

**A PPAR γ szerepe az apoptotikus neutrofilek fagocitálásában
humán makrofágokban és dendritikus sejtekben**

MAJAI GYÖNGYIKE EMESE, Dr.

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN
2008**

Témavezető:

Prof. Dr. Fésüs László intézetvezető, egyetemi tanár, akadémikus

A Szigorlati Bizottság elnöke:

A Szigorlati Bizottság tagjai:

A Védési Bizottság elnöke:

Opponensek:

A Védési Bizottság tagjai:

BEVEZETÉS

Az apoptotikus sejtek eltakarítása professzionális és nem professzionális fagociták által igen fontos szerepet tölt be a gyulladás felszámolásában, védve a környező szöveteket az apoptotikus sejtekből felszabaduló gyulladásos és immunogén anyagoktól. A makrofágok az apoptotikus sejtek bekebelezésére, míg a dendritikus sejtek a bekebelezett antigén bemutatására és T limfocita aktiválására specializálódtak.

A makrofágok fenotípusa nem csak a morfológiai jellemzőket és felszíni receptorok megjelenését jelenti, hanem olyan funkcionális tulajdonságokat is mint citokin termelés, antigén bemutatás, fagocitáló és baktérium-elpusztító képesség. Az érés során viszonylag nagyszámú olyan felszíni molekula jelenik meg a makrofágokon, amelyek által a sejt képessé válik az apoptotikus sejt felszínén lévő változásokat is felismerni. Egyik ilyen felszíni molekula a CD31, amely képes mintegy „letapogatni” az apoptotikus sejt felszínét, ez által különbséget tenni az elhaló és élő sejtek között, megelőzve ez utóbbiak bekebelezését. Másik igen fontos receptor a CD36, amely komplexet képez az $\alpha_v\beta_3$ integrinnel és a trombospondinnal. A CD14 receptort illetően igazolták, hogy képes felismerni az ICAM-3 felszíni molekulát a makrofágok felszínén. Munkacsoportunk megfigyelései alapján a szöveti transzglutamináz (TG2) szintén szerepet játszik a fagocitózis folyamatában, TG2 knock-out egerekben hiánya autoimmun megbetegedéshez vezet. Az apoptotikus sejtek felszínére kitapadó hídképző molekula, a PTX3, szintén fontos szerepet tölt be az immunválaszban; növeli a C1q kapcsolódását és C3 tapadását az apoptotikus sejtek felszínéhez, és ezzel kulcsszerepet tölt be a komplement mediált fagocitózisban.

A dendritikus sejtek esetében bizonyított, hogy főként az éretlen fázisban lévők rendelkeznek magasabb a fagocitáló képességgel, amelyet az $\alpha_v\beta_3$ receptorral hoznak összefüggésbe. Egyértelműen bizonyított, hogy dendritikus sejtek esetében az apoptotikus sejt eltakarításában a felszínükön lévő CD36, PS receptor, MFGE-8, AXL TYRO játszanak szerepet. A CD209 receptor vagy DC-SIGN megtalálható mind az érett mind az éretlen dendritikus sejtek felszínén. Szerepét tekintve adhéziós és idegen anyag felismerésében szerepet játszó receptor. Mint adhéziós molekula az endothél sejtek felszínén található ICAM-2-hez és a T sejteken lévő ICAM-3-hoz kötődve az immunválasz kiváltásában játszik szerepet. Mint idegent felismerő receptor számos bakteriális, virális parazita és gomba felszínéhez kötődik azáltal, hogy egy olyan szénhidrát doménnel rendelkezik, ami specificitást mutat, mint a manóz és nem szialilált Lewis antigén iránt. Hasonlóan a T sejtekhez a humán neutrofilek is rendelkeznek felszíni ICAM-3 molekulával, de bizonyított,

hogy a DC-SIGN nem kötődik hozzá. Kötődése a polimorfonukleáris sejtek felszínén található $\beta 2$ integrin-Mac1 iránt specifikus, amely a Lewis féle antigént tartalmazza és más mieloid sejten nem található meg. Mindezek azt sugallják, hogy a specifikus glikoziláció igen fontos szerepet tölt be a dendritikus sejt és neutrofil közötti kapcsolatban.

Hogyan gátolják meg az apoptótikus sejtek a gyulladást?

A makrofágok képesek különbséget tenni apoptótikus és nekrotikus sejtek között. A felismerésnek a célja az, hogy az apoptótikus sejtek eltakarítása minél hamarabb bekövetkezzen, még mielőtt a sejtek szekunder nekrozisba mennének át, ezáltal megakadályozva gyulladás és autoimmun betegségek kialakulását. Az eddigi kutatások arra utalnak, hogy az apoptótikus sejtek nemcsak megakadályozzák olyan gyulladáshoz vezető citokinek felszabadulását a makrofágokból mint IL-1 β , IL-8, GM-CSF, TNF- α , leukotrién C4 és tromboxán B2 hanem elősegítik TGF- β 1, PGE-2 és PAF gyulladáscsökkentő citokinek felszabadulását is.

