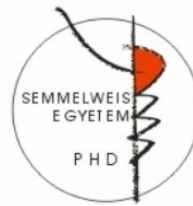


Doktori tézisek

NITROGÉN-MONOXID SZEREPE T LIMFOCITA  
AKTIVÁCIÓBAN

**Dr. Koncz Ágnes**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Buzás Edit egyetemi docens,  
orvostudományok doktora  
Hivatalos bírálók: Dr. Bajtay Zsuzsanna Ph.D.,  
tudományos munkatárs  
Dr. Igaz Péter Ph.D., egyetemi tanársegéd  
Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Füst György  
egyetemi tanár, orvostudományok doktora  
Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Sipka Sándor  
egyetemi tanár, orvostudományok doktora  
Dr. Pállinger Éva  
Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest

**2008.**

## BEVEZETÉS

### *T limfociták jellemzői és aktivációja*

T limfociták központi szerepet játszanak az adaptív immunválaszban. A sejt felszínükön expresszálandó T sejt receptor (TCR) az antigén prezentáló sejt (APC) felszínén expresszálandó fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) által bemutatott antigénepitőp specifikus felismerésére képes. T limfociták érése a thymusban történik, melynek során az autoreaktív T limfociták kiszelektálódnak.

Az antigén kötődése a T sejt receptorhoz (TCR) Lck és Fyn tirozin kinázok aktiválásához vezet. Ezen tirozin kinázok felelősek a TCR  $\zeta$  lánc és a CD3 alegység foszforilációjáért, melyek ilyen formában a  $\zeta$ -associated protein-70 (ZAP-70) molekulát képesek lehorgonyozni és ezáltal aktiválni. A ZAP-70 protein foszforilálja a 'linker for activation of T cells' (LAT) proteint, mely direkt módon kötődik többek között a foszfolipáz C- $\gamma$ 1-hez. A foszfolipáz C- $\gamma$ 1 katalizálja a foszfatidol-inozitol-4,5-bifoszfát hidrolízisét inozitol-1,4,5-trifoszfáttá (IP3) és diacilglicerollá (DAG). Az IP3 kötődése belső  $\text{Ca}^{2+}$  raktárakon lévő receptorához,  $\text{Ca}^{2+}$ -ot mobilizál, létrehozva ezzel a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált. A DAG protein kináz-C aktivációt okoz. Ezek a útvonalak továbbiakban transzkripciós faktorok aktiválásáért, citokintermelés beindításáért, T sejt proliferációért felelősek. A T sejt aktivációhoz azonban a T sejt receptor (TCR) által közvetített folyamat mellett kostimulációs szignálokra (CD28, CD40 ligand, LFA-1, CD2) is szükség van.

### *Nitrogén-monoxid*

A nitrogén-monoxid (NO) fontos intra-, trasz- és intercelluláris hírvivő molekula mely számos fiziológiás és patológiás folyamatban szerepet

játszik. A NO egyik legjobban ismert funkciója az értónus szabályozása, vazodilatációt okoz, növeli az oxigén szükségletet.

Szervezetünkben NO L-argininből képződik, nitrogén monoxid szintetáz (NOS) enzimek által katalizált folyamatban, melyhez NADPH és tetrahipterin kofaktor jelenléte szükséges. Három NOS izoformát ismerünk: a neuronális NOS-t (nNOS, NOS1), az indukálható NOS-t (iNOS, NOS2) és az endoteliális NOS-t (eNOS, NOS3). Az eNOS és nNOS folyamatosan expresszálódik, aktivációja Ca-calmodulin függő. Ezek az izoformák felelősek a sejtek kis mennyiségű, alap szintű NO termelésért. Ezzel ellentétben az iNOS működése transzkripciós szinten szabályozott és ez az izoforma nagy mennyiségű NO termelésért felelős. A NO rövid féléletű, (3-15 másodperc) szuperoxiddal ( $O_2^-$ ) reagálva spontán peroxinitritté ( $ONOO^-$ ) alakul. A peroxinitrit maga is oxidálószer, vagy átalakul nitráttá, mely stabil, jól mérhető, a NO termeléssel arányos mennyiségben termelődő vegyület.

Az utóbbi években derült fény arra hogy a NO a mitokondriális légzés fiziológiás szabályozója. Szabályozza a mitokondriumok ATP szintézisét és oxigén felhasználását azáltal hogy alacsony koncentrációban reverzibilisen gátolja a citokróm-c oxidázt. A citokróm-c oxidáz az elektron transzportlánc utolsó enzimje, mely a sejt csaknem teljes oxigén fogyasztásáért felelős. Alacsony koncentrációban a NO az oxigénnel versenyezve reverzibilisen gátolja az enzimet, ATP depléciót okozva.

