

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Kalcium- és feszültségkapuzott káliumcsatornák szerepe aktivált
limfocitákban és fibroblaszt-szerű szinoviocitákban**

Dr. Pethő Zoltán

Témavezető: Dr. Varga Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

Kalcium- és feszültségkapuzott káliumcsatornák szerepe aktivált limfocitákban és fibroblaszt-szerű szinoviocitákban

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

Írta: Dr. Pethő Zoltán Dénes, okleveles általános orvos

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

Témavezető: Dr. Varga Zoltán, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Erdődi Ferenc az MTA doktora

tagok:

Dr. Mádi András, PhD

Dr. Petheő Gábor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2017. december 13. 11 óra
Debreceni Egyetem ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, 2.306

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Albrecht Schwab, PhD

Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Albrecht Schwab, PhD

Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora

Dr. Mádi András, PhD

Dr. Petheő Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2017. december 13. 13 óra
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének tanterme

I. BEVEZETÉS

I.1. Az ioncsatornák általános ismérvei

Az ionok sejtmembránon keresztül történő transzportját ioncsatornák és különböző karrierfehérjék közvetítik. Az ioncsatornák pórusképző transzmembrán fehérjék, melyek lehetővé teszik az ionok passzív áthaladását a sejtmembrán két oldala között. Ezen fehérjéket osztályozhatjuk a rajtuk áthaladó ionok (pl. H^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), továbbá kapuzás (feszültségkapuzott, ligandum által kapuzott, mechanoszenzitív, stb.), szelektivitás, az ionáram iránya és szerkezeti homológia alapján. Az alábbi tézis főként a feszültség- és Ca^{2+} -kapuzott K^+ -csatornákra és a Ca^{2+} -felszabadulás által aktivált Ca^{2+} -csatornára (CRAC), valamint az ioncsatornák járulékos alegységeire fókuszál, ezért az alábbiakban ezek kerülnek bemutatásra.

A Kv és KCa csatornák négy, egyenként körülbelül 60-60 Kda méretű polipeptid láncból állnak össze tetramerré. Ezt a komplexet a csatorna α alegységének is nevezik, amelyhez egy vagy több járulékos alegység társulhat. Általánosságban mind a feszültségvezérelt K^+ -csatornák (VGKC vagy Kv), mind a Ca^{2+} -aktivált K^+ -csatornák (KCa) monomerje egyenként hat darab membránon átívelő, ún. transzmembrán doménnel (S1-S6) rendelkezik. A KCa csatornák közül a KCa1.1 tartalmaz emellett még alegységenként egy-egy S0 transzmembrán hélixet. Továbbá minden K^+ -csatorna monomer tartalmaz legalább egy pórus domént, amely tartalmazza a szelektív K^+ áteresztésért felelős szelektivitási szűrőt. A Kv csatornákra emellett jellemző egy feszültség-szenzor domén, amelyet az S1-S4 hélixek alkotnak. A Ca^{2+} -által kapuzott K^+ -csatornák szerkezetüket tekintve hasonlóak a Kv csatornákhöz, viszont intracelluláris C-terminális doménjük tartalmaz különféle Ca^{2+} -szenzor szegmenseket, melyek közvetlenül befolyásolják a csatorna működését. Ezáltal a Kv csatornákkal ellentétben a KCa csatornák (a KCa1.1 kivételével) feszültségfüggetlenek. A KCa család tagjait könnyen elkülöníthetjük egyedi K^+ konduktanciájuk alapján, illetve szöveti expressziójuk alapján. A nagy konduktanciájú KCa1.1 az emberi szervezetben szinte minden szövetben jelen van, és szövetspecifikus expressziója főként a különböző járulékos alegységeitől függ. A KCa2 csatornák majdnem kizárólag az idegrendszerben találhatók, míg a KCa3.1 főként a perifériás szövetekben fejeződik ki, például a hasnyálmirigyben, a tüdőben, a placentában, a vörösvértestekben és a limfocitákban.

A CRAC csatorna-komplex egy plazmamembránon átívelő ORAI fehérjéből és egy endoplazmatikus retikulum (ER) membránban található stromális interakciós molekula (STIM) elnevezésű fehérjéből áll. A CRAC-csatorna aktiválásának első lépése, hogy a STIM1 vagy

homológja, a STIM2 érzékeli a Ca^{2+} kimerülését a sima ER-ban. Ezt követően STIM oligomerizálódik, majd kitüntetett ER-plazmamembrán szakaszokhoz transzlokálódik, ahol klasztereket képez. A hat alegységből álló Ca^{2+} -csatorna ORAI-t a STIM ezekhez a csomópontokhoz toborozza, ami a csatorna nyitását követően lokális Ca^{2+} beáramlást eredményez.

Az ioncsatornák működéséhez a szövetekben szükség van különféle szabályozó, más néven járulékos alegységekre. A szakirodalomban hagyományosan β , γ vagy δ görög betűkkel ellátott kiegészítő alegységek elengedhetetlenek a megfelelő élettani funkcióhoz, és mutációik súlyos betegségeket okozhatnak. Összességében több mint 50 specifikus regulatorikus alegység ismert, és transzkripciós variánsaikat is figyelembe véve figyelemre méltó heterogenitást tesznek lehetővé az ioncsatornák működésében. Struktúrájukat tekintve a szabályozó alegységek általában sokkal kisebbek a hozzájuk tartozó csatornáknál. Hatásmechanizmusukat tekintve pedig kifejezetten heterogének, így több járulékos alegység rendelkezik transzmembrán doménnel, ami az ioncsatorna feszültség-szenzor doménjéhez kötődik másodlagos kötésekkel, illetve más szabályozó alegységek közvetlenül kapcsolódnak a csatorna pórusához. A csatornákkal való szelektív interakció révén a kiegészítő alegységek módosíthatják az adott csatornák biofizikai tulajdonságait, mint a vezetőképességet, nyitási és zárási kinetikát, illetve a feszültségérzékenységet. Emellett befolyásolhatják a csatorna membránexpresszióját is, illetve kötődhetnek különböző interakciós partnerekhez, például másodlagos hírvivők horgonyzó fehérjéihez.

A KCa1.1 csatorna járulékos alegységei fontos szereppel bírnak a csatorna és az L-típusú Ca^{2+} -csatorna fehérjekomplexumba történő összekapcsolásában. A β vagy γ alegységek jelenléte emellett befolyásolja a KCa1.1 csatorna kinetikáját, valamint a különböző KCa1.1 csatornamodulátorok szelektivitását és affinitását. A KCa1.1 négy különböző aminosav-szekvenciájú β alegysége ismert: a $\beta 1$ a simaizmokban, a $\beta 2$ a mellékvesékben és agyban, a $\beta 3$ elsősorban a herékben, és a $\beta 4$ főként a központi idegrendszerben fejeződik ki. A $\beta 1$ és $\beta 4$ alegységek az ionáram kinetikájának lelassulását és a csatorna Ca^{2+} - és feszültségérzékenységének növekedését indukálják. A $\beta 2$ és $\beta 3$ alegységek és egyes transzkripciós variánsaik szintén gyors inaktivációt eredményeznek az intracelluláris N-terminusukon keresztül. Egyes szteránvázis vegyületek, mint a litokolsav (LCA), szelektíven fokozzák a KCa1.1 áramokat, ha a csatornához $\beta 1$ alegység kapcsolódik. Ezzel szemben az arachidonsav (AA) a $\beta 2$ vagy $\beta 3$ alegység jelenlétében erősíti a KCa1.1 áramokat, de nem változtatja meg azokat $\beta 1$ vagy $\beta 4$ alegységek jelenlétében. Továbbá a skorpiótoxinok, mint az

iberiotoxin és a charybdotoxin (ChTx), melyek általánosságban gátolják a KCa1.1 működését, hatástalanná válnak $\beta 4$ alegység jelenlétében. Mindezekon felül a $\beta 1$, a $\beta 2$, és a $\beta 4$ alegységek befolyásolják a KCa1.1 membrán transzlokációját is.

I.2. Az ioncsatornák mint a T-sejt által mediált immunválasz karmesterei

A megfelelő immunválasz fenntartása összehangolt összjátékot igényel sokféle immunsejt között, beleértve a limfocitákat és az antigénprezentáló sejteket. A veleszületett és az adaptív immunrendszer sejtjeit a megfelelő pillanatban kell aktiválni ahhoz, hogy hatékonyan nézzenek szembe a belső vagy külső fenyegetésekkel, valamint hogy elkerüljék az immunrendszer felesleges túlműködését, ami autoimmunitáshoz vezethet. Ahogy a többi ingerületvezetésre képtelen, ún. „nem excitábilis” sejt, az immunsejtek is expresszálnak ioncsatornákat a membránpotenciál (V_m) szabályozása érdekében, illetve, hogy szabályozzák a Ca^{2+} -függő jelátvitelt, valamint egyéb élettani sejtfunkciókat, mint a génexpressziót, proliferációt, migrációt és differenciációt. Mindezt számos ioncsatornát írtak le T-limfocitákban: a CRAC csatornát, a feszültségkapuzott Kv1.3 csatornát, a Ca^{2+} -aktivált KCa3.1 K^+ -csatornát, a kétpórusú TASK1, TASK 2 és TASK3 K^+ -csatornákat, a nonszelektív TRPV2, TRPM2 és TRPM7 kationcsatornákat, illetve a Cl_{swell} feszültségkapuzott klorid csatornát.

