

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A hisztamin különböző receptorain keresztül szabályozza az egér és monocita eredetű humán dendritikus sejtek működését

Simon Tünde

Témavezető: Prof. Rajnavölgyi Éva



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2012

<<<< A hisztamin különböző receptorain keresztül szabályozza az egér és monocita eredetű humán dendritikus sejtek működését>>>>

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Simon Tünde okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit
tagok: Dr. Szegedi Andrea
Dr. Mócsai Attila

A doktori szigorlat időpontja: 2012. június 4., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Mátyus László
Prof. Dr. Jerzy Jochem

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit
tagok: Dr. Szegedi Andrea
Dr. Mócsai Attila
Prof. Dr. Mátyus László
Prof. Dr. Jerzy Jochem

Az értekezés védésének időpontja: 2012. június 4., 13 óra

Bevezetés

A külső környezettel kapcsolatba kerülő határfelületeken (bőr, légző rendszer, gyomor és bél traktus) elhelyezkedő speciális őrzősejtek, a dendritikus sejtek (DS) védelmezik az emlős szervezetet a behatoló kórokozókkal szemben.

1. A DS-ek életciklusa

A csontvelőben képződő DS-ek a vérárammal jutnak el a perifériás limfoid és nem limfoid szövetekbe, ahol kapcsolatba kerülnek a szervezet számára idegen anyagokkal vagy behatoló kórokozókkal. Éretlen állapotban sejtfelszíni receptoraik segítségével különféle molekulákat kötnek meg és változatos mechanizmusok folytán, például fagocitózissal, makropinocitózissal vagy receptor-mediált endocitózissal folyamatosan mintát vesznek a környezetükből. Az antigén feldolgozását követően, peptid fragmentumok formájában MHC molekulákhoz kapcsolva mutatják be azt az antigén specifikus T sejteknek. Az éretlen DS-ek nagyfokú antigén megkötő és feldolgozó képességgel, ám alacsony T sejt aktiváló kapacitással rendelkeznek. Az antigén felvétele és gyulladást keltő mediátorok a DS-ek érését és a környéki nyirokcsomókba történő vándorlását idézik elő, ahol kiváltják a naív T sejtek által mediált immunválaszt. A DS-ek érése összetett és finoman szabályozott folyamat, amelynek során fenotípus- és működésbeli változások zajlanak le. Ilyen például az antigén megkötési képességének elvesztése, a T sejt stimuláló kapacitás növekedése és a kostimulációs molekulák expressziójának emelkedése. Mindezek mellett az érés bizonyos kemokin receptorok kifejeződésének megváltozásával is együtt jár. Amíg a CXCR1, CCR1, CCR5 expressziója csökken, addig a CCR7 kemokin receptor kifejeződése nő a DS-ek érése során, lehetővé téve a sejtek perifériáról nyirokcsomóba történő vándorlását. A CCR7 ligandjai, a CCL19 (MIP-3 β) és CCL21 molekulák konstitutívan termelődnek a nyirokcsomók T sejt zónáiban. A nyirokerekben kifejeződő 6CKine molekula is szerepet játszik a DS-ek irányításában. A limfoid szövetekben a DS-ek a naív T sejteket Th1, Th2, Th17 vagy Treg irányba polarizálják. Ez a folyamat nagymértékben függ a DS eredetű szignáloktól, a sejtek felszínén bemutatott idegen peptid-MHC komplexektől, kostimulációs jelektől és citokin/kemokin szabályozástól. A T sejt receptor (TCR) és specifikus ligandjának kölcsönhatása, mint első szignál elengedhetetlen, míg a második szignált a B7-1 vagy B7-2 molekulák (CD80 és CD86) szabályozzák a T sejtek CD28 receptorán és/vagy egy további környezeti ingeren keresztül aktiválása által. A DS-ek és T sejtek által termelt citokinek szintén szerepet játszanak az immunválasz irányításában és szabályozzák annak intenzitását

és minőségét egyaránt (Th1, Th2, Th17 és Treg sejtek differenciálódása által). A DS-ek által termelt IL-12 vagy IFN γ Th1, az IL-4 vagy IL-5 citokinek Th2 irányba polarizálják a T sejteket, míg az IL-10 immunszuppressziót indukál. A DS-ek antigén bemutató képessége nem korlátozódik csak az endogén peptidek MHCI-en keresztül CD8⁺ T sejteknek, illetve az exogén peptidek MHCII molekulán át CD4⁺ T sejteknek történő prezentációjára, mivel a DS-ek CD1 membrán fehérjékkel komplexet alkotva lipideket és glikolipideket egyaránt bemutatnak valamint endo- vagy exogén antigéneket MHCI molekulákhoz kapcsolatosan is prezentálnak, CD8⁺ T sejteket aktiválva a kereszt prezentációnak nevezett folyamat során.

Szerteágazó működésük következtében az immunsejtek felé közvetített DS eredetű pontos utasítások nélkülözhetetlenek az immunológiai tolerancia kiváltásában a tímuszban és a periférián vagy egy hatékony immunválasz elindításában. A behatoló mikroorganizmus fajtájától, a stressz faktorok vagy veszély jelzések természetétől függően a DS-ek a különböző ingerekre immunválaszt képesek kiváltani.

2. CD1a, a humán DS marker és lipid bemutató molekula

Az MHCI szerű glikoproteinek osztályába tartozó CD1 család tagjai filogenetikailag konzervált fehérjék, melyek hidrofób ligandok, például saját és idegen lipidek és glikolipidek prezentálására szakosodtak. A CD1 fehérjék szekvenciájukat és domén struktúrájukat tekintve homológiát mutatnak az MHCI osztályba sorolt molekulákkal; egy nehéz lánchoz nem kovalensen kötődő β 2 microglobulinból épülnek fel. Jelenlegi ismereteink alapján öt CD1 izoformát különítünk el, amelyek szekvenciájuk szerint további három alcsoportra oszthatók. Az első csoport a CD1a, CD1b és CD1c molekulákból áll, a második és harmadik csoport csak egyetlen fehérjét foglal magába, a CD1d, illetve a CD1e molekulát. A CD1e fehérjét kivéve minden izoforma sejtfelszíni elhelyezkedést mutat. Érdekes módon a humán CD1 fehérjék expressziós mintázata eltér a többi fajétól, mivel emberben öt izoforma van, míg egérben csak a CD1d fejeződik ki. Az első csoport molekulái főként „konvencionális” $\alpha\beta$ vagy $\gamma\delta$ T sejteknek mutatnak be lipid antigéneket, míg a második csoport tagjai (CD1d) invariáns NKT sejteknek (iNKT) prezentálnak. A CD1a molekula, mely az első csoport tagja, főként DS-eken expresszálódik. Emberi vérből három különböző DS frakció nyerhető ki *in vivo*: CD1a⁺CD11c⁺, CD1a⁻CD11c⁻ és CD1a⁻CD11c⁺ populációk. A kétszeresen pozitív populáció a Langerhans sejtek (LS) közvetlen előalakja, mely *in vitro* körülmények között LS-ekké differenciáltatható. A CD1a expressziója hasonló az éretlen és aktivált DS-eken.

3. Hisztamin és hisztamin receptorok (HR)

A hisztamin hatásainak közvetítéséért négyféle HR felelős, amelyek hét transzmembrán doménnel rendelkező, G fehérjét aktiváló molekulák. Az elsőként

felfedezett hisztamin receptor (H_1R) a legkisebb kötési affinitással bíró forma, elsősorban az allergiás reakciókhoz köthető. Tipikus G proteinhez kapcsolt receptor, mely $G_{\alpha q}$ molekulát aktivál. A H_1R ligand kötését követően nő a citoplazma Ca^{2+} és cAMP szintje és aktiválódik az NF κ B útvonal is. Aktivációja a tüdőben hörgő összehúzódást és megnövekedett érátjárhatóságot okoz. A H_1R számos sejttypusban expresszálódik, beleértve a légúti és az ér simaizom sejteket, májsejteket, porcsejteket, idegsejteket, endotél sejteket és immunsejteket.