Ezenkívül a NO a mitokondrium bioszintézis fő regulátora is, hatását a cGMP- függő peroxiszóma proliferator-activating receptor  $\gamma$  coactivator-1 molekulán (PPAR- $\gamma$  coactivator-1) keresztül fejti ki. Jelenlegi ismereteink

szerint a barna zsírsejtek, U937 sejtek, HeLa sejtek és humán limfociták mitokondrium bioszintézise befolyásolható NO-val.

#### *Hisztamin*

A hisztamin ( $\beta$ -imidazolyethylamin) különböző fiziológias folyamatok és patológiás állapotok fontos mediátora. Szerepet játszik az idegrendszer ingerület átviteli folyamataiban, hipofízis hormonok szekréciójában, a gyomor-bélrendszer és a kardiovaszkuláris rendszer működésében. Irodalmi adatok szerint a melanóma sejtek proliferációját közvetlenül befolyásolja, ezáltal hatása van a melanóma progressziójára. Ezenkívül jól ismert immunregulátor, fő mediátora az allergiás reakciónak, részt vesz a fertőzésekben, gyulladásos reakciókban.

Hisztamin L-hisztidinből keletkezik hisztidin dekarboxiláz enzim (HDC) által katalizált folyamatban. A HDC enzim csaknem minden szöveti sejtben expresszálódik, legnagyobb mértékben a hízósejtekben és a bazofil granulocitákban, melyek a hisztamint nagy mennyiségben tárolni is képesek granulumaikban. Számos irodalmi adat utal a hisztamin immunregulációban betöltött szerepére. Különböző kísérletek eredményei a hisztamin mind gyulladást serkentő, mind gyulladást gátló hatását leírják.

A hisztamin receptorok G-protein kapcsolt receptorok, négy típus ismert: H1R, H2R, H3R, H4R. A H1R és H2R stimulációja elsősorban a Gq és Gs proteinek aktivációját, míg a H3R és H4R stimuláció Gi/0 protein aktivációt okoz. A hisztamin egyaránt kialakíthat gátló és serkentő hatást attól függően, hogy milyen típusú hisztamin receptor, milyen mértékben expresszálódik az adott sejtben. A T limfocitákban a H1R által közvetített jelátviteli folyamat a Gq/11 G protein család tagjain keresztül kommunikál a T sejt receptor (TCR) által közvetített jelátviteli folyamatokkal.

## CÉLKITŰZÉSEK

- Célunk volt humán T limfociták CD3/CD28 aktivációra kialakuló intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szignállal párhuzamosan végbemenő NO és ROI termelés mérése illetve a mitokondriális membránpotenciál detektálása és vizsgálata.
- Vizsgáltuk hogy az IP3 receptor antagonistá 2-ABP, a NO kelátor C-PTIO és a szuperoxid dizmutáz gátló MnTBAP önmagában alkalmazva hogyan befolyásolja a CD3/CD28 stimuláció során létrejövő szignálfolyamatokat.
- Választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy a NO donor NOC-18 hogyan befolyásolja az intracelluláris és mitokondriális  $\text{Ca}^{2+}$  szignált, ROI termelést és a mitokondriális hiperpolarizációt.
- Vizsgáltuk melyik NOS izoforma expresszálódik T limfocitákban nyugalmi állapotban illetve CD3/CD28 stimulációra.
- Vizsgáltuk továbbá a NO T sejt aktivációban és citokin termelésben betöltött szerepét olyan genetikailag módosított állatmodellben, melyben hiányzik a T sejt érésben és aktivációban szintén fontos szerepet játszó molekula, a hisztamin.
- Összehasonlítottuk a HDC-KO egér és a vad típusú egerek limfocitáinak citokin- és NO termelését, a Con-A stimulációra fellépő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szignált, a ROI termelést és mitokondriális membránpotenciál változást.
- Mivel szignifikáns eltérést találtunk a HDC-KO és vad típusú egér limfocitáinak  $\text{IFN-}\gamma$  és NO termelésében, megvizsgáltuk hogy a NO és a hisztamin hogyan befolyásolja a sejtek  $\text{IFN-}\gamma$  termelését.

## MÓDSZEREK

### *Humán T limfocita aktiváció mérés*

Humán perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) alvadásgátolt vénás vérből Ficoll-Hypaque grádiensen centrifugálva nyertünk. T sejt aktivációhoz a limfocitákat CD3 ellenes OKT3 monoklonális antitesttel (CRL 8001; American Type Culture Collection, Manassas, VA) előkezelt lemezeken tenyésztettük, a CD28 kostimulációhoz 500 ng/ml monoklonális CD28 antitestet használtunk (BD PharMingen, San Diego, CA). A sejteket a kísérlettől függően 4, 12, 24 vagy 48 órán keresztül stimuláltuk.

