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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.