A nem excitábilis sejtekben az ioncsatornákkal összefüggő sejtelettani események közül leginkább a Ca^{2+} -függő jelátvitelt tanulmányozták, amely a T-sejt receptor (TCR) aktiválódása után következik be. A TCR-aktiválást követő jelátvitel kezdeti lépése a foszfolipáz-C- γ (PLC- γ) aktiválódását eredményezi. Ez az enzim katalizálja a foszfátidil-inozitol 4,5-biszfoszfát (PIP_2) hasítását diacil-glicerollá (DAG) és inozitol 1,4,5-triszfoszfáttá (IP_3). A DAG felelős a proteinkináz-C (PKC) aktiválásáért, amely viszont számos intracelluláris szubsztrátot foszforilál. A jelátviteli kaszkád másik fontos eleme az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kétfázisú emelkedése. Az IP_3 a legfontosabb eleme a kezdeti Ca^{2+} -beáramlásnak: az IP_3 receptorhoz való kötődésének eredményeként az endoplazmatikus retikulumból (ER) Ca^{2+} szabadul fel. Ez viszont aktiválja a STIM1-et az ER membránján, amely aktiválja az ORAI1 molekulákat. Az ORAI1-en keresztül Ca^{2+} -ionok áramolhatnak a sejtbe, ami a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció második, tartós növekedését eredményezi. A sejten belüli Ca^{2+} -szint növekedése aktiválja a kalmodulint, majd ez vezet számos egyéb másodlagos hírvivő molekula, mint például a kalcineurin aktiválódásához. A kalcineurin egy foszfatáz, mely eltávolítja a gátló foszfátcsoportokat az aktivált T-sejtek nukleáris faktoráról (NFAT), lehetővé téve annak

dimerizációját és magba történő transzlokációját. Ez a transzkripció faktor ezután kötődhet a citokintermelésben szerepet játszó célgénnek (pl. IL-2) promoter régiójához.

A TCR-aktiváció következtében megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció következménye a plazmamembrán depolarizációja, ami az elektrokémiai hajtóerő csökkentése révén korlátozza további Ca^{2+} sejtbe történő beáramlását. Így a limfociták és más immunsejtek olyan K^{+} -csatornákat igényelnek, amelyek depolarizált membránpotenciálon és megemelkedett Ca^{2+} -koncentráció jelenlétében nyitnak, és K^{+} -efflux révén fenntartják a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} -beáramlás gradienseinek fenntartásához szükséges hiperpolarizált membránpotenciált.

I.3. A mitogénfüggő T-sejt aktiváció

A fiziológias T-limfocita aktiváció kulcsfontosságú szereplői az antigénprezentáló sejtek, melyek az MHC molekulán és több koaktivátor partneren keresztül igen szelektív módon indukálják viszonylag kis számú T-sejt proliferációját, melynek célja a minél specifikusabb és minél pontosabban szabályozott immunválasz létrehozása. A laboratóriumokban viszont ez igen alacsony hatásfokúnak bizonyul, tekintve, hogy a cél sokszor minél több izolált T-limfocita egyidejű aktivációja. Erre a célra az utóbbi évtizedekben számos olyan vegyületet karakterizáltak, melyek más hatásmechanizmuson keresztül aktiválják a limfocitákat. Az ún. lektin típusú szénhidrátkötő molekulák – mint a phytohemagglutinin (PhA) – keresztkötik a membránban található glikoproteinek, többek közt a TCR és a CD3 molekulák szénhidrátcsoportjait. A mitogének közül az aktivátor antitestek elsősorban a TCR és CD3 ellen irányulnak. Ennél az aktivációs módszernél a sejt teljes aktiválásához szükség van további kostimulátor receptorok (mint például az anti-CD28) elleni antitestekre is. Végül gyakran alkalmazott mitogének még a forbol-mirisztoil-acetát (PMA) és a Ca^{2+} -ionofór ionomicin. A PMA egy DAG-analóg, amely átjutva a sejtmembránba PKC-aktiválódáshoz vezet, míg az ionomicin növeli a sejtmembrán és az ER Ca^{2+} -permeabilitását. A két anyag által aktivált útvonalak együttesen elegendőek a T-sejtek aktiválásához.

I.4. Ioncsatornák, mint terápiás célpontok

A CRAC, a Kv1.3, a KCa3.1 és a KCa1.1 ioncsatornák mindannyian hozzájárulnak az immunsejtek differenciálódásához és éréséhez, az idegen antigének felismeréséhez, az immunválasz kiváltásához, illetve az apoptózis szabályozásához. Ezért nem meglepő, hogy a Kv1.3, a KCa3.1 és a CRAC csatorna inhibitorai hatással vannak a T-limfocita proliferációra. A

Kv1.3 kiváló célpont immunterápia szempontjából, mivel elsősorban asztrocitákban, T-limfocitákban és oligodendrocitákban fejeződik ki, ellentétben a CRAC és KCa3.1 csatornákkal, amelyek széles körben eloszlának, így azok blokkolójának több mellékhatása is lehet. Az utóbbi években sikeres kísérleteket végeztek Kv1.3-blokkolókkal olyan autoimmun betegségek állatmodellein, mint a szklerózis multiplex, az 1-es típusú diabétesz mellitusz vagy a reumatoid arthritisz.

A különböző ioncsatorna-blokkolók T-sejtekre vonatkoztatott antiproliferatív hatását a szakirodalom már széles körben taglalta. Ezen témához kapcsolódó korábbi tanulmányok azonban igen ellentmondásosak azzal kapcsolatban, hogy egy adott ioncsatorna-blokkoló milyen koncentrációban hatásos a sejtproliferáció gátlásában. Irodalmi összehasonlításunk eredményeként azt tapasztaltuk, hogy a proliferáció 50%-os gátlásához szükséges ioncsatornagátló-koncentráció Kv1.3 csatornablokkolók esetében $1 \times K_d$ koncentrációtól $1000 \times K_d$ -ig terjedt, illetve a KCa3.1-inhibitor TRAM-34 esetében $1,5 \times K_d$ -tól $275 \times K_d$ -ig. A K_d a hatóanyag koncentrációja, amely a megfelelő csatornák felének blokkolásához szükséges. Az itt tapasztalt variabilitásért felelős mechanizmust korábban még nem vizsgálták szisztematikusan, de nagyrészt a T-sejtek stimulálását szolgáló különböző módszereknek és az egyes vizsgálatokban alkalmazott mitogének eltérő minőségének és mennyiségének tudhatók be.

A T-limfociták aktivációja továbbá anélkül is gátolható, hogy mélyrehatóan befolyásolnánk a Ca^{2+} -jelátvitelt. A T-sejtek metabolikus útvonalait, illetve transzkripciós és transzlációs aktivitását is befolyásolhatjuk például rapamicin (más néven sirolimus) segítségével. Ez az eredetileg makrolid típusú antibiotikumként ismertté vált anyag az FKBP12-höz kötődve gátolja az mTOR jelátviteli molekula funkcióját.

I.5. Fibrolasztoszerű szinoviociták és a KCa1.1 csatorna reumatoid arthritiszben

Az előző fejezetek főleg T-sejtek és egyéb immunsejtek ioncsatornáival foglalkoztak. Azonban a szövetekben az immunválasz következtében kialakuló szöveti átrendeződés – az ún. remodelling – különböző effektorsejtek működésének tudható be. Ezen sejtek (pl. fibroblasztok, egyéb strómális sejtek) ioncsatornái szintén meghatározóak lehetnek bizonyos autoimmun betegségek patogenezisében. A reumatoid arthritisz (RA) a fejlett országok népességének közel 1%-át érinti, és csökkenti az életminőséget, illetve mozgásában korlátozza az érintett ízületeket. Emellett súlyos szív- és tüdőérintettségekkel is bír, így csökkentve az átlagos élettartamot. A RA-ban található hiperplastikus szinoviális szövet, amelyet pannusnak is neveznek, egyedülálló tulajdonságokkal rendelkezik, és mint egy daganatos szövet, invazív tulajdonságai révén

elpusztítja a porcokat és a környező csontokat. Az ún. fibroblaszt-szerű szinoviociták (FLS), amelyek az egészséges szervezetben táplálják az ízületi szövetet és extracelluláris mátrixalkotókat termelnek, igen invazívvá válhatnak RA-ban. A RA kialakulásában szerepet játszó FLS-ek (RA-FLS) rendelkeznek egy transzformált „tumorszerű” fenotípussal, ami fokozott inváziókészségben és különböző proteázok és proinflammatorikus ágensek termelésében nyilvánul meg. Fontos továbbá, hogy az FLS-ek *in vitro* és *ex vivo* invazivitása korrelál a RA állatmodellek ízületeiben a szövettani és radiológiai károsodással.

Az utóbbi évtizedekben a RA kezelése az új biológiai kezelések fejlesztésével jelentősen javult, bár a betegség remissziója így is csak ritkán érhető el, és a legtöbb beteg csak szerény javulást tapasztal. Ezenkívül a jelenlegi terápiák jelentősen csökkentik a fiziológiás immunválaszt is, ezáltal a betegek hajlamosabbak lesznek a fertőzésekre és daganatos betegségekre. Ezért új terápiás opciókra van szükség, amelyek javuláshoz vagy remisszióhoz vezetnek anélkül, hogy immunszuppressziót okoznának.