### *Hisztidin dekarboxáz génkiütött (HDC-KO) állat*

A genetikailag módosított HDC-KO egértörzset intézetünkkel együttműködésben Ohtsu és társai homológ rekombinációval hozták létre. Kísérleteinkhez 8-10 hetes hím egereket használtunk, melyek legalább két héttel a kísérletek megkezdése előtt hisztamin mentes tápot (Altromin GmbH., Németország) kaptak. Kísérleteinkhez HDC-KO és vad típusú egerek lépéből izolált sejteket használtuk. Bizonyos kísérletekhez az állatokat CFA-val oltottuk, majd kilenc nap elteltével izoláltuk a lépsejteket. A sejtek stimulálásához 2 µg/ml ConA-t használtunk.

### *Áramlási citometriás mérések*

Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció (Fluo-3), NO termelés (DAF-FM), ROI termelés (HE), mitokondriális membránpotenciál (TMRM), intracelluláris IFN-γ (FITC konjugált monoklonális antitest), sejt felszíni CD markerek mérése (CD3-PE, CD8-PerCP, CD45-Per-CP vagy CD25-PerCP-Cy5) BD FACS Calibur készülékeken.

### *Western-blot módszer*

NOS izoformák expresszióját humán perifériás limfocitákban Western-blot módszerrel vizsgáltuk.

#### *ELISPOT módszer*

IFN- $\gamma$ , IL-4 termelés méréséhez a T sejteket egér lépszuszpenzióból negatív szelekcióval mágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotech) szeparáltunk. A vizsgálat 96 lyukú ELISPOT lemezen (MultiScreen; Millipore), anti-IFN- $\gamma$ , vagy anti-IL-10 vagy anti-IL-4 capture monoklonális antitestekkel (Duoset; R&D Systems) és streptavidin-HRP-vel konjugált detektáló antitesttel történt. Az ELISPOT membránon a spot-számot ELISPOT reader (CTL) segítségével határoztuk meg.

#### *Nitrit/nitrát mérés*

A HDC-KO és vad típusú egerektől nyert szérumból nitrát/nitrit meghatározása High-Sensity Nitrit Assay Kitet (Molecular probes) használtunk.

#### *Reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR)*

A lépből teljes RNS-t preparáltuk TRI reagenssel (Sigma- Aldrich), majd random hexamerekkel (Promega) cDNS-be írtuk át. Az RT-PCR reakció során a következő primereket használtuk: egér IFN- $\gamma$  szenz: CCT CAG ACT CTT TGA CT, antiszenz primer: CAG CGA CTC CTT TTC CTC TT, (54°C, 35 ciklus); egér GADPH szenz primer: CTG GTG CTG AGT ATG TCG TG, antiszenz primer: CAG TCT TCT GAG TGG CAG TG (57°C, 30 ciklus). A PCR Perkin-Elmer thermal cycler készüléken végeztük, a PCR terméket 3%-os agaróz gélen futtattuk.

#### *Kvantitatív RT-PCR*

T sejteket az egér lépszuszpenzióból negatív szelekcióval mágneses gyöngyök segítségével (Miltenyi Biotech) szeparáltunk. Az így szeparált

sejtekből RNS-t prepaláltunk Rneasy Mini Kit (Qiagen) felhasználásával. A preparált RNS-t random primerekkel (Promega) cDNS-be írtuk át. A NOS enzim mindhárom izoforma relatív mennyiségének meghatározásához standard TaqMan real-time RT-PCR technikát alkalmaztunk ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) készüléken.

#### *Statisztikai elemzések*

Az eredmények értékeléséhez *Student t tesztet* használtunk, nem parametrikus eloszlást mutató adatok esetén *Mann-Whitney tesztet* alkalmaztuk. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha  $p < 0,05$ .