Dendritikus sejtekkel végzett kutatások közül egyesek az apoptótikus sejtek gyulladáscsökkentő hatására utalnak. Az apoptótikus sejt bekebelezése makrofágok által maga után vonja az IL-12 szekréció csökkenését, TGF- β 1 termelődését és olyan aktivációt jelző felszíni markerek kifejeződésének csökkenését, mint a CD86. Abban az esetben, ha olyan antitestek vannak jelen, amelyek képesek kötődni és opsonizálni az apoptótikus sejtet, akkor az Fc receptoron keresztül történő bekebelezés dendritikus sejt éréshez és ugyanakkor gyulladáshoz vezető citokinek felszabadulásához fog vezetni. Olyan anyagok, mint HMGB-1, box1, húgysav és hősokk fehérjék kiszabadulása az apoptótikus sejtekből az NF- κ B útvonalon keresztül gyulladáshoz vezető immunválaszhoz fog vezetni. A dendritikus sejtek egyedülállóak az antigén prezentáló sejtek között azáltal, hogy képesek az elhaló sejtekből származó antigént mind az MHCI mind az MHCII keresztül a CD8⁺ sejteknek bemutatni. Abban az esetben, ha antigén prezentáláskor specifikus CD4⁺ sejtekkel találkozik a CD8⁺ sejteknek aktivációja következik be és ezen aktivált sejtek visszatérve a gyulladáshoz vezető területre a célsejt elpusztítását idézik elő. Ez rendkívül fontos folyamat lehet a tumor immunitásban, gyógyításban, de ugyanakkor alapját képezheti autoimmun betegségek kialakulásának is.

A PPAR γ szerepe a monocita makrofág és dendritikus sejt differenciálódásban és funkciójukban

A PPAR (peroxisome activated receptor gamma) a mag receptorok családjába tartozó receptor, amely heterodimert képez a retinoid X receptorral. Legelőször a PPAR γ -nak a zsírsejtek differenciálódásában, a lipid metabolizmusban betöltött szerepére derült fény. Későbbi tanulmányok a monocita- makrofág differenciálódásban betöltött szerepére utaltak. A PPAR γ igen alacsony szinten észlelhető a csontvelői egér makrofágokban, de igen kifejezett az expressziója humán monocitából differenciált makrofágokban. Bár a funkciója a makrofágokban nem egészen tisztázott számos kísérlet arra utal, hogy gyulladás csökkentő szerepet töltenek be ezekben a sejtekben, negatívan szabályozva gyulladásos géneket, azáltal, hogy antagonizálják számos transzkripció faktor aktivitását. Számos megfigyelés szól emellett is, hogy nem csak a monocita/makrofág hanem a dendritikus sejtek is kifejezik a PPAR γ -t. A monocitából differenciált heterogén dendritikus sejtpopuláció gyakorlatilag felosztható egy CD14 alacsonyán kifejező, CD1a $^{-}$ populációra és egy CD14 $^{-}$, CD1a $^{+}$ populációra. Irodalomból ismert adat, hogy CD1a $^{-}$ populáció baktériumot és latex gyöngyöt fagocitáló képessége sokkal magasabb, mint a CD1a $^{+}$ pozitív populációé. Az is ismert tény, hogy ennek a CD1a $^{-}$ populációnak az arányát a PPAR γ receptor gént aktiváló szintetikus ligandokkal lehet befolyásolni.

KUTATÁSUNK CÉLJA:

1. Humán apopto-fagocita rendszer beállítása
2. Tisztázni, hogy a makrofágok fagocitáló képessége befolyásolható-e valamilyen PPAR γ antagonistá vagy agonista kezeléssel
3. Tisztázni, hogy létezik-e valamilyen kapcsolat a dexametazon és PPAR γ hatás között
4. Vizsgálni a PPAR γ -nak a gyulladásban betöltött szerepét
5. Tanulmányozni a dendritikus sejtek fagocitáló képességét
6. Tisztázni a PPAR γ szerepét a dendritikus sejt differenciálódásban és ezen sejtek fagocitáló képességében
7. Fényt deríteni, hogy a humán apoptotikus neutrofilek hogyan befolyásolják a dendritikus sejtek citokin válaszreakcióját
8. Milyen hatással van az apoptotikus sejtek bekebelezése a T sejt aktivációra makrofágokban és dendritikus sejtekben

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek izolálása és tenyésztése

A humán perifériás mononukleáris sejteket „buffy coat”-ból izoláltuk, Ficoll Paque Plus és CD14 mágnesese gyöngy segítségével. A frissen izolált monocitákat 5 napig IMDM tápoldatban 10% AB szérumban, 5 ng/ml MCSF jelenlétében tenyésztettük 1 μ M dexametazon, és/vagy 10 μ M GW9662 vagy 2,5 μ M roziglitazon hozzáadásával. A dendritikus sejt esetében a sejteket 6 lyukú sejtenyésző edényben, A-IMV tápoldatban, 2,5 x10⁶/ml, GM-CSF és IL4 bizonyos esetekben roziglitazon hozzáadásával 5 napig történt a differenciáltatás.

A neutrofileket 24 h 1% AB szérumban jelenlétében tenyésztettük, így spontán apoptózisba mentek át (24-óra alatt 50-80%). Az egér timocitákat 4 hetes NMRI egerekből izoláltuk. Apoptotikus T-sejtek nyeréséhez, a timocitákat 5 óráig a kalcium ionofor, A23187-mal inkubáltuk.

Egérből izolált sejtek tenyésztése és differenciáltatása

A makrofág specifikus PPAR γ knock-out egereket Nagy L. munkacsoporttól kaptuk ajándékba (Debreceni Egyetem). A csontvelői sejteket az PPAR $\gamma^{+/-}$ Lys-Cre és PPAR $\gamma^{fl/-}$ Lys-Cre egerek combcsontjából izoláltuk ki, majd ezeket 10% FBS, 2 mM glutamin, 1 mM Na- piruvát, streptomycin, pencillin, és 20 ng/ml M-CSF jelenlétében 10 napig differenciáltattuk.