Az arthritises patkányokból származó RA-FLS-ek legdominánsabb K^+ csatornaként a $KCa1.1$ -et expresszálják a plazmamembránjukon. A $KCa1.1$ csatornák pozitív visszacsatolással serkentik a Ca^{2+} -beáramlást a K^+ -efflux biztosításával, ezzel elősegítve a sejtek migrációját és szöveti invázióját. A $KCa1.1$ pórusképző alegységeinek paxilline-nel történő blokkolása az FLS-ben gátolja az invazivitást és megakadályozza a betegség progresszióját állatmodellekben. A paxilline azonban egy lipofil molekula, amely megakadályozza a többi szervben található $KCa1.1$ csatornát is, függetlenül a csatorna alegységösszetételétől, ezáltal súlyos mellékhatásokat okozva. Ezért a $KCa1.1$ csatornák terápiás célpontként való felhasználásánál ügyelni kell arra, hogy a potenciális gyógyszerek csak szelektíven érintsenek kitüntetett $KCa1.1$ csatornát a szervezetben. Mivel a $KCa1.1$ járulékos alegységei csak bizonyos szövetekre korlátozódnak, célszerű lehet olyan gátlószerek (például antitestek) kifejlesztése, amelyek csak egy bizonyos szabályozó alegységhez kapcsolódó csatornát céloznak meg, így csökkentve minimálisra a többi szövetben a mellékhatások mértékét.

II. CÉLKITŰZÉSEK, VIZSGÁLT KÉRDÉSEK

Amint azt korábban említettük, a feszültségkapuzott ioncsatornák kulcsszerepet játszanak a különböző gyulladásos sejtek szabályozásában, és így általánosan az immunválasz koordinálásban. Kísérleteinkben két oldalról közelítettük meg a gyulladásos sejtek káliumcsatornáinak funkcionális aspektusait.

Először is a különböző ioncsatorna-blokkolók antiproliferatív hatásainak heterogenitását vizsgáltuk meg T-sejteken. Ennek a jelenségnek a hatásmechanizmusa még máig sem tisztázott, bár nagyrészt a T-sejtek stimulációjában alkalmazott eltérő módszerekre lehet visszavezetni. Ezért célunk az volt, hogy megmagyarázzuk a jelenséget az ioncsatorna-blokkolók és a rapamicin antiproliferatív hatásainak összehasonlításával, mégpedig ugyanazon kísérleti körülmények között. Továbbá – figyelembe véve eredményeinket különböző mitogénkoncentrációk mellett – olyan elméletet javasolunk, amely magyarázatul szolgálhat a megfigyelt hatásoknak.

Emellett második célunk az effektor gyulladásos sejtek káliumcsatorna-funkcióinak feltérképezése volt autoimmun betegségekben. Ehhez a reumatoid artritiszban szerepet játszó RA-FLS sejtek KCa1.1 ioncsatornájára fókuszáltunk, amiről kimutatták, hogy szorosan összefügg a RA-ben megfigyelt ízületi károsodással. A paxilline egy kis méretű, lipofil molekula, mely gátolja a szervezetben levő összes KCa1.1 csatornát, függetlenül a csatorna alegység-összetételétől, ezért súlyos mellékhatásokat, például tremort, inkontinenciát és magas vérnyomást okozhat. Bár ezek miatt a paxilline nem alkalmazható a klinikai gyakorlatban, a KCa1.1 csatorna mégis vonzó célpont lehet klinikai szempontból, részben azért, mert a KCa1.1 járulékos alegységei szövetfüggő módon korlátozzák a csatorna expresszióját és befolyásolják a csatorna farmakológiai tulajdonságait. Tehát egy olyan gyógyszer, ami a RA-FLS járulékos alegységére specifikusan hat, megreformálhatja a betegség kezelését, de mindeztidáig egyetlen KCa1.1 β alegységet sem írtak le RA-FLS-ekben. Célunk tehát annak felderítése volt, hogy a RA-FLS expresszál-e valamilyen kiegészítő β alegységet, illetve hogy ezeknek az alegységeknek a jelenléte jár-e bármilyen funkcionális következménnyel ezekben a sejtekben.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Oldatok, vegyszerek

A kísérletekben felhasznált oldatok és vegyszerek jelentős részét a Sigma Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk, minden ettől eltérő esetben az anyag mellett feltüntettük a forrását.

III.2. Mintagyűjtés

III.2.1. Mononukleáris sejtek izolálása

A perifériás vérből izolált mononukleáris sejteket (PBMC) egészséges önkéntes donorok heparinizált véréből izoláltuk. Először Hanks' Balanced Salt Solutionnel (HBSS) hígítottuk a vért 1:1 arányban, majd a vért centrifugáltuk Ficoll-Hypaque sűrűségi gradiens oldattal (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Egyesült Királyság) 1400 rpm mellett 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. Ezután az opálos mononukleáris sejtréteget leszívtuk, majd kétszer 50 ml HBSS-sel mostuk, végül megkapjuk a kísérleteinkben használt PBMC populációt.

Összesen $n = 4$ előzetes kísérletben a RosetteSep™ (Stem Cell Technologies™, Vancouver, Canada) technikával végzett negatív szelekcióval nyertünk tisztított $CD3^+$ T-limfocitákat. Ezt a technikát alkalmazva a $CD3^+$ T-sejtek aránya a populációban több mint 95% lett. Ezekben az előkísérletekben nem találtunk szignifikáns különbséget a $CD3^+$ T-sejtek és a PBMC-k között a proliferáció mértékében ($p = 0,785$), illetve az AnTx Kd ($p = 0,667$) és 10Kd ($p = 0,333$) proliferációt gátló hatásában. Ezért a későbbi kísérletsorozatban teljes PBMC populációt használtuk.

III.2.2. Fibroblasztszerű szinoviociták

Az American College of Rheumatology kritériumai szerint definiált 14 RA-ből és 4 osteoarthritisben (OA) szenvedő betegből FLS-t izoláltunk a megfelelő intézményi bizottság által jóváhagyott protokollok alapján. Emellett összesen 4 db sejtvonalat az Asterand (Detroit, MI) cégtől vásároltunk. A sejteket a 4. és 11. passzázs között használtuk fel kísérleteinkhez; az FLS-eket 10 NE/ml penicillinnel, 0,1 g/ml sztreptomocinnel, 1 mM nátrium-piruváttal, 2 mg/ml

L-glutaminnal és 10% FBS-sel kiegészített DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) oldatban tenyésztettük.

III.3. T-limfocita proliferáció modulálása

III.3.1. PBMC-aktiváció

A vizsgálat kezdetén előkísérleteket végeztünk a különböző stimulációs módszerek optimalizálása érdekében. Négy széles körben használt és jól ismert limfocitastimulációra alkalmazott technikát hasonlítottunk össze CFSE hígulási vizsgálattal PBMC-ken: PHA-stimuláció; PMA-stimuláció ionomicinnel kombinálva; oltott anti-CD3 antitest önmagában és anti-CD28-cal kombinálva. A stimulációt követően megmértük patch-clamp technikával a teljes-sejt K^+ áramot a stimulált T-sejtek reprezentatív populációin. Megállapítottuk, hogy az anti-CD3 és anti-CD28 stimuláció a leginkább reprodukálható, ezért további kísérletekben ezt a módszert alkalmaztuk.

A PBMC és a limfocita tenyészetekben specifikus T-sejt-stimulációhoz összesen $n = 8$ kísérletben 200 nM – 3 μ M oldott anti-CD3 antitesteket adtunk állandó koncentrációjú (1 μ g/ml) anti-CD28-hoz. Emellett optimáltuk a stimuláció mértékét úgy, hogy az oldott antitesteket kitapasztottuk a tenyészetedény aljához szobahőmérsékleten 30 percen keresztül. Továbbá $n = 8$ kísérletben szuperparamágneses gyöngyökkel konjugált anti-CD3 és anti-CD28 monoklonális antitesteket (Life Technologies Co., Waltham, MA, USA) alkalmaztunk, amelyek felhasználóbarátabbak voltak, mint az oldott antitestek. Ezekben az esetekben a gyöngy-sejt arány 1:200-tól 1:1-ig terjedt (lásd az eredményeket). Az oldott mitogének és a gyöngyök által közvetített stimuláció összehasonlítására végzett Student-féle t-teszt nem mutatott szignifikáns különbséget a két módszer között ($p = 0,336$). A gyöngyökről ismert, hogy megfelelő keresztkötést biztosítanak, így viszonylag magas aktivációs szintet indukálnak, ellentétben az oldott anti-CD3 és anti-CD28 stimulálással, ami a méréseinkben nagyobb mértékű variabilitást eredményezett.