A hisztamin H_2 receptor (H_2R) az adenilát cikláz és foszfoinozítid másodlagos hírvivő rendszerhez kapcsolódik eltérő GTP függő mechanizmusok által. A receptor kötése a c-Fos, c-Jun és protein kináz C aktiválását váltja ki. A H_2R ligandkötő affinitása egyértelműen felülmúlja a H_1R -ét és ez a receptor forma szintén sokféle sejtben megtalálható. Kezdetben úgy vélték, hogy a H_2R csak néhány folyamat szabályozásában, például a szívizom összehúzódásban vagy a gyomornyálkahártya sósavszekréciójában vesz részt. Mára azonban már egészen világos, hogy a hisztamin sejtosztódásra, differenciációra és immunfolyamatokra kifejtett hatása részben ezen a receptoron keresztül valósul meg.

Az elsősorban a központi idegrendszerben kifejeződő hisztamin H_3 receptor (H_3R) jelentősége többek között a szervezet lokomotorikus aktivitásának, cirkadián ritmusának beállításában van.

2001 folyamán igazolták egy negyedik receptor jelenlétét. A H_4R jellemzően az immunrendszer sejtjein fejeződik ki, a perifériás hematopoetikus sejteken, beleértve az eozinofil, bazofil granulocitákat, hízósejteket, T sejteket és a DS-eket. Az a tény, hogy a H_4R igen széles körben kifejeződik az immunsejteken, előrevetítette szerepét a gyulladás, vérképzés és az immunválasz folyamataiban. A H_4R hatásait G_i/o fehérjék aktiválásán keresztül váltja ki. A G proteinek aktiválása olyan jelátviteli kaszkádot indít el, amelynek következtében Ca^{2+} áramlik be a sejtbe, csökken a cAMP szint, és aktiválódik a MAPK útvonal. Affinitását tekintve a H_4R jobban köti ligandjait, mint a H_1R vagy H_2R , azonban kisebb az affinitása mint a H_3R -é. Az egyre növekvő számú specifikus agonisták és antagonisták ígéretesek lehetnek a gyulladásos és/vagy autoimmun kórképek kezelésében.

4. A hisztamin és a DS-ek kapcsolata

Azok a megfigyelések, amelyek szerint a DS-ek HR-okat expresszálnak, illetve természetes ligandjukat a hisztamint, előrevetítik annak lehetőségét, hogy a hisztamin, származzon a professzionális hisztamin termelő sejteknek számító bazofilokból vagy hízósejtekből, vagy magukból a DS-ekből, hatással lehet a DS-ek működési folyamataira.

A DS-ek kialakulása összetett és finoman szabályozott folyamat, amely fenotípus- és számos molekula expressziós változásával jár együtt. Irodalmi adatok szerint mind a HDC

fehérje expressziója, mind az intracelluláris hisztamin tartalom megnő a humán perifériás vérből származó monociták DS-ekké történő *in vitro* differenciálódása során. Ezzel párhuzamosan számos DS marker sejtfelszíni expressziója (CD80, CD86, CD40, CD45 és CD11c) szintén emelkedést mutat.

A migrációs képesség a DS-ek egyik alapvető jellegzetessége. *In vivo* és *in vitro* adatok szerint a hisztamin különböző HR-okon keresztül szabályozza a DS-ek migrációját, mivel indukálja az intracelluláris Ca^{2+} mobilizációt és F aktin polimerizációt. Mindezekén túl az is igazolódott, hogy a hisztamin vagy HR agonisták erős kemotaktikus tulajdonsággal rendelkeznek az éretlen DS-ek esetében, azonban hatástalannak bizonyultak érett sejteknél.

Egyre több a bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a hisztamin hatással van az antigén prezentációra. A hatékony antigén prezentációban részt vevő kostimulációs és járulékos molekulák expressziója (CD40, CD80, CD86, MHCII) tranziens módon emelkedik hisztamin hatására humán monocita eredetű DS-eken. Azt is kimutatták, hogy a HDC deficiens ($\text{HDC}^{-/-}$) egerekből származó DS-ek, melyeket hisztamin mentes étrenden tartottak, hatékonyabban mutatták be az antigéneket *in vitro* körülmények között, mint WT társaik.

A DS-ek professzionális antigén prezentáló sejtekként hatékonyan indukálják a naiv antigén-specifikus T sejtek aktivációját. A DS-ek érése számos, a T sejt polarizációra ható citokin és kemokin szintézisével jár együtt. A legintenzívebben tanulmányozott citokinek a Th1 típusú IL-12, illetve a Th2 vagy regulatorikus típusú IL-10. A kísérleti eredmények többsége alátámasztja, hogy a hisztamin megváltoztatja a DS-ek citokin termelését és Th2 irányú polarizációt indukál. A hisztamin gátolja az LPS vagy $\text{IFN}\gamma$ által kiváltott IL-12 választ, illetve egyéb gyulladásos citokinek termelését is, mint például az IL-1 β vagy IL-6 produkciót. Ezzel ellentétben jelentős Th2 citokinek szintézise és LPS stimulálta IL-8 és IL-10 termelés szignifikánsan nőtt hisztamin kezelés hatására humán monocita eredetű aktivált DS-ekben. A hisztaminról kimutatták, hogy emeli a Th2-vonzó kemokinek (CCL17, CCL22) termelődését és csökkenti az $\text{IFN}\gamma$ indukálta CXCL10 produkciót humán monocita eredetű éretlen DS-ekben.

Célkitűzés

A DS-ek életciklusuk során gyakran kerülnek kapcsolatba a hisztaminnal. Ismert, hogy ez a multifunkcionális aminosav részt vesz ezen sejtek differenciálódásában és számos funkciójának a szabályozásában. A DS-ek működési folyamatai sokszor nem csak egy HR-hoz köthetőek, mivel a H_1R és H_2R együttes szerepét igazolták ezen sejtek működésében. Azonban a H_4R felfedezését követően az eredmények egy részét újra kell értékelnünk. Ezért két kísérleti rendszerünkben először arra kerestük a választ, hogy a hisztamin milyen hatással van az egér DS-ek migrációjára, adhézíós tulajdonságaira, citokin termelésére valamint antigén bemutató képességére. Ezen túlmenően azt is vizsgáltuk, hogy mindezen hisztamin hatások közvetítésében az utolsóként felfedezett H_4R milyen szerepet tölt be. Kérdéseink megválaszolásához egyrészt gén knock out (KO) modellt, másrészt *in vitro* kísérleti rendszerekben receptor gátlókat alkalmaztunk.

Egér rendszerben feltett kérdések

- HR-ok expressziójának vizsgálata egér lépből izolált DS-eken és csontvelőből történő *in vitro* differenciáltatás során, illetve aktiváció hatására
- A hisztamin *in vitro* antigén prezentációra gyakorolt hatásának vizsgálata
- A H_4R szerepének vizsgálata a WT és $H_4R^{-/-}$ DS-ek antigén prezentációjára
- A hisztamin és H_4R szerepének vizsgálata a DS-ek migrációs és adhézíós folyamataiban
- A H_4R szerepe az aktivált DS-ek *in vitro* citokin termelésében
- A WT és $H_4R^{-/-}$ egerekből izolált DS-ek citokin termelésének összehasonlítása *in vivo* aktivációt követően

Az is köztudott, hogy a humán monocitákból származó $CD1a^-$ és $CD1a^+$ DS-ek eltérő funkcionális sajátságokkal jellemezhetőek, a $CD1a^+$ altípus gyulladásos természetű a $CD1a^-$ sejtekhez képest. A két alpopuláció citokin, kemokin termelése és fagocita tulajdonsága szintén különbözik. Azt feltételeztük, hogy a hisztamin (talán eltérően) hatással lehet a két altípus funkcionális sajátságaira és a kapott eredmények elősegíthetik a hisztamin DS-ekre kifejtett hatásainak, illetve azoknak a betegségeknek a pontosabb megértését, amelyekben ezen sejtek részt vesznek. Ezért a második kísérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy az *in vitro* körülmények között $CD14^+$ monocitákból differenciáltatott $CD1a^-$ és $CD1a^+$ DS alpopulációk

fejlődését és funkcionális sajátosságait hogyan befolyásolja a hisztamin, illetve a tapasztalt hatások melyik HR-on keresztül valósulnak meg.