A hasüregi makrofágokat 3 ml 3 % tioglikolát beoltással majd mosással izoláltunk felnőtt egerekből és ez követően 48 lyukú sejtenyésző edényre szélesztettük őket. 2 óra múlva a nem letapadt sejteket elmostuk, majd 2 napig tenyésztettük 10% FBS-t, 2 mM glutamin, 1 mM Na- piruvát, streptomycint, pencillint tartalmazó RPMI 1640 tápoldatban.

Apoptotikus sejtek fagocitózisa makrofágokba

A neutrofileket szintén „buffy coat”-ból a Histopaque 1077, és Histopaque 1119 segítségével nyertük. Az apoptotikus sejteket egy éjszakán át CFDA-SE-vel inkubáltuk, majd a festéket eltávolítva tápoldatba vettük fel mielőtt a CMTMR-el jelölt és mosott makrofágokhoz adtuk volna. Az apoptotikus sejt makrofág aránya 1:15 volt. 25 illetve 40 perc együtt inkubálás után a be nem kebelezett sejteket elmostuk, míg a letapadó sejteket felkapartuk és áramlási citométer segítségével értékeltük.

Listeria monocytogenes fagocitózis

Listeria monocytogenes felvételhez a baktériumokat FITC izomérrel (0,1 mg/ml) fluoreszcensen jelöltük egy éjszakán át majd a makrofághoz való hozzáadás előtt szérummal opszonizáltuk 10 percig. A baktérium makrofág arány 15:1 volt. Az együtt inkubálás időtartama 25 perc. A fagocitózis meghatározása áramlási citometria segítségével történt.

Dendritikus sejt fagocitózis meghatározás

Az apoptotikus sejteket egy éjszakán át CFDA-SE-vel egy éjszakán át inkubáltuk, majd a festéket eltávolítva A-IMV tápoldatba vettük fel mielőtt a dendritikus sejtekhez adtuk volna. A dendritikus sejt: apoptotikus sejt aránya 1:5 volt. 8 h együtt inkubálás után a sejteket 3x mostuk, majd a dendritikus sejteket CD40, CD209, CD1a sejt felszíni receptorokra jelöltük majd a mintákat áramlási citometria segítségével értékeltük.

Mieloperoxidáz festés

Miután a sejttenyésztő edényben letapadó makrofágokról az apoptotikus neutrofileket lemostuk, a sejteket 2,5% glutáraldehiddel fixáltuk és mieloperoxidázra festettük hidrogen peroxid és dimetoxibenzidin segítségével. A fagocitózis meghatározása fénymikroszkóppal, mintánként 500 sejtet számolva történt.

Áramlási citometria

A makrofágokat PBS-BSA-val mostuk majd PE konjugált CD14, CD16, CD206 és FITC konjugált CD36 elleni antitestekkel 1 órán át 4 C⁰ –on sötétben inkubáltuk. Ezt követően mostuk és áramlási citométerrel mértük.

Western blot

2 mg/ml fehérjét tartalmazó makrofág homogenizátumot összekevertünk egyenlő térfogatú minta pufferrel. Az elektroforézist 8%-os SDS poliakrilamid gélen végeztük. Az elválasztott fehérjéket PVDF membránra blottoltuk és TG2 ellen monoklonális (CUB7402) valamint poliklonális antitestekkel hívtuk elő. A kötött antitesteket ECL kittel vizualizáltuk.

RNS izolálás és meghatározás

A totál RNS izolálása Trizol segítségével történt. A transzkripció meghatározása quantitative real time PCR segítségével történt. A használt normalizáló gén az FABP4, ABCA1, CD36, CD14, TG2 esetében a cyclophilin D volt. A Taqman Low Density Array esetében a próbák

és a célgén primerek egy on-line katalógusból voltak kiválasztva. A normalizáló gén e gének esetében a 18S rRNS volt.

Humán IFN γ ELISPOT vizsgálat

A humán differenciáltatott makrofágokat és dendritikus sejteket apoptotikus neutrofilrel előinkubáltuk. A fagocitózist követően a sejteket az apoptotikus neutrofilektől elmostuk és öt napig autológ T limfocitákkal inkubáltuk együtt. Ezután a sejteket begyűjtöttük egy IFN γ ELISPOT méréshez. A kapott spotokat ELISPOT értékelő programmal (ELISPOT image analyzer ,Series 1 ImmunoSpot Analyzer, ImmunoSpot Vesion 4.0 Software Academic, Cellular Technology, Cleveland, OH) analizáltuk.

Citokin mérés

A fagocitáló makrofágok és dendritikus sejtek felülúszójából, IL-8, IL-1b, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12 p70 került meghatározásra a humán CBA bead array segítségével (Human Inflammation Cytometric Bead Array, BD Biosciences)

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A PPAR γ antagonisták gátolják az apoptótikus sejtek bekebelezését

A monocitáknak kevesebb, mint 6%-a képes apoptótikus neutrofilek fagocitálására. Differenciálódás után a makrofágoknak mintegy 30%-a képes apoptótikus sejtet bekebelezni 25 perc alatt. Ezen fagocitáló képesség meghatározása kísérleteinkben kétféle technika segítségével: mieloperoxidázzal és áramlási citometriával történt. A két mérési technikával nyert eredmények jól korreláltak a későbbiekben csak az áramlási citometriát használtuk fel a fagocitáló képesség meghatározására.