III.3.2. PBMC-proliferáció gátlása

A Kv1.3-as csatorna blokkolásához a peptid típusú AnTx-et alkalmaztuk, amelyet a laborunk korábban már alkalmazott farmakológiai vizsgálatokban. A KCa3.1 csatornákat

TRAM-34-gyel gátoltuk, míg a CRAC-csatornákat 2-Apb-vel blokkoltuk. Az ioncsatorna-inhibitorokat két különböző koncentrációban alkalmaztuk: az alacsonyabb az ioncsatornák 50%-os gátlásához szükséges koncentráció volt, vagyis $1 \times K_d$, míg a magasabb koncentrációtartomány a K_d érték 10-szerese volt, azaz $10 \times K_d$. Az AnTx esetében 500 pM ($1 \times K_d$) és 5 nM végkoncentrációkat alkalmaztunk. A 2-Apb esetében a K_d 5 μ M, a másik koncentráció 50 μ M ($10 \times K_d$) volt, továbbá a TRAM-34-et 20 nM ($1 \times K_d$) és 200 nM ($10 \times K_d$) koncentrációban használtuk. A rapamicint a szakirodalomban fellelt legalacsonyabb koncentráció mellett alkalmaztuk a T-sejtek proliferációjának 50%-os ($1 \times IC_{50} = 20$ pM) gátlására, míg a magasabb dózis 200 pM ($10 \times IC_{50}$) volt.

III.4. Citokinszekréció mérése T-limfocitákon

Az PBMC-k tenyésztésének felülúszóit ($n = 3$) a mitogén- és ioncsatorna-blokkolás kezeléseket követő ötödik napon gyűjtöttük össze. A citokin szendvics ELISA technikát alkalmaztuk a szolubilis citokinek, nevezetesen az IL-10 és az IFN- γ koncentrációjának specifikus kvantitatív kimutatására. A citokinek koncentrációját a felülúszóban OptEIA kittel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) mértük duplikátumokban, a gyártó utasításai szerint.

III.5. Áramlási citometriás vizsgálatok

III.5.1. Karboxifluoreszcein-szukcinimidil-észter (CFSE) hígulási esszé

A T-limfociták proliferációjának vizsgálatához a CFSE-hígulási esszé munkacsoportunk által módosított változatát használtuk. A perifériás vérből frissen szeparált mononukleáris sejtekhez 1 μ M-os végkoncentrációban adtuk a CFSE-t, majd inkubáltuk a sejtszuspenziót 15 percig szobahőmérsékleten és 20 percig 37 °C-on. A CFSE-vel jelölt sejtek proliferációját a stimulációt követő ötödik napon vizsgáltuk FACScan típusú citométer segítségével. A CFSE gerjesztési maximuma 488 nm, illetve emissziós maximuma 520 nm. Köpenyoldóként 1x PBS-t használtunk. Összesen három paramétert mértünk: az előreszórást (FSC), az oldalszórást (SSC), illetve a sejtekben a CFSE által emittált fluoreszcencia intenzitását. Az FSC és SSC értékek alapján kaput illesztettünk a limfocitákra, majd a kapu által körülhatárolt populációnak vizsgáltuk meg a CFSE fluoreszcenciaintenzitás-hisztogramját. A proliferáció mértékét az osztódások során létrejött utódsejtek és az összes

sejt számának hányadosaként definiált osztódási indexszel (OI) jellemeztük, az alábbi képlet segítségével:

$$OI = \left(\sum_{k=1}^n A_k \right) / \left(\sum_{k=0}^n A_k \right)$$

ahol az n darab osztódási ciklus alatt a k ciklusban A_k volt a mintában a sejtszám.

A CFSE hígulási esszé adatait a BD CellQuest szoftverrel gyűjtöttük össze. Adatelemzéshez a Cyflogic 1.2.1 és a Flowjo X programot használtuk.

III.5.2. Propidium jodid (PI) festés

A PI-festést az 5 napos inkubációs periódus végén végeztük el. Először a sejteket egyszer HBSS-sel mostuk, majd PI-t adtunk a sejtszuszpenzióhoz, úgy, hogy a végkoncentráció 1 $\mu\text{g/ml}$ legyen. A sejteket ezt követően sötétben inkubáltuk 5 percig szobahőmérsékleten. Az áramlási citométeren a kaput egy nem kezelt sejteket tartalmazó negatív kontroll csőre állítottuk be.

III.5.3. CD44- és KCa1.1 jelölés RA-FLS sejteken

Az RA-FLS-ek esetén a KCa1.1 α alegységének és a CD44-nek a detektálásához a sejteket először 0,5% szaponinnal permeabilizáltuk az intracelluláris epitópok elérése érdekében. Az adatokat egy Canto II áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA) gyűjtöttük be BD FACSDiva szoftverrel, majd az adatok elemzéséhez a FlowJo (Treestar, Ashland, OR) szoftvert használtuk. A későbbiekben az alacsony CD44 intenzitást mutató sejteket CD44^{alacsony}, míg a magas intenzitású sejteket CD44^{magas} jelzi. Az élő CD44^{magas} és CD44^{alacsony} sejteket inváziós esszéinkhez steril körülmények között, FACSariaII áramlási citométer (BD Biosciences) alkalmazásával külön csövekbe válogattuk és azonnal felhasználtuk.

III.6. Elektrofiziológia

Kísérleteinkben minden esetben teljes-sejtes patch-clamp technikát használtunk. A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üveg kapillárisokból (Clark Biomedical Instruments, Pangbourne, UK) készítettük, melyek ellenállása oldatban 2-5 $\text{M}\Omega$ volt. Az ideális feszültségzár feltételek eléréséhez 85%-os soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk.

Elektrofiziológiai kísérleteinkben a sejteket üveg fedőlemezekre vagy Petri-csészékbe helyeztük, és hagytuk tapadni. A teljes-sejt K^+ áram méréséhez a következő oldatokat használtuk fel: a Kv1.3 limfocitákban történő mérésekor a belső oldat összetétele 140 mM KF, 5 mM NaCl, 11 mM K_2 EGTA, 2 mM $MgCl_2$ és 10 mM HEPES (pH 7,20, ~ 295 mOsm) volt; a KCa1.1 RA-FLS-ben történő mérése során a belső oldat 10 mM EGTA-t, 5 mM HEPES-t és 5 μ M szabad Ca^{2+} -ot tartalmazott. A külső oldat összetétele minden esetben 160 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$ és 10 mM HEPES, pH 7,4 volt. A kísérleteket szobahőmérsékleten (20-22 °C) végeztük. Egyes kísérleteknél az RA-FLS-eket inkubáltuk fluorofórral konjugált anti-CD44 antitestekkel, majd mosás után a fluoreszcens jel alapján elkülönítettük a CD44^{magas} és CD44^{alacsony} sejteket, majd megmértük ezen sejtek K^+ -ionáramait.

Az áramsűrűséget úgy számítottuk ki, hogy a teljes-sejt csúcsáramokat elosztottuk a sejtkapacitás értékével. A limfociták kapacitása 2-9 pF között változott. A T-limfociták teljes-sejt elektrofiziológiai mérése Axon Instruments Digidata 1440 adatgyűjtő (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) alkalmazásával Axopatch-200B erősítővel történt. Az adatgyűjtés és analízis céljából a pClamp10 szoftvercsomagot (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) használtuk. Az RA-FLS-ek kapacitása 9 és 17 pF között volt. Az RA-FLS-k és az OA-FLS-ek eredményeit Igor Pro szoftverrel (WaveMetrics, Oswego tó, OR) elemeztük az méréseket követően.

III.6.1. A Kv1.3 biofizikai tulajdonságainak vizsgálata

A Kv1.3 ioncsatorna aktivációs és inaktivációs kinetikájának vizsgálatához a sejteket a -120mV-os tartófeszültségről +50mV-ra depolarizáltuk. Az egyes protokollok időtartama az aktivációs kinetika vizsgálatokor 15 ms, míg az inaktivációs kinetika vizsgálatokor 2000 ms volt. Az aktivációs időállandó meghatározásához a kapott áramgörbét a Clampfit szoftver felhasználásával az úgynevezett n^4 modell felhasználásával illesztettük: $I(t) = I_a \times (1 - \exp(-t/\tau_a))^4 + C$, ahol $I(t)$ a t időpontban mérhető áram, I_a a protokoll során mért áram amplitúdója, τ_a az aktivációs kinetikát jellemző időállandó, C pedig a -120 mV-on mért áram amplitúdója. Az inaktivációs kinetika vizsgálata során kapott áramgörbék leszálló szárát egy exponenciális függvény segítségével illesztettük: $I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_i) + C$, ahol $I(t)$ az illesztés kezdetétől számított t időpontban mérhető áramerősség, I_0 az inaktiválódó komponens amplitúdója, τ_i az inaktivációs időállandó, C pedig az egyensúlyi áram nagysága a depolarizáció végén.

III.6.2. Ioncsatorna-gátlók alkalmazása

Az RA-FLS-eken expresszált KCa1.1 csatornák farmakológiai karakterizálása érdekében többi ioncsatorna-modulátort alkalmaztunk. A LCA csak akkor növeli a KCa1.1 ionáramot, ha a csatornához $\beta 1$ alegység társul. A LCA törzsoldatát dimetil-szulfoxid (DMSO) és 70%-os etanol 1:10 arányú elegyből állítottuk elő. Az AA csak akkor növeli meg a KCa1.1-áramokat, ha a csatornához $\beta 2$ vagy $\beta 3$ alegység társul. A paxilline (Fermentek, Jeruzsálem, Izrael) blokkolja a KCa1.1 csatornákat függetlenül a β alegység expressziójától. A ChTx blokkolja az összes KCa1.1 csatornát, kivéve ha ahhoz $\beta 4$ alegység társul. A modulátorok törzsoldatait közvetlenül felhasználás előtt hígítottuk külső oldattal úgy, hogy a perfúzióban alkalmazott oldatok DMSO-koncentrációja ne haladja meg a 0,05 %-ot.