Humán rendszerben feltett kérdések

- HR-ok expressziójának összehasonlítása a CD1a⁻ és CD1a⁺ humán monocita eredetű DC alpopulációkban
- A hisztamin DS altípusok differenciálódására kifejtett hatásának vizsgálata
- A hisztamin CD1a⁻ és CD1a⁺ DS aktivációban betöltött szerepe
- A hisztamin hatásának vizsgálata a DS-ek citokin és kemokin termelésére
- A hisztamin *in vitro* DS migrációra kifejtett hatásának vizsgálata specifikus receptor blokkolók segítségével

Módszerek

Egér kísérletek

1. Állatok

Kísérleteink során a Balb/c háttérű vad típusú (wild-type WT) és $H_4R^{-/-}$ (H_4R -knockout, H_4R -KO) genotípusú egereket 2-3 hónapos korban használtuk fel.

2. Primer sejtek, sejtkultúrák

a. DS izolálás

WT és $H_4R^{-/-}$ egerek lépéből DS-eket szeparáltunk, mágnesesen jelölt CD11c antitest segítségével. A kapott sejtpopuláció tisztaságát áramlási citometriával ellenőriztük.

b. *In vitro* egér DS differenciáció

Egyes kísérletekben *in vitro* differenciáltatott DS-eket használtunk, amelyeket a Lutz és munkatársai által leírt protokoll szerint állítottunk elő. A sejtek tisztaságát a 10. napon áramlási citometriával ellenőriztük.

3. A DS-ek fenotípus vizsgálata

A HR-ok (H_1R , H_2R , H_4R), illetve a jellemző DS markerek (CD11c, CD11b, MHCII, CD40, CD80, CD86) kifejeződését áramlási citometriával határoztuk meg. A sejtek egy részét hisztaminnal is kezeltük (1 μ M, 10 μ M). Lép DS-ek esetében 4 vagy 19 órás hisztamin kezelést végeztünk, míg a differenciáltatott DS-eket a differenciáltatás 13. napján kezeltük 24 órán át. A DS-ek aktivációja 1 μ g/ml lipopoliszachariddal (LPS) történt (24 óra, 37 °C).

4. *In vitro* antigén prezentáció és IL-2 ELISA

A WT és $H_4R^{-/-}$ egerek lépéből szeparált DS-ek antigén bemutató képességét *in vitro* rendszerben vizsgáltuk. A frissen izolált DS-eket (2×10^3 sejt/well) 96 lyukú tenyésztő lemezen egy, a humán aggregátum peptidre specifikus, 5/4E8 T sejt hibridóma sejtvonallal (2×10^4 sejt/well) tenyésztettük együtt 24 órán keresztül (37 °C) aggregátum G peptid jelenlétében (ATEGRVVRVNSAYQDK, 1 μ g/ml), vagy anélkül (kontroll), 200 μ l DMEM tápfolyadékban. A T sejtek aktivációja IL-2 citokin szekréciót indukált, amelynek mennyiségét 24 óra elteltével a sejtek felülúszójából szendvics ELISA módszerrel mértük a gyártó utasításai szerint.

Vizsgálataink során különböző végkoncentrációjú hisztamint (0.1-100 μ M) illetve 4-metilhisztamint (H_4R agonista, 4-MH, 1-100 μ M) használtunk. A kísérletek egy részében az antigén prezentációs assay-t különböző HR blokkolók, famotidin (H_2R 10 μ M), és JNJ10191584 (H_4R , 10 μ M), illetve hisztamin (1 μ M) jelenlétében végeztük el.

5. *In vitro* migrációs assay

A WT és H₄R^{-/-} DS-ek migrációs kapacitását *in vitro* Transwell migrációs assay segítségével vizsgáltuk. A DS-eket 10⁶ sejt/ml koncentrációban, RPMI médiumban vettük fel, majd a kamrák előinkubálását követően az alsó kamrákba hisztamint (1, 10, 100 µM), vagy 4-MH-t (1, 10, 50 µM) tettünk, míg az inzertekbe 200 µl sejtsuszpenziót (2×10⁵ sejt/inzert) helyeztünk. A sejteket 2 órán át migráltattuk (37 °C), majd áramlási citométerrel határoztuk meg a membránon átvándorolt DS-ek számát egységnyi poliszitirén mikropartikulumra vonatkoztatva.

A differenciáltatott DS-ek migrációjának vizsgálatakor a 0., 3., 6. és 8. differenciálódási napon hisztamint adtunk a sejtekhez (1 µM). A WT és H₄R^{-/-} DS-ek migrációs képességének összehasonlítása a differenciáltatás 10. napján szintén az előbbi protokoll szerint zajlott.

6. Sejtadhéziós assay

A DS-ek adhézióját elektromos impedancia mérésen alapuló real-time technika segítségével, xCELLigence RTCA SP rendszert használva monitoroztuk. Az elektródokat tartalmazó 96 lyukú lemez (E-plate[®] 96) lyukait először 25 µl/well 0,025%-os humán plazma fibronektint és 0,1% zselatint tartalmazó oldattal kezeltük elő (20 perc, 4 °C). A főleges oldat eltávolítása után 100 µl RPMI médiumot pipettáztunk a lyukakba, majd megmértük az alap impedanciát. Ezután a differenciáltatott DS-eket szétosztottuk az E-plate lyukaiba (5×10⁵ sejt/100 µl; 3 paralel). A sejtek adhéziós válaszában változását 10 kHz-en, 12 órán át követtük nyomon. A kapott impedancia változás értékét a Cell Index_i (CI) = (Z_n-Z₀)/F_i összefüggés segítségével adtuk meg. A képletben szereplő Z_n adott idő pillanatban, Z₀ pedig a kezdő időpontban mért elektromos impedancia, míg az F_i egy a frekvenciára jellemző állandó. A Cell Index változását (ΔCI) az alapvonal alapján határoztuk meg. A kapott CI adatokat az RTCA software v1.2 segítségével értékeltük ki.

7. *In vitro* DS stimuláció

A H₄R-nak a DS-ek citokin termelésében betöltött szerepét *in vitro* assay segítségével vizsgáltuk. Lép DS-eket 12 lyukú tenyésztőlemezre osztottuk szét (3×10⁶ sejt/well). A kontroll lyukak kivételével a sejteket 1 µg/ml LPS jelenlétében inkubáltuk (24 óra, 37 °C). Az LPS stimulációt megelőzően a DS-eket 15 percig vagy H₄R agonistával, (4-MH, 0,1 µM), vagy agonistával és H₄R antagonistával (JNJ7777120, 10 µM) együttesen is kezeltük. Ez utóbbi esetben az antagonistát 15 perccel az agonista kezelés előtt adagoltuk. Az inkubációs idő letelte után a sejtekből RNS-t izoláltunk, majd QRT-PCR méréseket végeztünk.