Számos irodalmi adat utalt arra, hogy igen fontos kapcsolat áll fenn a PPAR γ kifejeződés és makrofág differenciálódás között, ugyanakkor arra is, hogy bizonyos szintetikus ligandokkal befolyásolni lehet ezen sejtek funkcióját is. Annak tisztázására, hogy befolyásolható-e a makrofágok fagocitáló képessége PPAR γ ligandokkal, a frissen izolált monocitákat 5 napig 2,5 μ M roziglitazonnal kezeltük. Eredményeink alapján a roziglitazonnal kezelt makrofágok nem mutattak magasabb fagocitáló képességet a kontrollhoz képest. Ahhoz hogy megtudjuk, hogy maga az alap fagocitózisban valamilyen PPAR γ folyamat szerepet játszik, a differenciálódás egész időtartama alatt a sejteket a GW9662 PPAR γ antagonistával kezeltük. A GW9662 szelektív PPAR γ antagonistája, amely nem befolyásolja a PPAR α és PPAR δ által mediált transzkripciót. Az 5 napig *in vitro* GW9662 jelenlétében differenciáltatott makrofágok csökkent fagocitáló képességgel rendelkeztek a kontrollhoz képest. Ez a fagocitózist gátló hatás idő és koncentrációfüggő. Abban az esetben, ha a T0070907 szelektív antagonistát használtuk, szintén gátlást figyeltünk meg. A fagocitáló képesség csökkenése egyértelműen igazolható volt akkor is, ha az apoptótikus sejtek helyet latex gyöngyöt használtunk. Ha *Lysteria Monocytogenes* fagocitáltak, a GW9662 jelenlétében differenciáltatott makrofágok nem mutattak különbséget a fagocitózisban a kontrollhoz képest.

Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy gátolva a PPAR γ -t, olyan állapotot hozunk létre, amely ennek a receptornak a hiányát utánozza, és olyan differenciált makrofágokat nyerünk, amelyek apoptótikus sejteket fagocitáló képessége csökken. Ugyanakkor kísérleteink azt is mutatják, hogy ez csak apoptótikus sejt specifikus, mert nem mutatnak különbséget a baktérium felvételében a kontroll makrofágokhoz képest.

Irodalomból ismert, hogy a dexametazon képes növelni a monocita –makrofág differenciálódás során a makrofágok apoptótikus sejteket bekebelező képességét azáltal, hogy megváltoztatja ezen sejtek citoszkéletális rendszerét. Kérdésünk az volt, hogy ez az

átprogramozási folyamat kapcsolatban van-e a PPAR γ -val. Frissen izolált monocitákat 5 napig 1 μ M dexametazon illetve dexametazon és GW9662, vagy dexametazon és roziglitazon jelenlétében differenciáltunk. A roziglitazon és dexametazon jelenlétében differenciált sejtek hasonló fagocitáló képességet mutattak, mint a dexametazon jelenlétében differenciált makrofágok. Abban az esetben, ha a sejtek együttesen dexametazon és GW9662 jelenlétében differenciálódtak, fagocitáló képességük szignifikáns csökkenést mutatott a dexametazon kezeltékhez képest. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a PPAR γ képes befolyásolni a dexametazon által indukált magas fagocitáló képességét a makrofágoknak, de ugyanakkor ez nem a citoskeletális átrendeződés eredménye, amint citoskeletális festéssel nyert, de nem publikált eredményeink ezt mutatják.

A PPAR γ kiütése zavart okoz az apoptotikus sejtek bekebelezésében

Ahhoz, hogy több bizonyítékot nyerjünk arról, hogy a PPAR γ fontos szerepet tölt be a fagocitózis folyamatának szabályzásában, a következőkben PPAR $\gamma^{+/-}$ Lys-Cre (kontroll) és PPAR $\gamma^{fl/-}$ (makrofágra sepcifikus PPAR γ deléción) Lys-Cre egereket használtunk kísérleteinkben. Ez utóbbi egerek csontvelői sejteiből differenciáltott makrofágok illetve hasüregből tioglikoláttal nyert makrofágok csökkent apoptotikus timocitát bekebelező képességgel rendelkeztek. A kísérletek ellenőrzése IL-4 hozzáadásával történt, ugyanis irodalomból ismert tény hogy az IL-4 hozzáadása fokozza a PPAR γ kifejeződését. Ez a kifejeződés növekedés észlelhető volt a PPAR $\gamma^{+/-}$ Lys-Cre kontroll, de nem következett be PPAR $\gamma^{fl/-}$ Lys-Cre egerekben.

A PPAR γ függő génkifejeződés hozzájárul az efficiens apoptotikus sejt eltakarításához

Annak bizonyítására, hogy a makrofágok differenciálódása során PPAR γ függő génkifejeződés változások következnek be, génexpressziós vizsgálatokat végeztünk. A monocita –makrofág differenciálódás során 3, 5- szeres PPAR γ és egy 14 szeres FABP4 (tipikus PPAR γ válaszadó gén) indukció volt észlelhető. A sejtek, amelyeket 5 napig 10 μ M GW9662 jelenlétében differenciáltattunk, igen kifejezett FABP4 indukció csökkenést mutattak a kontrollhoz képest, bizonyítva az antagonista hatást. A CD36, TG2, AXL és PTX3 gének, amelyekről bizonyított, hogy fontos szerepet töltenek be az apoptotikus sejt eltakarításában, szintén csökkent kifejeződést mutattak ezekben a sejtekben a kontrollhoz viszonyítva. A fent említett gének mellett a PPAR γ nem befolyásolta szignifikánsan olyan fagocitózisban szerepet játszó gének kifejeződését, mint a CD14, ABCA1.