III.7. RT-qPCR és Western Blot

III.7.1. RT-qPCR

RNS izolálásához 5×10^5 sejtől indultunk ki, majd 1 x HBSS-sel történő mosást követően izoláltunk RNS-t TRIzol (Life Technologies) reagens alkalmazásával. A reverz transzkripciót Superscript III reverz transzkriptázzal és random hexamer primerekkel (Life Technologies) végeztük, a gyártó előírásai szerint. Az így kapott cDNS mintát templatként használtuk fel RT-qPCR reakcióinkhoz. Az amplikonok méretei minden esetben 70 és 250 bp közöttiek voltak. A qPCR-reakciókat 10 μ l végtérfogatban végeztük a következő összetevőkkel: hígított cDNS (1:10) 4 μ l; primerek (2,5-2,5 μ M), 6 μ l iTAQ SYBR Green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). A reakciókat ViiA™ 7 valós idejű PCR-rendszerben (Life Technologies) futtattuk. A futtatási körülmények: 20s 95 °C-on; 40 ciklus: 95 °C-on 1s, 60 °C 20s, 95 °C 15s, 60 °C 1 percig, és 60 °C-ról gradiens 95 °C-ra 15 percig. Az eredményeket a ViiA™ 7 szoftver segítségével elemeztük.

III.7.2. Western Blot

Az RA-FLS-eket 1% proteázinhibitort tartalmazó RIPA pufferben lizáltuk. A fehérjekoncentrációt Bradford-próbával mértük meg. Minden kísérlethez azonos mennyiségű fehérjét (20 μ g) választottunk el SDS-PAGE technikával, majd nitrocellulóz membránokra (Bio-Rad) vittük át a gyártó útmutatásai szerint. A blotokat egy éjszakán át inkubáltuk blokkoló oldatban, amely 4% Blotto zsírmentes tejből (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) állt. A blotokat a humán KCa1.1 csatorna α és β alegységeire specifikus antitestekkel jelöltük.

Minden elsődleges antitestet 1:500 arányban hígítottunk blokkoló oldatban. Kontrollként anti-aktin antitesteket használtunk. Egy éjszakán át tartó inkubálást, majd 2 óra mosást követően IR-680 vagy IR-800 szekunder antitestekkel jelöltünk 1 órán át szobahőmérsékleten. A membránokat háromszor 15 percig mossuk PBS + 0,1% Tween-20 oldattal. Li-Cor Odyssey szkennelvel alkottunk képet a blotjainkról, majd az ImageJ szoftverrel értékeltük ki azokat.

III.8. RA-FLS-k géncsendesítése

Az RA-FLS-eket szérumentes tápközegekben inkubáltuk 24 órán át az siRNS kezelések előtt. Vizsgálatainkhoz GAPDH-, KCNMB1- vagy KCNMB3-specifikus kis interferáló RNS (siRNS) három különböző konstruktját kevertük össze DharmaFect transzfekciós reagenssel (Dharmacon, Lafayette, CO), majd ezeket hozzáadtuk 80%-os konfluenciájú sejteket tartalmazó 35 mm-es Petri-csészékhez a gyártó utasításai szerint. A sejteket 40-80 órán keresztül használtuk fel elektrofiziológiai, áramlási citometriás és transzwell inváziós kísérletekhez.

III.9. Transzwell inváziós esszé

Az FLS-k *ex vivo* invazivitását transzwell rendszerben határoztuk meg, kollagéndús Matrigel-bevonatú inzertereket (BD Biosciences) alkalmazva. Az inváziós esszéket triplikátumokban végeztük a gyártó utasításai szerint. A kísérlet kezdetén az FLS-k a Matrigél bevonaton helyezkedtek el, és szérumentes tápoldatot tartalmazó inzer felől próbáltak a tápedény alját elérni, ami szérumot tartalmazott. Ehhez meg kellett emészteniük a Matrigélt, továbbá migrálniuk is kellett a tápedény alja felé, viszont az inzer alján található sűrű szűrőn fennakadtak. A kísérlet 24. órájában finoman eltávolítottuk a gélt és kristály-ibolya festést követően megszámoltuk, hány sejt jutott el az inzer aljáig.

III.10. Statisztika

Eredményeink összegyűjtéséhez és statisztikai értékeléséhez a Microsoft Office Excel 2007, SigmaPlot 12.0 és a GraphPad Prism 5 programot használtuk. Statisztikai tesztként egyszempontú varianciaanalízist (ANOVA) és a poszt-hoc tesztként Holm-Sidak tesztet alkalmaztunk a kontrollsejtek és a különböző csoportok összehasonlítására. Továbbá amikor az adatok nem követték a normális eloszlást, mint például a heterogén RA-FLS populációk

esetében, nem-parametrikus ANOVA-t végeztük eredményeink statisztikai szignifikanciájának kiszámítására, amit a Dunn-féle poszt-hoc teszt követett.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. A kationcsatorna-gátlók T-limfocitákon kifejtett antiproliferatív hatása függ a mitogénstimuláció mértékétől

IV.1.1. A mitogénindukált proliferáció és annak dózisfüggése

Először azt határoztuk meg, hogy a T-limfocita aktiváció melyik módszerét követi a leghomogénebb ioncsatorna-expresszió. Ezért teljes-sejt patch-clamp technikával megmértük a Kv1.3 ionáramokat és az áramsűrűséget mind PHA kezelést; PMA és ionomicin kezelést; anti-CD3 kezelést; és anti-CD3 és anti-CD28 kombinációs kezelést követően. Minden kezelés esetében az osztódási index $> 80\%$ volt. Eredményeink azt mutatják, hogy mind a PHA, mind az anti-CD3 és anti-CD28 stimuláció a Kv1.3 áramsűrűségének szignifikáns emelkedéséhez vezetett, azonban a PHA esetében a populáció rendkívül heterogén lett ionáram szempontjából a többi stimulációs móddal szemben.

Miután megválasztottuk a stimuláció módját, a következő lépés az volt, hogy szelektíven stimuláljuk a T-limfocitákat anti-CD3 és anti-CD28 monoklonális antitestekkel. A stimulált PBMC-populációk OI-jeit összehasonlítva a mitogénstimulust követő ötödik napon a mitogénhatás négy szintjét különböztettük meg. Az átlagos OI $30,6 \pm 4,8\%$ volt alacsony (200 ng / ml vagy 1 gyöngy: 200 sejt), $60,8 \pm 4,5\%$ volt közepes (500 ng / ml vagy 1 gyöngy: 50 sejt), $72,7 \pm 1,5\%$ volt magas (1 μg / ml vagy 1 gyöngy: 25 sejt), illetve $85,3 \pm 2,4\%$ volt nagyon magas (3 μg / ml vagy 1 gyöngy: 1 sejt) mitogénkoncentrációk alkalmazásakor. A legjelentősebb különbséget – ahogy várható – a mitogén alacsony koncentrációja és nagyon magas koncentrációja között találtuk. A megfigyelt OI-k statisztikai összehasonlítása is szignifikáns növekedést mutatott a mitogénkoncentrációk növelésével.

IV.1.2. Az ioncsatorna-blokkolók és a rapamicin limfocita proliferációt gátló hatása

Az ioncsatorna-inhibitorok sejtproliferációra gyakorolt hatását az adott csatornán minden gátlószer esetén a hatóanyag disszociációs konstansának megfelelő koncentrációban ($1 \times K_d$) és 10-szeres koncentrációban ($10 \times K_d$) vizsgáltuk. A CFSE hígulási esszé kimutatta, hogy a Kv1.3 K^+ csatorna blokkoló AnTx $10 \times K_d$ koncentrációban gátolta a proliferációt, amikor a sejteket alacsony mitogénkoncentrációnál stimuláltuk. Az OI-k normalizálását követően kvantitatív analízist végeztünk, amely szerint az AnTx $1 \times K_d$ és $10 \times K_d$ koncentrációban alacsony mitogénkoncentrációban szignifikánsan gátolták a sejtosztódást, de

nagyon magas mitogénkoncentrációnál eltűnt a proliferációt gátló hatás. A KCa3.1 inhibitor TRAM-34 koncentrációtól függetlenül önmagában kevésbé hatott a T-sejtek proliferációjára. Az OI-k statisztikai analízise azt mutatta, hogy a TRAM-34 nem gátolta a sejtproliferációt sem $1 \times K_d$, sem $10 \times K_d$ koncentrációban, függetlenül a mitogénkoncentrációtól. A CRAC csatornát gátló 2-Apb $10 \times K_d$ koncentrációban alacsony mitogénstimuláció esetén gátolta a sejtproliferációt, miközben az $1 \times K_d$ koncentrációban hatástalannak bizonyult. Ezt statisztikai analízissel igazoltuk. Nagyon magas mitogénkoncentráció esetén a 2-Apb még $10 \times K_d$ koncentrációban sem tudta gátolni a T-sejtek proliferációját. Az mTOR inhibitor rapamycin mind az $1 \times IC_{50}$, mind a $10 \times IC_{50}$ koncentrációban alkalmazva jelentősen gátolja az alacsony mitogénkoncentrációval stimulált T-sejtek proliferációját. Az AnTx és a 2-Apb ioncsatorna-gátlókkal ellentétben a rapamicin nagyon magas mitogénkoncentráció mellett önmagában is hatékonyan gátolta a limfociták proliferációját. Amennyiben az összes ioncsatorna-blokkolót kombinációban alkalmaztuk $10 \times K_d$ koncentrációban, a sejtproliferáció szignifikáns gátlását tapasztaltuk. Ha emellett rapamicinnel kombináltuk az ioncsatorna-blokkolókat, a kezelés a sejtosztódás teljes gátlását eredményezte. Az utóbbi esetben a proliferáció nem különbözött szignifikánsan a mitogénnel nem kezelt negatív kontrollcsoporttól.