8. *In vivo* DS stimuláció

WT és $H_4R^{-/-}$ egereket 200 μ l PBS-sel, illetve CFA emulzióval intraperitoneálisan oltottunk. Az immunizálás 7. napján az állatok lépéből DS-eket szeparáltunk, a sejtekből RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripció után QRT-PCR-rel mértük a különböző DS citokinek expresszióját.

9. Kvantitatív real-time RT-PCR (QRT-PCR)

Az RNS izolálást RNeasy[®] Mini Kit segítségével végeztük a gyártó előírásai szerint. Ezt követően 2 μ g total RNS-t random primerekkel cDNS-sé írtunk át. Az átírt cDNS-ekből real-time PCR mérés történt. A Taqman rendszeren alapuló kvantitatív real-time PCR vizsgálatokat ABI Prism[®] 7000 PCR automatával végeztük, betartva a gyártó instrukcióit. Az alábbi gének expressziós szintjét vizsgáltuk: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, Gata-3, IL-12, IFN γ , T-bet, CCR7, CCL19. Belső kontrollként GAPDH próbát használtunk. A kapott eredményeket a komparatív C_t módszer segítségével értékeltük ki.

10. Western blot analízis

Az analizálni kívánt fehérje extraktumokat 15 μ g-os aliquotokban vizsgáltuk. A mintákat loading pufferben vettük fel, majd denaturáltuk. Ezután a fehérje frakciókat a kimutatni kívánt fehérje méretétől függő töménységű SDS-PAGE-ban molekulasúly szerint elválasztottuk egymástól. A megfuttatott géleket PVDF membránokra blottoltuk át, majd 4%-os BSA oldattal blokkoltuk. Mosást követően a membránokat primer antitestekkel (H_1R , H_2R , H_4R) inkubáltuk. Újabb mosás után a megfelelő horseradish peroxidase-jelölt (HRP) szekunder antitestet alkalmaztuk, végül az immunreaktív fehérje sávokat egy kemilumineszcens detektáló rendszerrel Retina XBM röntgenfilmeken tettük láthatóvá.

11. Statisztikai elemzések

A mérési eredmények statisztikai feldolgozását a Statistica 8 program segítségével végeztük el az adhézió vizsgálatának kivételével, ahol a statisztikai elemzéshez az Origin 7.0 programot használtuk. A kiértékelendő adatoktól függően T-próbát, egyfaktoros és kétfaktoros varianciaanalízist (ANOVA) használtunk. Post hoc tesztként a Tukey tesztet alkalmaztuk. A mintacsoportok közötti különbségeket 0.05-ös hibaküszöb alatti p értékek esetén tekintettük szignifikánsnak.

Humán kísérletek

1. Monocita izolálás humán perifériás vérből

A perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC) izolálása ficoll gradiens centrifugálással történt. A $CD14^+$ monociták izolálását mágneses sejtszeparálással, anti- $CD14$ -konjugált mikrobeadokkal végeztük el. A sejteket ezután (2×10^6 sejt/ml)

antibiotikummal, IL-4 (100 ng/ml) és GM-CSF (80 ng/ml) citokinekkal kiegészített szérummentes AIMV médiumban vettük fel, majd a differenciáltatás 2. napján az előzőekben feltüntetett citokin mennyiséget adtuk hozzájuk. A sejtek az 5. napra éretlen DS-ekké differenciálódtak. Kísérleteink egy részében az 5. napon a sejtekhez 24 órán keresztül 100 ng/ml LPS-t és 10 ng/ml IFN γ -t adtunk aktiválás céljából.

A kísérletek egy részében a sejteket hisztaminnal (10 μ M), HR antagonistával (10 μ M) vagy a kettő kombinációjával kezeltük a differenciáltatás 0. és 2. napján. Az alábbi HR inhibitorokat alkalmaztuk: pyrilamin (H₁R), famotidin (H₂R), JNJ7777120 és JNJ10191584 (H₄R).

2. A DS-ek fenotípus vizsgálta

A DS-ek fenotípus vizsgálata áramlási citometriával történt anti-CD83-FITC és anti-CD1a-PE antitestek segítségével. A H₂R detektálását indirekt festéssel végeztük el. A fluoreszcencia intenzitást FACS Calibur készülékkel detektáltuk, míg az adatokat a FlowJo software segítségével értékeltük ki. A CD1a⁺ és CD1a⁻ sejtek elválasztása a FACS DiVa high-speed cell sorter segítségével történt.

3. Kvantitatív real-time RT-PCR

A DS-ekből Trizol reagenssel teljes RNS-t izoláltunk, majd 100 ng RNS-t használtunk a reverz transzkripcióhoz, melyet a High Capacity cDNA Archive Kit felhasználásával végeztünk el. A HR-ok, MMP-9 és MMP-12 gének QRT-PCR vizsgálatát ABI PRISM 7900 készüléken végeztük el Taqman gén expressziós assay-k segítségével. A génexpressziós szinteket a komparatív C_t módszer segítségével határoztuk meg GAPDH-hoz vagy 36B4-hez viszonyítva.

4. Citokin mérések

Az érett DS-ek felülszójából 24 órával az LPS+IFN γ aktivációt követően OptEIA kit segítségével határoztuk meg az IL-6, IL-10 és IL-12 citokinek koncentrációját.

5. Migrációs assay

A DS-eket migrációs médiumban vettük fel (0.5 % BSA RPMI) 10⁶ sejt/ml koncentrációban. A MIP-3 β kemokint 200 ng/ml koncentrációban hígítottuk migrációs médiumban és 600 μ l végtérfogatban adtuk az alsó kamrához. A DS-eket 250 μ l végtérfogatban a felső kamrába helyeztük. A kemotaxis assayt 4 órán át végeztük termosztátba helyezve a sejteket. Az átvándorolt sejtek számát áramlási citometriával határoztuk meg, standard bead segítségével.

6. Kemokin array

A CD1a⁻ és CD1a⁺ DS-ek kemokin génjeinek expressziós profilját a Human Chemokines & Receptors PCR Array-vel vizsgáltuk a gyártó utasításai szerint. A különböző sejtpopulációkból RNeasy Mini Kit-tel RNS-t izoláltunk, majd DNáz emésztést követően a

cDNS szintézist a RT² First Strand Kit segítségével végeztük el. A génexpresszió méréshez ABI Prism 7000 real-time PCR berendezést használtunk. Az eredményeket az SABiosciences on-line software-rel értékeltük ki.

Eredmények

Egér kísérletek

1. Az egér lép DS-ek HR expressziója

Elsőként a HR-ok fehérje szintű expresszióját vizsgáltuk CD11c⁺ lép DS-ekben Western blot és áramlási citometria segítségével. Mivel real-time PCR-rel nem detektáltunk H₃R expressziót, így ezt a receptort a továbbiakban nem vizsgáltuk. A H₁R-t 55 kDa-nál, a H₂R-t 40 kDa-nál, míg a H₄R-t 44 kDa-nál detektáltuk Western blottal. Az áramlási citometriás vizsgálatok is megerősítették a H₁R, H₂R és H₄R sejtfelszíni expresszióját lép eredetű DS-eken.

2. HR-ok expressziójának változása a DS differenciálódás során és aktiváció hatására

A csontvelőből származó CD11c⁺ DS-ek HR expresszióját áramlási citometriával vizsgáltuk az *in vitro* differenciáltatás 6., 8., 10., és 13. napján. A H₁R expressziójában nem tapasztaltunk változást, míg a H₂R és H₄R expressziója szignifikánsan csökkent a DS-ek fejlődése során. A DS-eket a differenciáltatás 13. napján LPS-sel kezeltük, majd 24 óra elteltével a H₂R expressziójában nem detektáltunk eltérést, míg a H₄R sejtfelszíni kifejeződése szignifikánsan emelkedett LPS aktiváció hatására.