## EREDMÉNYEK

### *Nitrogén-monoxid szerepének vizsgálata T limfociták aktivációjában*

Humán T limfociták CD3/CD28 antitesttel történő 4 órás és 24 órás stimuláció hatására:

- **Ca<sup>2+</sup> szignál** (4 óránál  $3,9 \pm 0,75$ -szeres Ca<sup>2+</sup>cc. emelkedés  $p=0,001$ ; 24 óránál  $2,77 \pm 0,75$ -szeres Ca<sup>2+</sup>cc. emelkedés  $p=0,0043$  a nyugalmi szinthez képest)
- **mitokondriális membránpotenciál szignál** (4 óránál  $1,73 \pm 0,44$ -szeres membrán-potenciál emelkedés  $p=0,001$ ; 24 óránál  $1,53 \pm 0,17$ -szeres membránpotenciál emelkedés  $p=0,001$  a nyugalmi szinthez képest)
- **fokozott ROI termelés** (4 óránál  $1,53 \pm 0,36$ -szoros emelkedés  $p=0,002$ ; 24 óránál  $4,57 \pm 1,75$ -szeres emelkedés  $p=0,001$  a nyugalmi szinthez képest)
- illetve ezekkel a folyamatokkal párhuzamosan **NO szignál** (4 óránál  $6,09 \pm 2,98$ -szeres  $p=0,001$ ; 24 óránál  $4,9 \pm 1,8$ -szeres emelkedés) mérhető.



#### *IP3 receptor antagonista hatása T limfocita aktivációra*

Jól ismert hogy TCR aktiváció során keletkező inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP3) intracelluláris receptorhoz (IP3R) történő kapcsolódása az endoplazmatikus retikulum raktáraiból  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást eredményez, ami fontos része a T sejt aktiváció hatására bekövetkező  $\text{Ca}^{2+}$  szignálnak. Ezért megvizsgáltuk, hogy a membrán permeábilis IP3 receptor antagonista 2-aminoetoxidifenil borát (2-APB) hogyan befolyásolja a fent leírt szignálfolyamatokat. Azt találtuk, hogy a 2-APB csökkenti a CD3/CD28 kostimulációra fellépő  $\text{Ca}^{2+}$  szignált, NO szignált, továbbá csökkenti a mitokondriális hiperpolarizáció mértékét, illetve csökkent ROI termelést is eredményez.

#### *Szuperoxid dizmutáz hatása a T limfocita aktivációra*

A szuperoxid dizmutáz (MnTBAP) jelentősen csökkentette a CD3/CD28 stimulációra fellépő ROI szignált, hatására kis mértékben csökken a  $\text{Ca}^{2+}$ - és NO jel.

#### *NO kelátor hatása a T limfocita aktivációra*

A specifikus NO kelátor carboxi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazolin-1-oxid-3-oxid (C-PTIO) viszont gátolja a CD3/CD28 kostimulációra fellépő intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szignált, mitokondriális hiperpolarizációt, a ROI szignált és természetesen a NO szignált is.

#### *Thapsigargin, ionomycin hatása a T limfocita aktivációra*

Mivel a CD3/CD28 kostimuláció hatására létrejövő mitokondriális hiperpolarizáció gátolható 2-ABP-vel és C-PTIO-val, ezért megvizsgáltuk hogy az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció önmagában hogyan hat a mitokondriális folyamatokra. Humán perifériás limfocitákat  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz gátló thapsigarginnal illetve kalcium ionofor ionomycinnel kezelve TCR

aktivációtól független intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedés jön létre. Eredményeink szerint sem a thapsigargin sem az ionomycin hatására létrejövő  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedés nem okoz mitokondriális membránpotenciál változást és NO szignált, önmagában tehát nem elégséges a hatásos T sejt aktivációhoz.

#### *NO-donor hatása a T limfociták aktivációjára*

A NO mitokondriális membránpotenciálra kifejtett hatásának vizsgálatához humán perifériás limfocitákat NO donor - NOC-18 – molekulával kezeltünk. 60  $\mu\text{M}$  NOC-18 hatására intracelluláris NO termelés figyelhető meg, mely a kezelést követő 4 óra múlva  $3,13 \pm 0,8$ -szoros ( $p=0,04$ ), 24 óra múlva pedig  $3,7 \pm 0,6$ -szoros ( $p=0,003$ ) emelkedést mutat, a sejtek életképességét nem befolyásolva. Kísérleteink során azt találtuk, hogy 24 órán át 60  $\mu\text{M}$  NOC-18-al történő kezelés hatására a limfociták mitokondriális membránpotenciálja  $3,5 \pm 0,79$ -szörösére emelkedik ( $p=0,002$ ). Ezzel párhuzamosan, emelkedett intracelluláris,  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt és ROI szintet mértünk.

#### *NOS izoformák detektálása*

Eredményeink szerint tehát NO szükséges a fiziológiás T sejt aktivációhoz, megvizsgáltuk tehát milyen NOS izoforma felelős a megnövekedett NO termelésért. Western-blot analízissel azt találtuk hogy humán perifériás limfocitákban eNOS és nNOS izoforma expresszálódik. Ezen izoformák szintje 5-szörösére növekszik 24 órás CD3/CD28 antitestekkel történő aktiváció során. Az iNOS izoforma nem detektálható limfocitákban, még CD3/CD28 stimuláció hatására sem. Az eNOS és nNOS expresszió mértéke ugyanakkor fokozható 4 órán át 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  –dal történő kezeléssel.