A fenti adatok azt mutatták, hogy a Kv1.3-blokkoló AnTx és a CRAC csatornát blokkoló 2-Apb csak alacsony mitogénkoncentráció mellett gátolták a T-sejtek proliferációját, de hatástalanná váltak, ha a sejteket igen nagy mitogénkoncentrációval stimuláltuk. A jelenség további feltárása érdekében összesen négy mitogénkoncentráció mellett (alacsony, közepes, magas és nagyon magas, lásd fent) részletesen megvizsgáltuk az AnTx hatását $1 \times K_d$ vagy $10 \times K_d$ koncentrációban. $10 \times K_d$ esetén közepes, magas és nagyon magas mitogénkoncentrációkban a proliferáció gátlása nem volt statisztikailag szignifikáns a pozitív kontrollhoz képest, de egyértelműen csökkenő tendenciát mutat a blokkolók hatékonysága a növekvő mitogénkoncentráció függvényében. Ugyanez a tendencia figyelhető meg, ha az AnTx-et $1 \times K_d$ koncentrációban alkalmaztuk. A proliferáció gátlása itt is csak akkor volt statisztikailag szignifikáns, ha alacsony mitogénkoncentrációt használtunk, míg közepes, magas és nagyon magas mitogénkoncentrációknál a proliferáció gátlása nem bizonyult szignifikánsnak.

IV.1.3. Az ioncsatorna-blokkolók és a rapamicin nem csökkentik a limfociták életképességét

Az ioncsatorna-blokkolók és a rapamicin alkalmazásakor a kezelések következtében tapasztalt csökkent proliferációt a sejtek életképességének csökkentése is magyarázhatja. Ezt a kérdést propidium-jodid festéssel vizsgáltuk meg. Az életképességi teszt során a sejtpopulációk

összehasonlítása a várakozásainknak megfelelően azt mutatta, hogy a sejtek mitogénnel történő stimulálása növelte az életképes sejtek arányát. Az életképes sejtek arányát továbbá sem az ioncsatorna-blokkolók, sem a rapamicin önmagában, sem kombinációkban nem változtatta meg.

IV.1.4. Ioncsatorna-gátlók csökkentik a T-lifociták citokinszekrécióját

Az ioncsatorna-blokkolók és a rapamicin által a gyulladásgátló IL-10 és a proinflammatorikus IFN- γ citokinek szekréciójára gyakorolt hatást ELISA módszerrel vizsgáltuk. A nagyon magas koncentrációjú mitogénstimulus 4-szeresére növelte az IL-10, míg 10-szeresére növelte az IFN- γ szekrécióját alacsony mitogénstimulushoz képest. Az IFN- γ és az IL-10-szekréciót mind alacsony, mind nagyon magas mitogénkoncentrációk mellett szignifikánsan gátolták az alkalmazott inhibitorok, és a kezelések alacsony mitogénkoncentráció mellett különösen hatásosak voltak. Nagyon magas mitogénstimuláció esetén az AnTx, a rapamicin, a kombinációs kezelések és a 2-Apb gátolták az IFN- γ szekrécióját. Az IL-10-termelést viszont csak a $10 \times \text{Kd}$ koncentrációban alkalmazott 2-Apb, a rapamicin és kombinációs kezelések gátolták.

IV.2. A KCa1.1 csatornák β alegységei másként fejeződnek ki invazív és noninvazív humán fibroblasztszerű szinoviocitákon

IV.2.1. Az RA-FLS-ek mind mRNS, mind fehérje szinten többféle β alegységet expresszálnak

Az mRNS-szintek qPCR-rel végzett elemzése több KCa1.1 β alegység expresszióját kimutatta RA-FLS-eken, jóllehet a $\beta 2b$ és a $\beta 3d$ esetében nagyon alacsony szinten fejeződtek ki. A KCa1.1 pórusképző α alegységének expressziós szintjéhez viszonyítva a legmagasabb relatív mRNS expressziós szinteket a $\beta 3$ alegység transzkripciós variánsainál ($\beta 3b$, $\beta 3c$ és $\beta 3e$) és a $\beta 4$ alegységnél tapasztaltuk. Mivel az mRNS nem mindig íródik át fehérjévé, Western blot technikát alkalmaztunk a különböző alegységek proteinszintjének meghatározására. A Western blot az összes KCa1.1 β alegységet kimutatta, az aktin kontrollhoz képest változó mennyiségben. A $\beta 3$ alegységet következetesen minden donorban azonosítottuk, míg a $\beta 1$ -, $\beta 2$ - és $\beta 4$ -expresszió csak néhány donor sejtlizátumában volt kimutatható.

IV.2.2. Az RA-FLS-ek KCa1.1 $\beta 1$ vagy $\beta 3b$ alegységeket fejeznek ki plazmamembránjukon

A KCa1.1 pórusképző α alegységét mind az RA-FLS-ek plazmamembránjában, mind magjában detektáltuk. Mivel ebben a kísérletsorozatban a plazmamembránon expresszált csatornákra koncentráltunk, patch-clamp elektrofiziológiával határoztuk meg a funkcionális β alegységeket az RA-FLS-ek plazmamembránjában. Összesen 51 RA-FLS teljes-sejt áramát mértük meg 5 különböző donorból, ahol összesen 47 (92%) esetben detektáltunk kifelé folyó depolarizációra aktiválódó K^+ -áramot. A paxilline a KCa1.1 β alegység expressziójától függetlenül teljesen blokkolta a K^+ -áramot a vizsgált 14 sejt mindegyikében, igazolván, hogy a megfigyelt K^+ -csatorna KCa1.1 volt. Az elemzett sejtek 70%-ában kis mértékű vagy semmilyen inaktiválás nem volt tapasztalható. Mivel a $\beta 2a$, $\beta 3a$, $\beta 3c$ és $\beta 3e$ alegységek mindegyike képes inaktiválni a KCa1.1-et, az inaktiválás hiánya azt sugallja, hogy ezek az alegységek nem kapcsolódnak a KCa1.1 csatornához RA-FLS-ek esetén.

Az RA-FLS-k KCa1.1 csatornához kapcsolódó β alegységek további azonosítása érdekében olyan KCa1.1 agonistákat és antagonistákat alkalmaztunk, amelyekről ismert, hogy hatással vannak a csatornára a β alegység kompozíciójától függően. Először megvizsgáltuk a ChTx hatásait RA-FLS-ek K^+ -áramaira, mivel ez a gátlószer csak $\beta 4$ hiányában gátolja a KCa1.1 csatornákat. A ChTx gátolta a 100 nM áramot az összes vizsgált sejtben, ami azt mutatja, hogy a $\beta 4$ alegységek nem kapcsolódnak hozzá az RA-FLS-ek KCa1.1 csatornához. Ezután megvizsgáltuk a LCA hatását, ami csak a $\beta 1$ alegységek jelenlétében aktiválja a KCa1.1 csatornákat. A LCA hatása a sejtek 36%-ánál volt megfigyelhető, ami azt mutatja, hogy a KCa1.1 csatornák az RA-FLS-ek körülbelül harmadában $\beta 1$ alegységekhez társulnak. Az RA-FLS-k fennmaradó részében a β alegység azonosítására AA-t használtunk, amely ismert módon növeli a KCa1.1 áramokat a $\beta 2$ és $\beta 3$ alegységek jelenlétében. Ezt a hatást a vizsgált sejtek 65%-ában figyelték meg. Mivel a fenti kinetikai adatok alapján már kiszűrtük a $\beta 2a$, $\beta 3a$, $\beta 3c$ vagy $\beta 3e$ alegységek lehetőségét, az AA-val kapcsolatos eredményeink azt sugallják, hogy az RA-FLS többsége expresszál vagy $\beta 3b$, vagy $\beta 3d$ alegységet. A $\beta 3$ ezen két transzkripciós változatának megkülönböztetésére Western blot analízist végeztünk kétféle antitest felhasználásával. Az első ellenanyag a $\beta 3$ alegységnek egy konzervált régiójához kapcsolódik, amely mind az 5 transzkripciós variáns esetében közös. A második ellenanyag a $\beta 3$ N-terminusát érzékeli, ami a rövid $\beta 3b$ -n kívül minden $\beta 3$ variánst detektál; ez az antitest nem mutatott olyan sávot, amely azt jelzi, hogy az RA-FLS-ek a KCa1.1 $\beta 3b$ alegységét expresszálják. Mivel a $\beta 1$ lassítja, míg a $\beta 3b$ nem befolyásolja a KCa1.1 aktivációs kinetikáját (τ_{Act}), ezen kinetikát mértük RA-FLS-ben, hogy megerősítsük eredményeinket. A τ_{Act} -ban kifejezett szórást tapasztaltunk, és a vizsgált 54 sejtől csak 17 (31%) sejtél hosszabb a τ_{Act} 4

ms-nál, míg 69%-nál a $\tau_{\text{Act}} \leq 4$ ms. Ez az eredmény megerősíti azt a megállapítást, hogy a különböző RA-FLS különböző β alegységeket expresszál.