3. A hisztamin H₄R-ra és a DS-ek *in vitro* peptid bemutató képességére kifejtett hatása

A következő kísérletekben a hisztamin DS funkciókra kifejtett hatását vizsgáltuk. Először egy *in vitro* módszert alkalmazva a hisztamin CD11c⁺ lép DS-ek peptid prezentáló képességére kifejtett hatását teszteltük. WT DS-eket az aggregán specifikus 5/4E8 T sejt hibridóma sejtekkel tenyésztettünk együtt 24 órán át human aggregán peptid jelenlétében, vagy anélkül. A hisztamint különböző koncentrációkban adtuk a ko-kultúrákhoz. A peptid specifikus aktiváció eredményeképpen a hibridóma sejtek 4000-10000 pg/ml IL-2 citokint termeltek, míg antigén hiányában nem következett be T sejt aktiváció. Azért, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a hisztamin által kiváltott IL-2 termelés nem a T sejtekre gyakorolt közvetlen hatás következménye, csak 5/4E8 sejteket, antigént és különböző koncentrációjú hisztamint tartalmazó kontroll lyukakat is készítettünk, melyekben nem detektáltunk IL-2 termelést. Az eredmények azt bizonyítják, hogy a hisztamin szignifikánsan csökkenti a T sejtek IL-2 szekrécióját egy koncentráció függő bifázikus hatást mutatva.

Következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy vajon a H₄R szerepet játszik-e a hisztamin mediálta antigén prezentációra gyakorolt hatásokban. A DS-eket különböző koncentrációjú H₄R agonistával, 4-MH-nal kezeltük, majd mértük az IL-2 mennyiségét. Az alkalmazott koncentrációk közül a 100 µM 4-MH szignifikánsan csökkentette a DS-ek antigén prezentáló

képességét. A hisztamin szerepét specifikus receptor gátlók alkalmazásával tovább vizsgáltuk, a famotidint (H_2R antagonista) és JNJ10191584-et (H_4R antagonista) $10\ \mu M$ koncentrációban, 1 órával a hisztamin kezelés előtt alkalmaztuk. A csak antagonistával kezelt lyukak kontrollként szolgáltak. Azt tapasztaltuk, hogy a H_2R antagonista tovább csökkentette a DS-ek antigén prezentáló kapacitását, míg a H_4R blokkoló visszaállította a hisztamin által csökkentett antigén prezentációt. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a H_4R szerepet játszik a DS-ek hisztamin által kiváltott csökkent peptid bemutatásában.

A következő kísérletben összehasonlítottuk a WT és $H_4R^{-/-}$ DS-ek peptid prezentáló képességét és azt tapasztaltuk, hogy azok a DS-ek, amelyek nem rendelkeznek a felszínükön funkcióképes H_4R -ral szignifikánsan nagyobb antigén prezentáló képességűek, mint a WT-úak.

4. A WT és $H_4R^{-/-}$ DS-ek kostimulátor molekula mintázatának összehasonlítása

Számos adat igazolja, hogy a DS sejtfelszíni molekulák alapvető szerepet játszanak a T sejtek aktiválásában. Ezért megvizsgáltuk, hogy van-e eltérés a WT és $H_4R^{-/-}$ DS-ek jellemző sejtfelszíni és kostimulátor molekuláinak expressziójában, amely magyarázhatja a két genotípus peptid prezentáló képességében tapasztalt eltérést.

Az áramlási citometriás méréseket először WT és $H_4R^{-/-}$ hisztaminnal kezelt (4 és 19 óra) vagy kezeletlen lép DS-ekkel végeztük el. Sem a DS marker CD11c sejtfelszíni megjelenésében, sem az MHCII, vagy a kostimulátor molekulák expressziójában (CD40, CD80, CD86) nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést hisztamin hatására a két állatcsoport között. A következő kísérletben differenciáltatott DS-eket alkalmaztunk, melyeket a differenciáltatás 13. napján különböző koncentrációjú hisztaminnal kezeltünk, majd 24 óra elteltével áramlási citometriával mértük a jellemző sejtfelszíni és kostimulációs molekulák expresszióját. A differenciáltatott DS-ek felszíni marker expressziója sem különbözött számottevően a WT és $H_4R^{-/-}$ DS-ekben, illetve hisztamin hatására. Ezen eredmények alapján a DS-ek antigén prezentációs képességében tapasztalt eltérések magyarázata nem a sejtfelszíni molekulák expresszió változásában keresendő.

5. A hisztamin és H_4R szerepe a DS-ek *in vitro* migrációjában

Kísérleteink során egy *in vitro* migrációs assay segítségével vizsgáltuk a hisztamin, illetve a H_4R szerepét a lép vagy csontvelői eredetű DS-ek migrációjában. Először különböző koncentrációjú hisztamin, vagy 4-MH lépből izolált DS-ek kemotaxisára kifejtett hatását vizsgáltuk Transwell rendszerben. Az átvándorolt sejtek számát áramlási citométerrel határoztuk meg egységnyi polisztrén mikropartikulumra vonatkoztatva. Eredményeink azt

mutatták, hogy sem a különböző koncentrációjú hisztamin, sem a H_4R agonista 4-MH nem befolyásolta szignifikánsan a DS-ek migrációs kapacitását.

Ezután azt a feltételezésünket próbáltuk igazolni, hogy egy hosszan tartó hisztamin kezelés a DS-ek fejlődése során hatással lehet a sejtek migrációs képességére. Ennek érdekében az *in vitro* DS differenciálítás során a sejteket $1\ \mu M$ hisztaminnal kezeltük a 0. és 3., 6. és 8., illetve a 0., 3., 6. és 8. differenciálódási napokon egyaránt. A differenciálódás 10. napján az előzőekben leírtak szerint vizsgáltuk a sejtek migrációját. A hisztamin, habár nem szignifikáns módon, de stimulálta a DS-ek migrációját a kezelés időtartamával egyenes arányban.

Végül a differenciálítás 10. napján összehasonlítottuk a WT és $H_4R^{-/-}$ csontvelői DS-ek migrációját. Azt tapasztaltuk, hogy a H_4R hiányában fejlődött DS-ek szignifikánsan alacsonyabb migrációs képességgel bírtak, mint a WT sejtek.

6. Adhéziós vizsgálatok

A WT és $H_4R^{-/-}$ DS-ek migrációs képességében tapasztalt különbségek hátterének felderítésére a következőkben adhéziós méréseket végeztünk. A differenciált DS-eket a sejtheadhézió mérésére alkalmas speciális elektródokkal ellátott lemezre raktuk. A sejtek viszonylag gyorsan kitapadnak és elterülnek, amely a sejtek beinjektálását követő meredek CI emelkedésként jelenik meg a görbén. Az $1\ \mu M$ koncentrációjú hisztaminnal kezelt DS-ek adhéziós görbéjének lefutása a kontrolléhoz hasonló, viszont annál gyorsabb emelkedést mutatott. Az adhézió mérés elindítása után 2 órával összehasonlítva a kontroll és hisztamin kezelt mintákat megállapíthatjuk, hogy a CI értékében az $1\ \mu M$ -os hisztamin kezelés szignifikáns növekedést váltott ki.

A következő kísérletben arra kerestünk választ, hogy egy krónikus hisztamin hatás a DS-ek differenciálódása alatt befolyásolja-e a sejtek kitapadását. A sejteket eltérő koncentrációjú hisztaminnal kezeltük a 0., 3., 6. és 8. differenciálódási napokon, majd a 10. napon vizsgáltuk a sejtek adhézióját. Mindkét alkalmazott hisztamin koncentráció esetében szignifikáns CI változást tapasztaltunk a kontroll sejtekhez képest, bár az $1\ \mu M$ hisztamin előkezelés a differenciálódás folyamán hatékonyabban tudta fokozni a DS-ek adhézióját, mint a $10\ \mu M$ -os végkoncentrációban adagolt molekula. Az adhéziós görbék meredekségét összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a differenciálódás során alkalmazott hisztamin $1\ \mu M$ -os koncentrációban egy gyorsabb és összességében fokozottabb sejtheadhéziót váltott ki, amire közvetlenül a kísérlet előtt adott amin nem volt számottevő hatással.