#### *HDC-KO egér eltérő citokintermelése*

Munkánk során összehasonlítottuk a HDC-KO és vad típusú egerek lépsejtjeinek ConA stimulációra bekövetkező citokintermelését. Megmértük az IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 proteinek szintjét. Eredményeink szerint a HDC-KO állat lépsejtjei több IFN- $\gamma$ -t termelnek mind mRNS mind protein szinten a vad típusú állatokéhoz képest. Az IL-4, IL-10 proteinek szintjében nem találtunk szignifikáns különbséget.

Intracelluláris áramlási citometriás módszerrel megnéztük hogy az IFN- $\gamma$  melyik T sejt szubpopulációban mutat eltérést. Azt találtuk hogy a CD4 pozitív, CD8 pozitív, CD45 pozitív és CD4/CD25 kettős pozitív alpopulációkban nincs különbség a HDC-KO és vad egerek limfocitáinak intracelluláris IFN- $\gamma$  mennyiségében, valószínűleg a megváltozott IFN- $\gamma$  termelésért a teljes T sejt populáció eltolódása felelős.

#### *Hisztamin hatása a limfociták nitrogén-monoxid termelésére*

Előző eredményeinkből ismert hogy a NO fontos szerepet játszik a T sejt aktivációban és érésben, megmértük tehát a limfociták NO termelését. A T limfociták NO termelése szignifikánsan különbözött a HDC-KO és a vad típusú egerek limfocitáiban. A HDC-KO egér sejtjei 2,5-ször több NO termelnek ( $p=0,0009$ ) mint a vad típusú egerek limfocitái. A ConA stimuláció hatására bekövetkező NO szignál is nagyobb mértékű a HDC-KO egerek limfocitáiban.

A következőkben vizsgáltuk melyik NOS izoforma expresszálódik a CD3 pozitív limfocitákban. Azt találtuk hogy mindhárom NOS izoforma (eNOS, nNOS, és iNOS) mRNS-e megtalálható a limfocitákban, legnagyobb mértékű expressziót azonban a nNOS mutat. Mindhárom izoforma nagyobb mennyiségben expresszálódik a HDC-KO egerekből származó limfocitában,

bár külön-külön vizsgálva az izoformákat nem kaptunk szignifikáns különbséget.

Mivel a hisztamin hiányos állat limfocitái több NO-t termelnek és a ConA stimulációra adott NO szignál is eltér a vad típusú állatokéhoz képest, megvizsgáltuk hogy a hisztamin hogyan befolyásolja a limfociták NO termelését. Azt az eredményt kaptuk, hogy mind a vad mind a HDC-KO limfociták NO termelése szignifikánsan csökkent, ha a 24 órás ConA stimuláció 10<sup>-6</sup> M hisztamin jelenlétében történt (p=0,004 HDC-KO egérben, p=0,001 vad típus esetén).

#### *Eltérő T limfocita aktiváció a HDC-KO egerekben*

Előző munkánk eredményeiből ismert hogy T sejt aktiváció hatására Ca<sup>2+</sup> szignál, mitokondriális membránpotenciál szignál és ROI szignál mérhető, melyeket a NO befolyásol. A HDC-KO egerek limfocitáiban a T sejt aktivációra bekövetkező gyors Ca<sup>2+</sup> szignál eltér a vad típusétól. Eredményeink szerint mind a nyugalmi, mind a ConA stimuláció hatására bekövetkező gyors Ca<sup>2+</sup> szignál szignifikánsan magasabb volt a génkiütött állat limfocitáiban (p=0,02; p=0,04), bár a ConA hatására létrejövő gyors Ca<sup>2+</sup> szignál változásban ( $\Delta Ca^{2+}$ ) és a fenntartott Ca<sup>2+</sup> szignálban nem találtunk különbséget.

#### *Nitrogén-monoxid hatása az IFN- $\gamma$ termelésre*

Az eddig bemutatott eredmények szerint a HDC-KO egér limfocitái több IFN- $\gamma$ -t termelnek, ami együtt jár fokozott NO termeléssel is. Ismert, hogy a NO transzkripciós szinten befolyásolja a citokinek termelését, ezért megvizsgáltuk hogyan hat a limfociták IFN- $\gamma$  termelésére. Vad típusú egerek limfocitáit ConA-val stimuláltuk NO donor (60  $\mu$ M NOC-18) jelenlétében és jelenléte nélkül. ELISPOT módszerrel összehasonlítottuk a

NO donorral és az NO donor nélkül 24 órán át stimulált IFN- $\gamma$ -t termelő sejtek számát. Azt találtuk hogy 60  $\mu$ M NOC-18 hatására az IFN- $\gamma$ -t termelő sejtek száma szignifikánsan megnő ( $p=0,0002$ ).