IV.2.3. A KCa1.1 $\beta 3b$ expressziója korrelál a magasabb KCa1.1 α - és CD44-szintekkel

RA-ben megfigyelték a CD44, egy I. típusú transzmembrán glikoprotein expresszióját, amely a hialuronánnal és más extracelluláris és sejtfelületi ligandumokkal lép kapcsolatba FLS-eken és egyéb sejteken. Érdekes módon az emelkedett CD44-expresszió összefügg a ráksejtek fokozott invazivitásával. Annak megállapítására, hogy a $\beta 1$ vagy $\beta 3$ alegységek expressziója összefügg a CD44 expressziós szintekkel és az invazivitással RA-FLS-ben, először a KCa1.1 α - és a CD44-expressziója közötti összefüggést vizsgáltuk meg. Először áramlási citometriát alkalmaztunk a CD44^{magas} és a CD44^{alacsony} RA-FLS-ek szortolásához, majd inváziós esszéket végeztünk. A CD44^{magas} RA-FLS-ek szignifikánsan invazívabbak volt, mint a CD44^{alacsony} sejtek. Ezután a sejteket anti-CD44 antitestekkel festettük és teljes-sejt patch-clamp méréseket végeztünk a K^+ -áramsűrűség és aktivációs kinetika vizsgálatára CD44^{magas} és CD44^{alacsony} sejteken. A CD44^{magas} RA-FLS-ek nagyobb áramsűrűséget és gyorsabb aktivációs sebességet mutattak, mint a CD44^{alacsony} sejtek, ami azt sugallja, hogy a CD44^{magas} sejtek $\beta 3b$ alegységet expresszálnak.

Ezeket az eredményeket megerősítettük az AA és LCA két sejtcsoportra gyakorolt hatásának felmérésével. Itt a CD44^{magas} sejtek teljes-sejt ionáramai AA-ra kimondottan érzékenyek voltak, míg az LCA nem hatott rájuk. Ezzel szemben a CD44^{alacsony} sejtek érzékenyek voltak LCA-ra, de AA-ra nem. Kontrollként OA-ban szenvedő betegekből izolált minimálisan invazív FLS-eket használtunk. Az OA-FLS-ek alacsony áramsűrűséget mutattak, lassú volt az aktivációs kinetikájuk, illetve érzékenyek voltak LCA-ra, de AA-ra nem, hasonlóan a CD44^{alacsony} RA-FLS-ekhez.

IV.2.4. A KCa1.1 $\beta 3$ alegységének csendesítése csökkenti a KCa1.1 pórusképző alegységének sejtfelszíni expresszióját

Vizsgálatainkban a $\beta 3$ alegység génexpresszióját szelektíven gátoltuk siRNS-sel. A teljes-sejt patch-clamp tesztekben a $\beta 3$ -csendesített RA-FLS kevésbé volt érzékeny a $\beta 3$ -agonista AA-ra, viszont a kontroll siRNS nem befolyásolta az AA hatását az ionáramokra. Sem a kontroll, sem a $\beta 3$ siRNS nem befolyásolta a teljes-sejt ionáramok válaszát az LCA-ra, ami bizonyítja, hogy a csendesítés nem hatott a $\beta 1$ alegységekre. Az áramlási citometriás mérések

azt mutatták, hogy a $\beta 3$ csendesítés a KCa1.1 α alegység expressziójának 20%-os csökkenését indukálta. Ezenkívül a teljes KCa1.1 áramsűrűség az 50 mV feletti feszültségeknél szignifikánsan csökkent a KCa1.1 $\beta 3$ alegység csendesítése után, ami a KCa1.1 α alegységének alacsonyabb sejtfelszíni expresszióját sugallja.

IV.2.5. *A KCa1.1 $\beta 3$ alegységének csendesítése csökkenti az RA-FLS ex vivo invazivitását*

A KCa1.1 α alegység expressziójának vagy működésének gátlása csökkenti az FLS-ek invazivitását. Ezért megvizsgáltuk a KCa1.1 $\beta 1$ és $\beta 3$ alegységeinek hatását az RA-FLS-ek invazivitására Matrigel inváziós esszével. A KCa1.1 $\beta 1$ alegységének csendesítését követően a teljes-sejt ionáram kevésbé lett érzékeny a LCA-ra, míg a kontroll siRNS nem befolyásolta az LCA-ra adott RA-FLS választ. Eredményeink szerint a $\beta 3$ siRNA csökkentette az RA-FLS-ek invazivitását, míg a KCa1.1 $\beta 1$ alegységének elcsendesítése nem befolyásolta azt.

V. EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSA

V.1. A kationcsatorna-gátlók T-limfocitákon kifejtett antiproliferatív hatása függ a mitogénstimuláció mértékétől

A megváltozott T-sejt-homeosztázis szerepet játszik az autoimmun betegségek, például a szklerózis multiplex patogenezisében. Az antiproliferatív hatások maximalizálása és a potenciális mellékhatások csökkentése érdekében a gyakorlatban az immunszuppresszív gyógyszereket általában kombinációkban alkalmazzák. Sajnos a kombinációs kezelést megalapozó farmakodinamikai ismereteink mind a hagyományos, mind a modern immunszuppresszív gyógyszerekkel, például az ioncsatorna-blokkolókkal is igen hiányosak. Kísérleteinkben több szempontból közelítettük meg ezt a problémát, és feltérképeztük a rapamicin és az ioncsatorna-blokkolók kombinációs alkalmazásának esetleges előnyeit.

A ioncsatorna-blokkolók hatásai a T-sejt-funkciókra már régóta ismertek. Azonban legjobb tudásunk szerint tanulmányunk előtt nem álltak rendelkezésre adatok a Kv1.3, KCa3.1 és CRAC csatornablokkolók antiproliferatív hatásairól egyedüli vagy kombinációs kezelésben, azonos kísérleti körülmények között. Továbbá az ioncsatorna-inhibitorok és az mTOR inhibitor rapamicin közötti szinergiát sem vizsgálták eddig.

A legérdekesebb eredményünk az volt, hogy a mitogénkoncentráció növelése jelentősen csökkentette az ioncsatorna-blokkolók antiproliferatív hatását, amely végül teljesen el is tűnt, amikor a mitogént nagyon nagy koncentrációban alkalmaztuk. Magyarázatként szolgálhat, hogy alacsony mitogénkoncentrációk esetén kevés, kezdetben erősen lokalizált Ca^{2+} jel alakul ki, és ezt az ioncsatornák gátlása könnyen elnyomja. Nagyon magas mitogén koncentráció esetén azonban, amikor aktív a legtöbb TCR, a többi jelátviteli útvonal aktivitása mellett az ioncsatornák nagyon alacsony hányada elegendő lehet az aktivációs kaszkád fenntartásához. Továbbá azt is ésszerű feltételezni, hogy ioncsatorna-gátlók jelenlétében a limfociták más, Ca^{2+} -független aktivációs útvonalakat helyeznek előtérbe. Mint számos intracelluláris jelátviteli útvonal, az mTOR aktiváció sem érint lényegében ioncsatornákat, és ezek a folyamatok hangsúlyosabbá válhatnak nagyon magas mitogénkoncentrációk alkalmazásakor. Nagyon magas mitogénkoncentrációk esetén proliferációgátlást csak rapamicinnel vagy annak más ioncsatorna-blokkolókkal való kombinációjával értük el. Ez azt jelzi, hogy a rapamicin együttes használata ioncsatorna-blokkolókkal egy működőképes terápiás megközelítés lehet.

Továbbá az ioncsatornainhibitorok mind alacsony, mind nagyon magas mitogénkoncentráció esetén gátolták a citokinszekréciót. Ezen különbségek alacsony mitogénkoncentráció mellett vélhetően biológiailag is jelentősek. Ezzel szemben nagyon magas

mitogénkoncentrációk esetén az IFN- γ fennmaradó koncentrációja még mindig a ng/ml koncentráció tartományban maradt, és ez még bőven elegendő a sejtproliferáció elősegítésére.

Emellett a T-sejtek proliferációját és a citokinek termelését is a rapamicin gátolta leginkább, és ezt a hatást még tovább fokozta a kationcsatorna-blokkolókkal való kombinációja. Ez utalhat Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -független jelátviteli útvonalak additív hatására a T-sejtek aktiválásában. Végül azt tapasztaltuk, hogy a mitogén antitestek koncentrációjának növelésével az ioncsatorna-blokkolók antiproliferatív hatása fokozatosan gyengült. Ez a jelenség az aktivált T-sejtek egy mindezidáig még ismeretlen jelátviteli sajátosságának tulajdonítható, amelyet a jövőben még érdemes tisztázni. A rapamicin és az ioncsatorna-blokkoló in vitro kombinációban elért hatékonysága további in vivo kísérleteket szükségességére hívja fel a figyelmet, ahol szintén várható, hogy a kombinációs kezeléssel kedvező eredményeket lehet elérni.