Ezután összehasonlítottuk a WT és $H_4R^{-/-}$ DS-ek adhéziós képességét. Habár a mérés kezdetén a különböző genotípusú sejtek hasonló adhéziós karakterisztikát mutattak, a $H_4R^{-/-}$

sejtek átlagos CI-e gyorsabban emelkedett, mint a WT sejteké. 5 óra elteltével a két sejtípus közötti különbség eltűnt. A sejtadhézió gyors fázisa nemcsak a CI relatív nagyságával, hanem a görbe meredekségével is jellemezhető, amely szintén szignifikáns eltérést mutatott a H₄R^{-/-} és WT sejteket vizsgálva. 120 perccel a sejtek szétszétválasztása után a CI szignifikánsan eltérő értéket mutatott összehasonlítva a WT és H₄R-KO DS-eket.

Annak igazolására, hogy valóban a H₄R felelős az előzőekben kimutatott adhézis különbségeért, WT DS-eket H₁R, H₂R és H₄R antagonistával kezeltünk elő és hisztamin jelenlétében, vagy hiányában mértük a sejtek adhézióját. A H₁R és H₂R blokkolása során nem tapasztaltunk számottevő eltérést az adhézis görbe lefutásában sem a kontrollhoz, sem a hisztamin kezelt sejtekhez viszonyítva, míg a H₄R antagonista kezelés hatékonyan visszafordította a hisztamin által kiváltott emelkedett sejtadhéziót.

7. A H₄R hatása az *in vitro* stimulált DS-ek citokin termelésére

In vitro rendszerben megvizsgáltuk, hogy a H₄R specifikus stimulációját követően hogyan változik meg az aktivált lép DS-ek citokin termelése. A DS-ek szeparálását követően a sejteket H₄R agonista 4-MH-nal kezeltük elő 15 percre, majd ezt követően LPS-t adtunk a rendszerhez, és 24 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. Azért, hogy tisztázzuk a H₄R szerepét, a sejtek egy részét a H₄R agonista kezelés előtt 15 perccel antagonistával (JNJ7777120) is kezeltük. A real-time PCR mérés eredményei azt mutatták, hogy az IL-1 β mRNS expressziós szintje szignifikánsan emelkedett az aktivált DS-ek H₄R stimulációja során, míg a specifikus H₄R ligand, JNJ7777120 hatékonyan antagonizálta ezt. A további vizsgált citokinek, IL-6, IFN γ , IL-10, IL-12a és kemokinek, CCL19, CCL2, CCL4, CCR7 expressziójában nem tapasztaltunk szignifikáns változást H₄R stimulációt követően.

8. A H₄R^{-/-} és WT DS-ek *in vivo* citokin termelésének vizsgálata

A DS-ek citokin termelésére vonatkozó adatok nagy része *in vivo* kísérletek eredményein alapul. Azért, hogy bővebb információt nyerjünk a DS-ek citokin termeléséről *in vivo* rendszerben összehasonlítottuk a CFA-val stimulált WT és H₄R^{-/-} DS-ek citokin profilját. Az oltást követő 7. napon real-time PCR-rel mértük a lépből szeparált DS-ekben a Th1, Th2 és Treg válaszokban szerepet játszó citokinek, kemokinek és fő transzkripciós faktorok expressziós szintjét.

Szignifikánsan alacsonyabb IL-10, Gata-3, IL-12 és IFN γ mRNS expressziót detektáltunk a H₄R^{-/-} DS-ekben a WT sejtekkel összehasonlítva. A vizsgált gének közül a CFA kezelés a genotípustól függetlenül szignifikánsan csökkentette az IL-1 β , IL-4, IL-10, CCL19 és CCR7 gének expresszióját. A CFA kezelés után genotípus függő különbségeket is tapasztaltunk: amíg a kezelés csökkentette az IL-6, Gata-3 és T-bet expresszióját a WT DS-

ekben, addig $H_4R^{-/-}$ sejtek esetében hatástalannak bizonyult ezen gének expressziójának befolyásolásában. $H_4R^{-/-}$ DS-ekben az $IFN\gamma$ mRNS szintje emelkedett az *in vivo* CFA kezelés hatására, míg WT DS-ekben expressziója nem változott.

Humán kísérletek

1. A hisztamin szabályozza a monocita eredetű DS-ek differenciációját

Kísérleteink első részében azt tanulmányoztuk, hogy a hisztamin, amely mint ismeretes többféle receptoron keresztül hathat, hogyan befolyásolja a korábban azonosított $CD1a^-$ és $CD1a^+$ DS altípusok differenciálódási folyamatát. IL-4 és GM-CSF citokin kombináció segítségével humán vérből származó monocitákból DS-eket állítottunk elő hisztamin jelenlétében, illetve annak hiányában (0., 2. és 5. nap). Áramlási citometriás méréseink alapján a hisztamin szignifikánsan csökkentette a $CD1a^+$ DS-ek arányát, összehasonlítva a hisztamin hiányában fejlődött sejtekkel. Ezt követően különféle HR antagonistákat alkalmaztunk a differenciáltatás során a hisztamin által kiváltott hatásokért felelős HR azonosítására. Azt tapasztaltuk, hogy a H_2R blokkoló famotidin megakadályozta a hisztamin $CD1a^+$ sejtek képződésére gyakorolt gátló hatását. A H_1R gátló pirilamin tovább csökkentette a $CD1a^+$ sejtek arányát, míg a H_4R antagonisták (JNJ7777120 és JNJ10191584) nem fejtettek ki számottevő hatást. Áramlási citometriával igazoltuk a H_2R jelenlétét a $CD1a^-$ és $CD1a^+$ sejteken, ezzel megerősítettük fehérje szinten is a hisztamin $CD1a^+$ sejtek differenciálódására gyakorolt gátló hatását, illetve a H_2R antagonista ellensúlyozó hatását és a többi HR gátló elhanyagolható szerepét ebben a folyamatban.

2. A $CD1a^-$ és $CD1a^+$ DS altípusok HR expressziója

Több irodalmi adat is alátámasztja a HR-ok expresszióját humán DS-eken, azonban a fenotípusában és működésében eltérő $CD1a^-$ és $CD1a^+$ alpopulációkon eddig még nem vizsgálták jelenlétüket. Ezért QRT-PCR-al megmértük az *in vitro* differenciáltatott, LPS+ $IFN\gamma$ -val aktivált és elválasztott $CD1a^-$ és $CD1a^+$ DS-ek H_1R , H_2R és H_4R expresszióját. H_3R -t nem detektáltunk a szortolt DS-ekben. A H_1R expressziója szignifikánsan magasabb volt a $CD1a^-$ DS-ekben, a H_4R -é $CD1a^+$ sejtekben volt nagyobb, míg a H_2R mindkét altípusban magas expressziót mutatott. A H_2R sejtfelszíni expresszióját fehérje szinten is igazoltuk áramlási citometriával mind a $CD1a^-$, mind pedig a $CD1a^+$ sejteken.