A dexametazonnal kezelt sejtekben az FABP4, TG2, CD36 kifejeződésének csökkenése, az ABCA1 kismértékű növekedése volt észlelhető, illetve nem következett be változás a CD14 gén expressziójában. Abban az esetben, ha a makrofágok dexametazon és GW9662 jelenlétében differenciálódtak, az FABP4, PPAR γ , TG2, CD36 kifejeződése csökkent, de ugyanakkor az ABCA1 és CD14 gének indukciója volt észlelhető. A PTX3 és AXL gének kifejeződése szintén lényeges különbséget mutatott az antagonistával kezelt makrofágokhoz képest.

A génkifejeződés eredmények fehérje szintű alátámasztásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a GW9662 jelenlétében való differenciálódás egyértelműen csökkentette a CD36 és CD14 receptorok sejtfelszíni mennyiségét. A génkifejeződés vizsgálatokhoz hasonlóan Western-Blottal is kimutattuk, hogy a GW9662 jelenlétében differenciáltatott sejtekben a TG2 fehérje szinten is csökkent. Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy a GW9662 nem gátolja meg olyan sejtfelszíni, differenciálódási markerek megjelenését, mint a CD16 vagy mannóz receptor (CD206). A dexametazonnal önmagában illetve dexametazon és GW9662 jelenlétében differenciált sejtek nem mutattak eltérést a kontrollhoz képest.

Felvetődik a kérdés, hogy elegendő-e ilyen fokú gátlás ahhoz, hogy fagocitózis defektus következzen be ezekben a sejtekben? Legalább két különböző útvonalon vezetve a Rac aktivációjához, amely igen kiemelt szerepet tölt be a bekebelezés folyamatában. A PS szignál esetében, amely igen fontos szerepet tölt be az apoptotikus neutrofilek fagocitózisában legalább egy felismerő és egy internalizáló molekula szükséges a hatékony eltávolításhoz. A felismerés általában integrinek illetve integrinokkal kapcsolatban lévő molekulákon keresztül valósul meg, mint amilyen a CD36, amely az MFGE8-val létesít kapcsolatot. A bekebelezés olyan fehérjék által közvetített, mint a Gas6 vagy S fehérje, egy tyrosine kináz közbeiktatásával, mint MERTK, AXL, TYRO3 ezáltal a Rac aktivációhoz vezetve, bevonva a folyamatban a TRIO, RhoG, DOCK180 és ELMO fehérjéket. A TG2 elősegíti a PS molekula felszíni megjelenését és TGF- β aktivációt, amely szintén a folyamat hatékonyságát befolyásolja. Bár az antagonista jelenlétében differenciáltatott makrofágoknál a legtöbb gén esetében nem volt szignifikáns kifejeződés csökkenés, úgy tűnik, hogy a CD36, AXL, TG2 csökkenése elegendő a fagocitózis ilyen gátlásához. Eredményeinket az irodalmi adatokból ismert tény is alátámasztja, hogy a makrofágokhoz anti-CD36 antitestet adva mintegy 50%-al csökken a fagocitáló képesség.

A PTX3 hídképző molekula szerepét tölti a fagocitózis folyamatában azáltal, hogy olyan fagocita felszíni receptorokkal képes kapcsolatot teremteni, mint a kalretikulin. Bár PTX3-ról

irodalomból ismert adat, hogy képes növelni az apoptotikus sejtek felvételét, ezt egyértelműen csak késői apoptotikus sejtek esetében sikerült bizonyítani. Látszólag ellentmondás adódik: hogyan képes egy fagocitózist fokozó molekula a bekebelezést gátolni? Irodalomból ismert tény hogy a makrofágok által termelt PTX3 képes növelni a C1q kötődését és a C3 felrakódását az apoptotikus sejtek felszínén ez által fokozva ezen sejtek eltakarítását makrofágok által. Így érthető, hogy a GW9662-vel kezelt sejtek a PTX3 csökkenése miatt vezethet a fagocitózis csökkenéséhez általunk végzett kísérletekben.

A PPAR γ antagonistával kezelt makrofágok citokin termelése

Az 5 napig különböző ágensek jelenlétében differenciált makrofágokat 30 percig inkubáltuk apoptotikus sejtekkel vagy kontrollként sima tápoldattal. A makrofágok, amelyeket GW9662 jelenlétében differenciáltattunk 5 napig, nem mutattak szignifikáns TNF- α , IL-6, IL-8, TGF- β termelés eltérést, LPS stimulálás után, a kontroll makrofágokhoz képest. Ugyanakkor szignifikánsan kevesebb IL-10 citokint termeltek. Az apoptotikus neutrofilek gátolták az LPS indukált gyulladásos citokin termelést. Ahogyan várható volt a dexametazonnal kezelt sejtek szignifikánsan kevesebb IL-6, TNF- α és IL-10-et termeltek, de ugyanakkor IL-8-termelésében nem mutattak különbséget a kontrollhoz képest. Ezen sejtek ugyancsak több TGF- β gyulladást csökkentő citokint termeltek, az apoptotikus sejttel való együtt inkubálás után. Abban az esetben, ha a sejteket dexametazonnal és GW9662-vel differenciáltattuk, hasonló citokin profilt mutattak a dexametazonnal kezelttekhez, kivéve az IL-10-et, ami lényegesen kevesebb volt. A PPAR γ antagonista nem befolyásolta az apoptotikus sejtek gyulladást csökkentő hatását. A dexametazonnal kezelt sejtek még akkor is ha GW9662 jelenlétében voltak differenciáltatva kevesebb az IL-6, TNF- α -t de ugyanakkor több TGF- β -t termeltek. Az apoptotikus sejtek ezt a hatást szignifikánsan nem befolyásolták, kivéve a TGF- β amelynek termelését fokozták, de ezt a hatást a GW9662 nem befolyásolta. A dexametason által nem befolyásolt IL-8 termelését az apoptotikus sejtek képesek voltak visszaszorítani függetlenül attól, hogy a differenciálódás során a PPAR γ antagonista jelen volt-e vagy sem.