V.2. A KCa1.1 csatornák β alegységei másként fejeződnek ki invazív és noninvazív humán fibroblasztszerű szinoviocitákon

A KCa1.1 csatorna egy kecsegtető terápiás alternatíva lehet RA kezelésére. Azonban a csatorna pórusképző alegységének széleskörű szöveti eloszlása kizárja az antagonisták használatát, mivel súlyos mellékhatások jelentkezhetnek több létfontosságú szervrendszerben. A KCa1.1 amiatt tekinthető továbbra is kedvező célpontnak, mivel a KCa1.1 szabályozó β alegységei korlátozottan fordulnak elő az emberi szövetekben. Ebben a kísérletsorozatban bizonyítottuk, hogy az RA-FLS plazmamembránjában a KCa1.1 $\beta 1$ és $\beta 3$ alegysége is megtalálható, és a $\beta 3b$ expresszió magasabb a CD44^{magas} RA-FLS-eken, és korrelál a KCa1.1 α magasabb expressziós szintjével. A $\beta 3$ csendesítése jelentősen csökkentette az RA-FLS-ek invazivitását, továbbá csökkentette a KCa1.1 α kifejeződését.

A qPCR-vizsgálat a legtöbb β alegység expresszióját kimutatta az RA-FLS-eken mRNS szintjén, illetve Western blot technikával is több β alegységet detektáltunk. A járulékos β alegységek expressziós szintje alacsonyabb volt, mint az α alegységé, ezért valószínű, hogy mindegyik KCa1.1 tetramerhez kevesebb mint 4 β alegység társul. Az RA-FLS KCa1.1 áramait jellemző biofizikai tulajdonságok és farmakológiai profil teljes-sejtes elektrofiziológiai módszerrel történt meghatározása bebizonyította a funkcionális $\beta 1$ és $\beta 3$ alegységek funkcionális expresszióját a plazmamembránban. Farmakológiai eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a RA-FLS-ek többsége főként funkcionális KCa1.1 α és $\beta 3$ alegységeket expresszál. A különböző $\beta 3$ epitópokra specifikus antitesteket alkalmazó Western blotok azt mutatják, hogy az RA-FLS-ek a $\beta 3b$ izoformát fejezik ki. A $\beta 3$ alegység csendesítése

csökkentette a KCa1.1 α expressziós szintjét, és csökkentette a K^+ -áramsűrűségét, ami azt sugallja, hogy a $\beta 3$ részt vehet a csatorna sejtfelszíni expressziójának szabályozásában.

Az RA-FLS által expresszált α és $\beta 3$ alegységekből álló KCa1.1 csatorna vonzó terápiás célpont az RA számára. A KCa1.1 $\beta 3$ mRNS szinten is csak nagyon alacsony mennyiségben expresszálódik az emberi szövetekben, azok közül is leginkább a herékben fejeződik ki. Mivel az RA prevalenciája magasabb a nőknél, mint a férfiaknál, a betegek többségének egyáltalán nem kellene aggódnia a lehetséges mellékhatások miatt. Ezenkívül a heréket a vér-here gát védi a különböző xenobiotikumoktól. Tehát lehetőség szerint olyan KCa1.1 blokkolót érdemes tervezni, amely bejut a gyulladt ízületbe, de nem tudja átlépni a vér-here gátat. Emellett elképzelhető, hogy a KCa1.1 $\alpha\beta 3$ komplexet szelektíven peptidekkel kezeljük, vagy jelenleg ismert KCa1.1-blokkoló peptideket úgy módosítsunk, hogy fokozzák ezeknek a szereknek a KCa1.1 $\alpha\beta 3$ -mal szembeni affinitását.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Az ioncsatornák a gyulladásos folyamatok kulcsfontosságú szereplői mind T-limfocitákon, mind pedig RA-FLS-eken. További ismeretek szükségesek a fenti témával kapcsolatosan, hogy képesek legyünk autoimmun betegségeket ioncsatorna-gátlószerekkel kezelni.

Többek között nem volt világos, hogyan függ össze az ioncsatorna-gátlás a sejtproliferáció gátlásával, mivel a szakirodalom nagymértékű szórást mutatott ezen adatokban. Eredményeink azt mutatták, hogy az ioncsatorna-blokkolók és a rapamicin dózisfüggő módon gátolják a T-sejtek citokinszekrécióját és osztódását, miközben nem csökkentik ezen sejtek életképességét. Legfontosabb megállapításunk az volt, hogy a mitogénstimulus mértékének növelésekor az ioncsatorna-gátlók antiproliferatív hatása csökkent, és nagyon magas koncentrációban el is tűnt. Ezt a proliferációt gátló hatást vissza lehetett állítani oly módon, hogy az ioncsatorna-blokkolókat egyéb anyagokkal, például mTOR gátló rapamicinnel kombináltuk. Eredményeink tehát szinergiát mutattak a különböző aktivációs utak között, és további in vivo kísérletek szükségesek, hogy az együttes kezelés előnyeit autoimmun betegségekben fel lehessen mérni.

Ezen túlmenően a reumatoid arthritisben ioncsatorna-gátlással járó új terápiás lehetőségek tekintetében bővítettük ismereteinket. Mivel az RA-FLS-ek, a RA-ben a porc pusztulásáért felelős fő effektor sejtek K^+ csatornaként főként a KCa1.1 csatornát fejezik ki, ezek a csatornák vonzó célpontok a RA kezelésében. Mivel a pórusképző alegység mindenütt jelen van az emberi szervezetben, a szövetileg behatárolt járulékos alegységek a legmegfelelőbb célpontok ezen csatornák blokkolásában, hogy kiküszöböljük a lehetséges jelentős mellékhatásokat. A RA-FLS-ekben KCa1.1 $\beta 1$ és $\beta 3$ szabályozó alegységeket azonosítottuk. A KCa1.1 $\beta 3$ alegységet a sejtek túlnyomó többsége expresszálta, és erősen invazív CD44^{magas} RA-FLS-sel társult, míg a minimálisan invazív CD44^{alacsony} RA-FLS-ek $\beta 1$ alegységet, vagy semmilyen β -t se fejeztek ki. Továbbá azt mutattuk ki, hogy a $\beta 3$ alegység siRNS-sel történő csendesítésével csökkent a KCa1.1 csatorna sűrűsége az RA-FLS membránjában, és csökkent az RA-FLS invazivitása. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az RA-FLS α és $\beta 3$ alegységéből álló KCa1.1 csatorna vonzó terápiás célpont RA-ben, és a jövőben erőfeszítésekre van szükség egy specifikus KCa1.1. $\beta 3$ -inhibitor kifejlesztéséhez.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az ioncsatornák funkcionális szerepe mind fiziológiás, mind kóros immunfolyamatokban számottevő, és betegségek új terápiás lehetőségeként kiemelt jelentőségűek lehetnek e fehérjék.

A kísérleti munkát a TÁMOP-4.2.2.A-11/1-KONV / 2012-0025 projekt és a Baylor College of Medicine finanszírozásával végezték. A doktori képzési programját támogatta a Campus Magyarországi Ösztöndíj és a Magyar Nemzeti Kiválósági Program. Ezt a kutatást az Európai Unió és a magyar állam támogatta, amelyet az Európai Szociális Alap társfinanszírozott a TÁMOP 4.2.4 keretében. A / 2-11-1-2012-0001 'és KTIA_NAP_13-2-2015-0009. Végül a munkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00015 projekt támogatta. A projektet az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozza.

VI. PUBLIKÁCIÓK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/271/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pethő Zoltán
Neptun kód: JOG5ED
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10043198

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pethő, Z.**, Tanner, M. R., Tajhya, R. B., Huq, R., Laragione, T., Panyi, G., Gulko, P. S., Beeton, C.: Different expression of [béta] subunits of the KCa1.1 channel by invasive and non-invasive human fibroblast-like synoviocytes.
Arthritis Res. Ther. 18 (1), 103, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-016-1003-4>
IF: 4.121
2. **Pethő, Z.**, Balajthy, A., Bartók, Á., Bene, K., Somodi, S., Szilágyi, O., Rajnavölgyi, É., Panyi, G., Varga, Z.: The anti-proliferative effect of cation channel blockers in T lymphocytes depends on the strength of mitogenic stimulation.
Immunol. Lett. 171, 60-69, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.02.003>
IF: 2.86





További közlemények

3. Pajtás, D., Kónya, K., Kiss-Sziksai, A., Džubák, P., **Pethő, Z.**, Varga, Z., Panyi, G., Patonay, T.:
Optimization of the Synthesis of Flavone-Amino Acid and Flavone-Dipeptide Hybrids via
Buchwald-Hartwig Reaction.
J. Org. Chem. 82 (9), 4578-4587, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.7b00124>
IF: 4.849 (2016)
4. Balajthy, A., Somodi, S., **Pethő, Z.**, Péter, M., Varga, Z., Szabó, G., Paragh, G., Vigh, L., Panyi,
G., Hajdu, P.: 7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell
function in Smith-Lemli-Opitz syndrome.
Pflugers Arch. 468 (8), 1403-1418, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-016-1851-4>
IF: 3.156
5. Somodi, S., Balajthy, A., Szilágyi, O., **Pethő, Z.**, Harangi, M., Paragh, G., Panyi, G., Hajdu, P.:
Analysis of the K⁺ current in human CD4⁺ T lymphocytes in hypercholesterolemic state.
Cell. Immunol. 281 (1), 20-26, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.004>
IF: 1.874

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,86

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,981

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

Debrecen, 2017.09.01.