3. A hisztamin hatása a $CD1a^-$ és $CD1a^+$ DS alpopulációk aktivációjára

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a gyulladásos citokinek gátolják a $CD1a^-$ DS-ek $CD1a^+$ sejtekké történő átalakulását és stabilizálják a $CD1a^-$ fenotípust. A hisztamin $CD1a^-$ és $CD1a^+$ DS-ek aktivációjára kifejtett hatásának vizsgálatakor a DS-eket

hisztamin jelenlétében differenciáltattuk, majd az 5. napon LPS+IFN γ citokinek kombinációjával aktiváltuk. A CD1a molekula és az érési markernek számító CD83 sejtfelszíni expresszióját áramlási citometriával monitoroztuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a hisztamin nincs számottevő hatással a CD83 expresszióra és mind a CD1a $^-$, mind a CD1a $^+$ sejtek aktiválhatóak LPS+IFN γ -val. Az *in vitro* differenciáltatás folyamán jelen lévő hisztamin csökkentette a CD1a $^+$ sejtek arányát, ennek következtében csökkent az éretlen és aktivált CD1a $^+$ CD83 $^+$ sejtek aránya, míg a CD1a $^-$ CD83 $^+$ frakció nagyobb lett az érett sejtekben. Összhangban az éretlen DS-ek esetében tapasztaltakkal, a H $_2$ R antagonistá famotidin meggátolta a hisztamin által kiváltott hatást, míg a H $_1$ R antagonistá pirilamin tovább csökkentette a CD1a $^+$ CD83 $^+$ sejtek arányát.

A DS-ek érzékenyek a környezetükben bekövetkező változásokra, és ezáltal számos különböző stimulussal aktiválhatók, melyeknek eredményeképpen különféle citokineket és kemokineket kezdenek el termelni. Azért hogy megvizsgáljuk a hisztamin, illetve a különböző HR antagonisták hatását a DS alpopulációk citokin termelésére, aktivált CD1a $^-$ és CD1a $^+$ sejtek felülúszójából ELISA-val mértük bizonyos jellemző citokinek koncentrációját. Szignifikáns emelkedést detektáltunk a szekretált gyulladásos citokin IL-6, és a regulatorikus citokinnek tekintett IL-10 esetében hisztamin hatására. Ezt a változást a famotidin ellensúlyozta, igazolva ezzel a H $_2$ R szerepét ebben a folyamatban. Az IL-12p70 szekréciója csak magas, >60% CD1a $^+$ sejtaránnyal rendelkező donorok esetében volt detektálható mennyiségű és termelődését nem tudtuk következetesen famotidinnal gátolni.

5. A hisztamin DS migrációra kifejtett hatása

A migráció a DS-ek alapvető és elengedhetetlen sajátossága. A hisztamin különböző receptorain keresztül nemcsak fokozza a sejtek migrációját, hanem ezzel egyidőben az extracelluláris mátrix bontását végző enzimek termelődését is stimulálja. *In vitro* migrációs kísérleteink rávilágítottak arra, hogy a hisztamin jelenléte az monocitából történő DS differenciáltatás során szignifikánsan növeli a DS-ek spontán és MIP-3 β kemokin indukálta migrációs kapacitását. A H $_2$ R antagonistá famotidin visszafordította ezt a hatást, igazolva ezzel a H $_2$ R szerepét a DS migráció szabályozásában. A mátrixot bontó enzimek is esszenciális komponensei a sejt migrációnak. Megvizsgáltuk a jellemző mátrixot bontó enzimek mRNS expresszióját és azt tapasztaltuk, hogy az MMP-9 és MMP-12 enzimek kifejeződése emelkedett hisztamin hatására éretlen és aktivált DS-ekben egyaránt, míg a famotidin gátolni tudta ezt, megerősítve ezzel a H $_2$ R szerepét a migrációs folyamatok szabályozásában.

6. Hisztamin indukálta C5a receptor expresszió a CD1a $^-$ DS alcsoporton

A következő kísérletsorozatban egy Q-PCR alapú kemokin array-t végeztünk el a hisztamin által indukált és H₂R-on át szabályozott DS migrációban szerepet játszó további kemokinek és kemokin receptorok azonosítására. LPS+IFN γ aktivációt követően a hisztamin, famotidin vagy hisztamin és famotidin együttes jelenlétében fejlődött monocita eredetű DS-eket CD1a pozitivitásuk alapján szétválasztottuk és meghatároztuk kemokinek és kemokin receptorok génjeinek expressziós profilját. A C5aR1 esetében emelkedett mRNS expressziót detektáltunk hisztamin jelenlétében a CD1a⁺ sejtekben, amit a famotidin visszaállított a kiindulási szintre. Ezzel szemben hisztamin hatására a C5aR1 fehérje expressziója a CD1a⁻ altípusban nőtt meg szignifikánsan. Ez mind az éretlen mind az aktivált sejtek esetében hasonlóan történt. Mivel a famotidin teljes mértékben visszafordította a hisztamin hatását, így egyértelműen igazolódott a hisztamin H₂R-on keresztüli génexpressziót módosító hatása.

A C5aR1-en kívül további migrációhoz kapcsolódó géneket is azonosítottunk mRNS szinten. A CXCR4 és CX3CR1 gének kifejeződése is szignifikánsan emelkedett hisztamin hatására a CD1a⁺ DS-ekben, míg a másik altípusban a hisztamin nem váltott ki számottevő génexpresszió módosító hatást. A CX3CR1 esetében ezt a hatást famotidinnal gátolni is tudtuk a CD1a⁺ alpopulációban.

Diszkusszió

Bár a DS-ek a leukociták kis populációját alkotják, fontos őrszemekként működnek és változatos biológiai működésekkel jellemezhetőek. Az antigének felvétele, feldolgozása és bemutatása mellett képesek a behatoló organizmusok és ártalmas saját struktúrák eltávolítására szolgáló effektor mechanizmusok irányának, számának és minőségének a szabályozására. Az antigén-specifikus T limfociták aktiválásán, illetve citokinek és kemokinek termelésén keresztül a DS-ek funkcionális hidat képeznek a veleszületett és szerzett immunitás folyamatai között.

A PhD dolgozatban a hisztamin és DS-ek kapcsolatát vizsgáltuk két kísérleti rendszerben. Az egér rendszer segítségével összehasonlítottuk a hisztamin *in vivo* genetikailag módosított egértörzsekből származó DS-ekre és *in vitro* szöveti DS-ekre kifejtett hatásait. A humán rendszerben a hisztamin DS altípusok differenciálódására és működésére kifejtett hatását elemeztük.

A szövettől, sejtípustól, poszttranszlációs módosítástól és a detektálás módjától függően a HR-ok mérete széles határok között változhat. Kísérleteink során immunoblottal és áramlási citometriával igazoltuk a H₁R, H₂R és H₄R expresszióját egér lép eredetű DS-ekben. A Western blottal detektált specifikus H₄R fehérje sávon kívül egy másik, nagyobb molekula tömegű sávot is detektáltunk, mely a receptor glikozilált formájának felelhet meg.

A DS-ek differenciációja összetett, több szinten szabályozott folyamat. A csontvelői eredetű DS-ek *in vitro* differenciáltatása során nem tapasztaltunk változást a H₁R expressziójában, míg a H₂R és H₄R-é szignifikánsan csökkent. Az LPS nem változtatta meg a H₁R és H₂R fehérjék expresszióját, azonban a H₄R expressziója szignifikánsan emelkedett LPS stimulációt követően. Ismert, hogy a humán monocitákból történő *in vitro* DS differenciáltatás során a H₁R és H₃R expressziója csökken, míg a H₄R kifejeződése nő. Kimutatták azt is, hogy a H₄R nagyobb mértékben expresszálódik az éretlen, mint az aktivált CD4⁺ és CD8⁺ T limfocitákban. Ezen adatokra alapozva azt feltételezzük, hogy mivel a különböző HR-ok más-más jelátviteli kaszkádokat aktiválnak, a HR-ok expressziójában megfigyelt eltérések befolyásolhatják a hisztamin által szabályozott hatások erősségét és irányát a sejtek életciklusától és aktivációs állapotától függően.