Az gyulladást csökkentő IL-10 termelődése szignifikánsan alacsonyabb volt LPS-sel való stimulálás után a GW9662-vel kezelt sejtekben a kontrollhoz képest. Ez a csökkent termelés akkor is észlelhető volt, amikor a makrofágokat az LPS-sel való kezelés után apoptotikus sejtekkel inkubáltuk. A GW9662 nem gátolta az apoptotikus sejteknek az IL-10-re való hatását, inkább fokozta ezt. Ugyanez volt észlelhető akkor, amikor dexametazon is jelen volt a PPAR γ antagonista mellett az érés során. Kísérleteinkben nem észleltünk szignifikáns IL-1 β ,

IL-12 vagy GM-CSF indukciót, sem a kontroll, sem a GW9662–vel kezelt sejtekben függetlenül attól, hogy apoptótikus sejtekkel történt-e vagy sem együtt inkubálás. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy az LPS indukálta IL-10 szekréció mind a PPAR γ , mind a glükokortikoidok esetében PPAR γ függő. A gyulladásos IL-8 szekréciója úgy tűnik glükokortikoid és PPAR γ független, de ugyanakkor gátlása egyértelműen bekövetkezik apoptótikus sejt jelenlétében. Ezen adatok alátámasztják az apoptótikus sejtek egyedi gyulladás gátló hatását. Kísérleteink ugyanakkor arra is rámutatnak, hogy az apoptótikus sejtek gyulladást csökkentő hatása nem PPAR γ függő még az IL-10 esetében sem.

A PPAR γ agonista fokozza az apoptótikus neutrofilek bekebelezését dendritikus sejtekbe

A dendritikus sejtek és makrofágok olyan fagocitáló sejtek, amelyek közös perkurzorból származnak és olyan funkcionális tulajdonságokkal bírnak, mint a patogén felismerése és antigén prezentálás. Jól ismert tény hogy mindkét sejt képes fagocitózisra, de ez eltérő a két sejt típusban. Korábbi adataink azt mutatják, hogy apoptótikus sejt fagocitálása makrofágokba 1 óra alatt eléri a 30%-ot. Hasonló körülményeket alkalmazva megfigyeltük az éretlen dendritikus sejtek fagocitáló képességét, de az elhaló sejtek bekebelezése lényegesen lassúbb ezekben a sejtekben a makrofágokhoz képest; 8 óra alatt az apoptótikus neutrofilek bekebelező dendritikus sejtek aránya 20% körül van.

Irodalmi adatok és saját eredményeink igazolták, hogy a PPAR γ igen kifejezett kifejeződés növekedést mutat monocita-makrofág és monocita-dendritikus sejt differenciálódás során. Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy ha a monocitákat PPAR γ antagonistá jelenlétében differenciáltattuk a sejtek fagocitáló képessége lényegesen csökkent, miközben a monocitáknak roziglitazon jelenlétében való differenciáltatása dendritikus sejt irányában a CD1a⁻ alpopulációnak a növekedéséhez vezet, amely magasabb pinocitózissal és fagocitáló képességgel rendelkezik, mint a CD1a⁺ alpopuláció. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy az apoptótikus sejt bekebelezése befolyásolható-e a roziglitazon jelenlétében való differenciáltatás által. A frissen izolált monocitákat 5 napig 2,5 μ g roziglitazon jelenlétében differenciáltattuk. Eredményeink azt mutatják, hogy azokban a dendritikus sejtekben, amelyek roziglitazon jelenlétében differenciálódtak, magasabb CD1a⁻ alpopuláció észlelhető, aminek következménye magasabb fagocitáló képesség is.

Apoptótikus neutrofileket fagocitáló dendritikus sejtek által termelt citokinek

Az apoptótikus sejtek bekebelezése a nekrotikus sejtekkel ellentétben nem vezet gyulladásos citokinek felszabadulásához, inkább olyan gyulladást csökkentő citokinek