Megmértük a sejtek IFN- $\gamma$  termelését NOS inhibitorokkal történő kezelés után is. Kétféle NOS gátlót alkalmaztunk (600  $\mu$ M 7-nitronidazolide és 100  $\mu$ M NG-mono-methyl – L-arginine), mindkettőt olyan koncentrációban hogy mindhárom NOS izoformát gátolja. Eredményeink szerint a NOS gátlóval történt kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek IFN- $\gamma$  termelését ( $p=0,01$  és  $p=0,002$ ).

10<sup>-6</sup> M hisztaminnal történt kezelés a limfociták IFN- $\gamma$  termelését nem befolyásolta, szignifikánsan csökkentette viszont a NO termelésüket. A HDC-KO egér limfocitái hisztamin hiányában több NO-t termelnek, a fokozott NO termelés pedig befolyásolja a sejtek IFN- $\gamma$  termelését. Így eredményeink szerint elmondható hogy a hisztamin a NO termelés befolyásolásával is szerepet játszik a T sejt citokintermelés szabályozásában.

## **KÖVETKEZTETÉSEK**

Megfelelő antigénepítőppal történő találkozás során a T limfocita nyugvó állapotából egy nagyobb energiaigényű, aktivált állapotba kerül. A megnövekedett energiaszükségletet a sejt fokozott ATP termeléssel biztosítja, aminek egyrészt fokozott glukóz felhasználás, másrészt fokozott mitokondriális működés a következménye. Mitokondriális hiperpolarizáció ismert korai jele a T sejt aktivációnak. Oxidatív foszforiláció során az elektronok egy része az oxigénnel direkt módon reakcióba lép, ROI képződik. Több tanulmány is foglalkozik a T limfociták aktivációja során

keletkező ROI szignál jelentőségével, ugyanakkor a fokozott ROI termeléshez vezető útvonal kevésbé tisztázott. Egyik elmélet szerint a T sejt aktivációra bekövetkező ROI szignálért a mitokondriumok fokozott oxidatív foszforilációs tevékenysége tehető felelőssé. Ezt támasztja alá az az eredmény, miszerint a mitokondrium elektrontranszportlánc I. komplexét gátolva – mely a ROI termelésben részt vesz - TCR stimuláció indukálta ROI szignál nem jön létre. Saját eredményeink szerint a CD3/CD28 aktivációra fellépő ROI szignál kismértékben csökkenthető ha a stimulációval párhuzamosan IP3 receptor antagonistá 2-aminoetoxidifenil boráttal (2-APB) is kezeltük a sejteket. Tehát a TCR felől érkező szignálfolyamatok befolyással vannak a ROI szignál mértékére. Újabb irodalmi adatok szerint ZAP-70, LAT, PLC $\gamma$ 1 deficiens sejtútvonalon TCR aktiváció indukálta ROI szignál nem váltható ki. Munkánk során azt találtuk, ha a limfociták intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció emelkedését tapsigarginnal vagy ionomycinnel idéztük elő, nem jött létre ROI szignál. Ez az eredmény azt mutatja, hogy Ca<sup>2+</sup> szignál önmagában nem elégséges a ROI termelés kiváltásához. Mások eredményei szerint a TCR stimuláció során aktiválódó PKC útvonal viszont jelentős szerepet tölt be a ROI szignál kialakulásában, a PKC Ca<sup>2+</sup> szignáltól független aktivációja során ugyanis kiváltható ROI szignál a T limfocitákban.

Saját és irodalmi adatok alapján elmondhatjuk, hogy TCR stimuláció hatására kialakuló ROI szignál és a fokozott mitokondrium működés szoros kapcsolatban áll. Az utóbbi években a NO mitokondrium működés szabályozásában betöltött fiziológiás szerepének egyre bővülő irodalma van. Saját eredményeink szerint humán limfociták eNOS-t és nNOS-t expresszálnak, iNOS izoformát nem. Az irodalomból ismert, hogy a

konstitutív NOS izoformák szabályozása  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin szignálon keresztül történik. Érdekes módon eredményeink szerint az eNOS, nNOS proteinek szintje a humán T sejtek 24 órás CD3/CD28 antitestekkel való stimulálása során többszörösére fokozódott, ami ezeknek az izoformáknak transzkripciós szinten történő szabályozását mutatja. Az iNOS izoformát viszont a T limfociták aktivációja során sem tudtuk detektálni Western-bolt módszerrel. Ugyancsak többszörösére fokozza az eNOS és nNOS expressziót, ha a sejteket  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ -vel kezeltük.

Megmérve a limfociták NO termelését, azt találtuk, hogy TCR stimuláció hatására NO szignál detektálható, mely a csúcsát 24 órás stimulációnál éri el és párhuzamos a mitokondriális hiperpolarizációval és a ROI szignállal. Részletesebben megvizsgálva a NO mitokondriális és oxidatív folyamatokra kifejtett hatását T limfociták aktivációja során, NO kelátor C-PTIO-t adtunk a sejtekhez. A NO gátlása során nem jön létre a T sejt aktivációra jellemző  $\text{Ca}^{2+}$  szignál, ROI szignál és a mitokondriális változások. Abban az esetben viszont, ha NO donorral kezeljük a sejteket, kialakul egy sejtpopuláció melyben  $\text{Ca}^{2+}$  szignál, NO szignál és mitokondriális hiperpolarizáció illetve ROI szignál mérhető.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a TCR stimuláció hatására fellépő NO szignál nélkülözhetetlen része a hatékony T sejt aktivációnak és szoros összefüggésben áll a mitokondriális és oxidatív jelátviteli folyamatokkal.

Az irodalomban szintén jól ismert, hogy a hisztaminnak fontos szerepe van T limfociták aktivációjában és érésében. A hisztamin immunfolyamatok szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatához jó modell a hisztidin dekarboxiláz génkiütött (HDC-KO) egérmodell, mivel hisztamin termelésért csak a HDC enzim felelős. Abban az esetben, ha az állatokat

hisztamin mentes diétán tartjuk, az immunfolyamatok in vivo hisztamin mentesen zajlanak. Laboratóriumunk előző eredményeiből ismert hogy a HDC-KO egerek lépéből szeparált dendritikus sejtek fokozott antigénprezentáló képességgel rendelkeznek, illetve LPS stimulációt követően szignifikánsan több IFN $\gamma$ -t és IL-12-t termelnek. Ezek az eredmények alátámasztják azt az irodalmi adatot miszerint a hisztamin a naiv Th sejtek Th2 sejtekké történő differenciálódásában játszik szerepet. Ugyanakkor az is ismert, hogy alacsony koncentrációjú NO a naiv Th sejtek Th1 irányban történő érését segíti elő. A NO cGMP útvonalat befolyásoló hatása révén fokozza a naiv Th sejtek IL-12 receptor  $\beta$ 2 (IL-12R $\beta$ 2) sejt felszíni expresszióját, de nincs hatással az IL-4 receptor expresszió mértékére. Saját eredményeink szerint a HDC-KO egerek limfocitái szignifikánsan több IFN- $\gamma$ -t termelnek mind mRNS, mind protein szinten. Az IL-10 és IL-4 citokinek termelésében nem találtunk különbséget. A fokozott IFN- $\gamma$  termelésért a T sejt szubpopulációk eltolódása tehető felelőssé, mivel az intracelluláris IFN- $\gamma$  mennyiség nem különbözik a CD4, CD8, CD45 és CD4/CD25 pozitív limfocita alpopulációkban. Ezek az eredmények is azt mutatják, hogy a HDC-KO egér immunválasza hisztamin hiány következtében Th1 irányba tolódik el.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a HDC-KO állat Th1 irányban eltolt immunválaszában szerepet játszik-e a NO, ezért megmértük a limfociták NO termelését. HDC-KO egér lépéből szeparált T sejtek 2,5-ször több NO-t termelnek a vad típusú egér limfocitáihoz képest. Ezenkívül a HDC-KO egerek limfocitái ConA stimuláció hatására fokozott NO szignállal válaszolnak. Tovább vizsgálva a hisztamin NO termelésre kifejtett hatását,



azt találtuk, hogy mind a vad, mind a HDC-KO limfociták NO termelése csökkenthető hisztaminnal történő kezeléssel.

Mivel a hisztaminkezelés nem befolyásolta a sejtek IFN- $\gamma$  termelését, megvizsgáltuk a NO termelés hogyan hat a limfociták citokintermelésére. Azt az eredményt kaptuk, hogy NO donor hatására a sejtek IFN- $\gamma$  termelése szignifikánsan nagyobb a kontroll, csak ConA-val stimulált sejtekhez képest. Abban az esetben viszont, ha a sejteket ConA stimulációval párhuzamosan NOS inhibitorral kezeltük, az IFN- $\gamma$  termelés szignifikánsan csökkenthető volt.