szekréciónak segíti elő, amelyek képesek visszaszorítani a gyulladást. Ahhoz, hogy dendritikus sejtekből apoptotikus neutrofil hatására felszabaduló citokin termelést vizsgálni tudjunk, az éretlen dendritikus sejteket 8 óráig apoptotikus sejtekkel inkubáltuk együtt, majd a felülúszót összegyűjtöttük. A fagocitáló sejtek egy részét IFN γ -val és LPS-sel is kezeltük, ezáltal megvizsgálva, hogy a dendritikus sejtek érése hogyan képes befolyásolni ezt a citokin felszabadulást. Az eredményeink azt mutatják, hogy az apoptotikus sejtek bekebelezése dendritikus sejtek által a gyulladáshoz IL-8, IL-6, TNF- α valamint IL-1 β szekréciónához vezet. Abban az esetben, ha a sejteket rosiglitazon jelenlétében differenciáltattuk ezen gyulladáshoz citokinek szekrécióna kevesebb volt, kivéve a TNF- α -t, ezáltal alátámasztva azt a korábbi megfigyelést, hogy a CD1a $^{-}$ egy sokkal tolerogénebb populáció mint CD1a $^{+}$ alpopuláció. Az apoptotikus sejt bekebelezése az intracelluláris lipid, fehérje, nukleotid és koleszterol komponensek mintegy kétszeres növekedésével jár. Ezeknek az eltávolítása a fagocitáló sejtől olyan mechanizmusok bekapcsolása révén valósul meg, mint az ABCA1 transzporter, amely működése PPAR és LXR aktiváció által fokozott. Az apoptotikus sejtekben található lipidek befolyásolhatják az endogén lipidek összetételét ugyanakkor ligandként is szolgálhatnak PPAR γ aktiválásához. Eredményeinket tekintve arra következtethetünk, hogy az apoptotikus sejteket nagyobb aránnyal fagocitáló dendritikus sejtek, amelyek magas PPAR γ kifejeződéssel rendelkeznek, tolerogénebbek is; azáltal hogy telítve voltak apoptotikus sejtekkel megőrizték gyulladást csökkentő természetüket.

Ha a fagocitáló dendritikus sejteket LPS és IFN γ -val aktiváltuk e gyulladáshoz citokinek termelése drasztikusan megnőtt. Ebben az esetben IL-12 és IL-10 szekréciónát is észleltünk, mely citokinek igen fontos szerepet töltenek be a gyulladáshoz immunválasz regulációjában. Hasonlóan a nem aktivált dendritikus sejtekhez, ebben az esetben is a rosiglitazon kezelés csökkentette a gyulladáshoz citokinek szekréciónát.

Az apoptotikus sejt bekebelezése IFN γ termelődést indukál autológ limfocitákban

A fenti eredmények ismeretében a következő kérdés az volt, hogy képes-e a fagocitáló és antigén prezentáló dendritikus sejt az autológ perifériás T sejteket TH1 differenciáció irányába elnyomni és IFN γ szekréciónára készíteni? Kísérleteinkben olyan *in vitro* rendszert használtunk, amely *in vivo* gyulladáshoz folyamatot utánoz. Ebben a rendszerben 5 napig differenciáltatott dendritikus sejtet és apoptotikus neutrofil használtunk. A fagocitózist követően a már apoptotikus neutrofilrel kapcsolatban került dendritikus sejtet autológ T sejtekkel inkubáltuk együtt. Párhuzamos kísérletben ugyanazon monocitából differenciáltatott makrofágokat használtunk dendritikus sejtek helyett a fagocitózist vizsgálathoz és T sejt

polarizációhoz. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy ha dendritikus sejteket inkubálunk együtt apoptótikus neutrofilel és perifériás limfocitákkal ez olyan T sejt populációhoz vezetett, amely IFN γ -t termel. Ezzel ellentétben, ha a makrofágokat inkubáljuk együtt apoptótikus neutrofilel és perifériás limfocitával akkor ez az IFN γ -t termelő T sejt populáció nem észlelhető.

Ezen és korábbi eredményeink arra utalnak, hogy az apoptótikus neutrofilek bekebelezése eltérő választ vált ki a mononocitából differenciáltatott makrofágokban és dendritikus sejtekben. Ennél fogva az apoptótikus sejteket bekebelező makrofágok és dendritikus sejtek egymással való kommunikációja a felszabaduló citokinek és antigén prezentálása révén befolyásolhatja az immunválasz kimenetelét gyulladásos folyamatokban vagy más patológiás körülmények között.

ÖSSZEFOGLALÁS

A makrofágok differenciálódás során igen jelentős fagocitáló képesség növekedést mutatnak. A PPAR γ kifejeződése differenciálódás során növekszik. Kísérleteink azt mutatták, hogy PPAR γ antagonistá hozzáadása differenciálódás során a makrofágokhoz, ezen sejtek fagocitáló képességének a csökkenéséhez vezet. Ez apoptotikus sejt specifikus, mert az antagonistá nem befolyásolja opsonizált baktérium bekebelezését. PPAR $\gamma^{\text{fl}/-}$ (makrofágra sepcifikus PPAR γ kiütés) egerekből izolált hasüregi és csontvelői makrofágokat használva észlelhető volt ezen sejtek fagocitáló funkciójának károsodása a PPAR $\gamma^{+/-}$ kontroll egerekhez képest. Gátolva a PPAR γ aktivációt olyan gének kifejeződése csökkent, mint a CD36, AXL, TG2, PTX3, amelyekről ismert, hogy fontos szerepet töltenek be az apoptotikus sejtek bekebelezésében. Gátolva a PPAR γ kifejeződését az apoptotikus sejtek és a szintetikus glükokortikoid, dexametazon, gyulladást csökkentő hatását nem tudtuk befolyásolni, de szignifikánsan gátolni tudtuk az IL-10 szekrécióját. Eredményeink arra utalnak, hogy a monocita–makrofág differenciálódás során olyan PPAR γ ligandok képződhetnek, amelyek az apoptotikus sejtek eltávolításában résztvevő gének kifejeződését és gyulladással immunválaszt szabályozzák.

A dendritikus sejtek fagocitáló képességét makrofágokhoz viszonyítva, vizsgálva eredményeink azt mutatták, hogy az apoptotikus neutrofilek fagocitálása főleg a CD11a⁻ populációnak tulajdonítható és hogy ezt a makrofágokhoz hasonlóan a PPAR γ szabályozza. Ellentétben a makrofágokkal, azok a dendritikus sejtek amelyek neutrofileket kebeleznek be aktiválódnak, amelynek következménye IL-8, IL-6, TNF- α és IL-1 β gyulladással citokinek szekréciója. Abban az esetben, ha az éretlen dendritikus sejteket IFN γ és LPS-sel aktiváltuk, ez a citokin termelés többszörös növekedést mutatott. Az apoptotikus neutrofilek fagocitáló dendritikus sejt képes volt az autológ perifériás T sejteket TH1 differenciáció irányába elnyomni és IFN γ szekrécióra készíteni. Abban az esetben, ha a dendritikus sejtek helyett makrofágot használtunk fagocitáló sejtnek az IFN γ -t termelő T sejtek nem jelentek meg.

Eredményeink arra utalnak, hogy az apoptotikus neutrofilek bekebelezése eltérő választ vált ki a monocitából differenciáltatott makrofágokban és dendritikus sejtekben. Az apoptotikus sejteket bekebelező makrofágok és dendritikus sejtek egymással való kommunikációja a felszabaduló citokinek és antigén prezentálása révén befolyásolhatja az immunválasz kimenetelét gyulladással folyamatokban vagy más patológias körülmények között.

A tézisek alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

Majai, G.*, G. Petrovski*, L. Fésüs. 2006. Inflammation and the apopto-phagocytic system. *Immunology Letters*. 104:94-101. (* mindkét szerző egyenlő arányban járult hozzá)

IF: 2,301

Majai, G., Z. Sarang, K. Csomós, G. Zahuczky, L. Fésüs. 2007. PPARgamma-dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells. *Eur. J. Immunol.* 37:1343-54.

IF: 4,772

Majai, G., P. Gogolák, Cs. Ambrus, Gy. Veréb, L. Fésüs, É. Rajnavölgyi. DC SIGN mediated uptake and activation of dendritic cells by apoptotic neutrophils. Kézirat folyamatban.

Egyéb publikációk:

Petrovski G., G. Zahuczky, G. Majai, L. Fésüs. 2007. Phagocytosis of cells dying through autophagy evokes a pro-inflammatory response in macrophages. *Autophagy*. 3:1-3.

IF: 6,708

Poszterek:

Első szerzős poszterek:

Gyöngyike Majai, Zsolt Sarang, Krisztián Csomós, László Fésüs. PPARgamma dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells ECDO, Chania, Crete, Greece 2004.

Gyöngyike Majai, Zsolt Sarang, Krisztián Csomós, László Fésüs. PPARgamma dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells ECDO, Budapest, Hungary, 2005.

Gyöngyike Majai, Zsolt Sarang, Krisztián Csomós, Gábor Zahuczky, László Fésüs. PPARgamma dependent regulation of human macrophages in phagocytosis of apoptotic cells ECDO, Chia, Sardinia, Italy, September 29-October 4, 2006.

Társszerzős poszterek:

Klára Katona, Gyöngyike Majai, Ralph Rühl, Gábor Zahuczky, and László Fésüs. Dynamic molecular regulation of phagocytosis in the apoptotic cells by macrophages. ECDO, Chia, Sardinia, Italy, September 29-October 4, 2006.

Zahuczky G., G. Majai., G. Petrovski, and L. Fésüs. Gene induction patterns of apopto-phagocytic genes in human macrophages. ECDO, Chia, Sardinia, Italy, September 29-October 4, 2006.

Petrovski G., G. Majai., G. Zahuczky., K. Katona., G. Veréb., W. Martinet. and L. Fésüs. Clearance of dying autophagic cells of different origin by professional and non-professional phagocytes. Induction of pro-inflammatory cytokines during engulfment. Keystone Symposia, Monterey, CA, April, 15-20,2007.

Petrovski G., G. Majai., G. Zahuczky, K. Katona., G. Veréb, W. Martinet and L. Fésüs. Clearance of dying autophagic cells by macrophages induces a pro-inflammatory response. 1st Workshop on the “The Immune Response Against Dying Tumor Cells” (ECDO), Villejuif, France, December 15-17, 2006.

Klára Katona, Gyöngyike Majai, Ralph Rühl, Gábor Zahuczky and László Fésüs. Dynamic molecular regulation of phagocytosis in the apoptotic cells by macrophages. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése. Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 2.

Zahuczky G., G. Majai, G. Petrovski and L. Fésüs. Gene induction patterns of apopto-phagocytic genes in human macrophages. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése. Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 2.

Mádi András, Majai Gyöngyike, Fésüs László: A fagocitáló képességet fokozó dexametazon csökkenti a humán makrofágok felszíni szialiláltságát. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi vándorgyűlése. Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 2.

Mádi András, Majai Gyöngyike, Vámosi György, Cornelia Koy, Szántó Attila, Michael O. Glocker, Fésüs László: A dexametazon kezelés a felszíni szialiláltság csökkentésével fokozza a humán makrofágok fagocitáló képességét. A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése. Debrecen, 2007. augusztus 26-29.