Ezen eredményeink szerint elmondhatjuk, hogy a hisztamin irodalomból ismert citokintermelésre gyakorolt direkt hatásán túl, a NO termelés befolyásolása révén is részt vesz a T sejt citokintermelés szabályozásában.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

### Ph.D. értekezés témájában megjelent publikációk

**Koncz A**, Pasztoi M, Mazan M, Fazakas F, Buzas E, Falus A, Nagy G. Nitric oxide mediates T cell cytokine production and signal transduction in histidine decarboxylase knockout mice. *J Immunol* 2007 Nov. 15;179(10):6613-9. **IF: 6,3**

Nagy G, **Koncz A**, Fernandez D, Perl A. Nitric oxide, mitochondrial hyperpolarization, and T cell activation. *Free Radic Biol Med*. 2007 Jun 1; 42(11): 1625-31. **IF:5,4**

Nagy G, **Koncz A**, Perl A Mitochondrial T cell signal transduction abnormalities in systemic lupus erythematosus *Curr Immunol Rev* 2005, 1, 62-68.

Perl A, Gergely P Jr, Nagy G, **Koncz A**, Banki K. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol* 2004, 25, 360-7. **IF:13,1**

Nagy G, **Koncz A**, Perl A. T cell activation induced mitochondrial hyperpolarization is mediated by Ca<sup>2+</sup> and redox dependent production of nitric oxide. *J Immunol* 2003, 171, 5188-97. **IF: 6,7**

### A Ph.D. értekezés témájában megjelent közlemények

összesített impakt faktora: 31,5

Ph.D. értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk

Nagy G, Ward J, Mosser DD, **Koncz A**, Gergely P Jr, Stancato C, Qian Y, Fernandez D, Niland B, Grossman CE, Telarico T, Banki K, Perl A. Regulation of CD4 expression via recycling by HRES-1/RAB4 controls susceptibility to HIV infection. *J Biol Chem*. 2006 Nov 10; 281(45):34574-91 **IF: 5,8**

Nagy G, **Koncz A**, Perl A. T- and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Crit Rev Immunol*. 2005, 25(2),123-40. **IF: 3,2**

Gergely P Jr, Pullmann R, Stancato C, Otvos L Jr, **Koncz A**, Blazsek A, Poor G, Brown KE, Phillips PE, Perl A. Increased prevalence of transfusion-transmitted virus and cross-reactivity with immunodominant epitopes of the HRES-1/p28 endogenous retroviral autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2005 Aug;116(2):124-34. **IF: 3,2**

Nagy G, Clark J M, Buzas E, Gorman C, Pasztoi M, **Koncz A**, Falus A and Cope A P. Nitric oxide production of T lymphocytes is increased in rheumatoid arthritis. *Immunology Letters* 2008 in press. **IF: 2,3**

**Koncz A**, Nagy G, Perl A. Nitrogén monoxid függő mitokondrium bioszintézis systemás lupus erythematosusban *Klinikai és kísérletes laboratóriumi medicina* 2005. szeptember

Nagy G, Géher P, **Koncz A**, Perl A. Jelátviteli defektusok systemás lupus erythematosusban. *Orvosi Hetilap*. 2005 Jul 31.

Kumulatív impakt faktor: **46,0**

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel és hálával tartozom Falus András Professzor Úrnak és Dr. Buzás Editnek, amiért lehetőséget adtak munkatervem és kísérleteim megvalósításához és mindenben támogatták munkámat. Kutatómunkával a syracues-i egyetemen a Perl András Professzor Úr által vezetett laboratóriumban ismerkedtem meg, köszönettel tartozom azért, hogy számos laboratóriumi módszer elsajátításában segítséget és lehetőséget kaptam. Szintén ezúton szeretném megköszönni a Heim Pál Gyermekkórházban dolgozó munkatársaimnak hogy türelmükkel és megértésükkel támogatták Ph.D. munkám befejezését, Simonné Sebestyén Piroskának pedig külön köszönetet szeretnék mondani biztatásáért és lelkesítéséért.

Szerencsésnek érzem magam, hogy férjemmel, Nagy Györggyel együtt dolgozhattam. A közösen végzett munka általa történő szakmai, szellemi irányítása nagymértékben elősegítette fejlődésemet és fontos részét képezi Ph.D. munkámnak. Köszönet illeti azért is, mert családfőként lehetőséget biztosított munkám végzéséhez és a legnehezebb pillanatokban is mellettem állt, támogatására folyamatosan számíthattam.

Szeretnék köszönetet mondani Édesanyámnak is, aki gondoskodásával, szeretetével és állandó segítőkészségével járult hozzá munkám eredményességéhez.