Az antigén prezentáció a DS-ek alapvető funkciója, mégis a hisztamin ezen DS működésre kifejtett hatásáról kevés adat áll rendelkezésre. Kísérleteinkben a hisztamin koncentráció függő, bifázikus hatást mutatva szignifikánsan csökkentette az egér lép DS-ek antigén prezentációját. A hatás a H₄R-on keresztül valósult meg, mivel a H₄R agonista (4-

MH) a hisztaminhoz hasonlóan, hatékonyan csökkentette a DS-ek peptid bemutató képességét, míg a H₄R antagonista JNJ10191584 csaknem teljesen visszafordította ezt a hatást. Az a megfigyelés, hogy az 5/4E8 T sejt hibridóma sejtek szignifikánsan magasabb IL-2-t termeltek abban az esetben, ha H₄R^{-/-} egerekből származó DS-ekkel stimuláltuk őket, mint WT sejtek jelenlétében, szintén a H₄R szerepét igazolta ebben a hisztamin által szabályozott folyamatban. Azt is megállapíthattuk, hogy egy hosszan tartó H₄R hiánynak sokkal kifejezettebb hatása van az antigén prezentációra, mint a rövid távú antagonista kezelésnek. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a H₄R-on keresztüli hisztamin hatás mind akut módon, az antigén bemutatás folyamata során, mind a DS-ek fejlődése során kialakulhat.

Az antigén prezentáció hatékonyságát számos faktor befolyásolhatja, többek között a DS-ek fajtája, az antigén felvétel és feldolgozás mechanizmusa és a sejtfelszíni kostimulátor molekulák expressziója. A hisztamin H₄R-on át kifejtett antigén prezentációt befolyásoló hatásának molekuláris mechanizmusát nem ismerjük, mivel kísérleteink során nem sikerült kimutatnunk különbséget a hisztaminnal kezelt WT és H₄R^{-/-} lép DS-ek között az MHCII és kostimulátor molekulák sejtfelszíni mintázatában. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy az IFN γ hatással van az antigén prezentáció folyamatában szereplő molekulákra. Mivel azt tapasztaltuk, hogy az IFN γ indukciója sokkal kifejezettebb volt a H₄R^{-/-} DS-ekben, mint WT-úakban, feltételezhetjük, hogy a megnövekedett IFN γ szint összefüggésben lehet a H₄R^{-/-} egerekből származó DS-ek emelkedett T sejt stimuláló kapacitásával.

A DS-ekre számos faktor hat, kemokinek, citokinek és kisebb bioaktív molekulák (például hisztamin), és befolyásolja például a sejtek migrációs és kemotaktikus tulajdonságait. A hisztamin migrációt befolyásoló hatását már régóta ismerjük. A H₄R felfedezése előtt a hisztamin által kiváltott kemotaktikus hatásokat elsősorban a H₁R-nak, illetve a H₂R-nak tulajdonították. Később azonban, különböző immunsejteken, eozinofil granulocitákon, hízósejteken, $\gamma\delta$ T sejteken és természetes ölüsejteken igazolták a hisztamin H₄R-on keresztüli migrációt reguláló hatását. Humán DS-ek migrációs vizsgálata során a H₂R és H₄R szerepét bizonyították a folyamat során, csontvelőből differenciáltatott egér DS-eket illetően pedig a hisztamin H₁R és H₄R-on keresztüli hatását detektálták.

Migrációs vizsgálatainkban sem a különböző koncentrációjú hisztamin, sem pedig a 4-MH nem okozott szignifikáns változást a lépből izolált DS-ek *in vitro* migrációjában. Feltételezve, hogy a lépből szeparált DS-ek kevésbé érzékenyek egy rövid távú hisztamin stimulusra, mint a frissen differenciáltatott sejtek, megvizsgáltuk a sejtek differenciálódása során alkalmazott hosszú távú hisztamin kezelés hatását a migrációra. Azt tapasztaltuk, hogy a migrált sejtek száma hisztamin hatására nőtt, korrelációt mutatva az alkalmazott hisztamin

kezelés időtartamával. Ezt követően összehasonlítottuk a WT és $H_4R^{-/-}$ DS-ek migrációját, és azt tapasztaltuk, hogy a H_4R hiányában fejlődő DS-ek szignifikánsan alacsonyabb vándorlási képességgel rendelkeztek a WT sejtekhez képest, jelezve a H_4R szerepét ebben a folyamatban. Egér DS-ek migrációjával kapcsolatban eddig összesen egyetlen közleményt publikáltak, amelyben, az 1 mmol/l hisztaminnak a H_1R és H_4R -on keresztüli migrációt stimuláló hatását igazolták. Hozzá kell tennünk azonban, hogy mások a hisztamint, és HR ligandokat az említett szerzők által használnál sokkal alacsonyabb koncentrációban alkalmazzák.

A sejtadhézió a sejt migráció elengedhetetlen lépése. Elsőként alkalmaztunk egy impedancia mérésen alapuló módszert a differenciáltatott egér DS-ek adhéziós képességének vizsgálatára. A hisztamin szignifikánsan növelte a DS-ek adhézióját rövid és hosszan tartó kezelésnél egyaránt. A hisztamin által szabályozott hatásokért a H_4R tehető felelőssé, mivel összehasonlítva a WT és $H_4R^{-/-}$ DS-eket, az adhéziót jellemző paraméterek, így a görbe meredeksége illetve a ΔCI is szignifikánsan magasabb volt a H_4R -KO sejtekben, mint a WT-úakban. Ezek az eredmények meglepetéssel szolgáltak, hiszen előzőleg csökkent migrációt detektáltunk a $H_4R^{-/-}$ DS-ekben. Mivel a sejtek letapadása előfeltétele a migrációnak, az észlelt migrációs különbséggel direkt korrelációt mutató adhéziós változást vártunk volna. Azonban egy nemrégiben megjelent közlemény szerint az egér DS-ek letapadása negatívan befolyásolhatja a sejtek migrációját. A H_4R szerepét azok az eredmények is megerősítették, amelyekben az *in vitro* H_4R antagonistá kezelést (JNJ10191584) hatékonyan csökkentette a hisztamin DS adhéziót növelő hatását. Fenti eredményeink igazolták a H_4R részvételét ezekben a hisztamin által indukált folyamatokban, azonban további kísérletek szükségesek annak érdekében, hogy a hisztamin H_4R -on keresztül történő migrációt és adhéziót reguláló szerepéről pontosabb molekuláris információt szerezzünk.

Az aktivált DS-ek által szekretált citokinek és kemokinek alapvető fontosságúak a hatékony elsődleges immunválasz kiváltásában. A DS-ek által termelt szolubilis citokinek repertoárja a sejtek fejlődési stádiumától, illetve érési állapotától is függ. Bizonyított tény, hogy többek között a hisztamin is befolyásolja a DS-ek citokin termelését. A H_4R felfedezését megelőzően főként a H_2R szerepét igazolták a DS-ek hisztamin indukálta Th2 irányú polarizációjában. Ismert, hogy Toll-like receptor szignálok a DS-ekben nemcsak az antigének endocitózisát növelik, hanem a sejtek T sejtekkel történő kölcsönhatásának kimenetelét is befolyásolják. A gyulladás keltő citokinnek számító IL-1 β a természetes immunitás egyik meghatározó molekulája. Az aktivált mononukleáris fagocitákon kívül a DS-ek is fontos IL-1 β termelő sejtek. Mazzoni és munkatársai kimutatták, hogy éretlen humán DS-ekben a

hisztamin gátolta az LPS indukálta IL-1 β expressziót. Ebben a kísérleti rendszerben az általános hisztamin receptor aktivációt kiváltó hisztamint alkalmazták, így valószínűleg a különböző HR-ok hatásainak eredőjeként foghatjuk fel tapasztalt eredményeiket.

Méréseink során H₄R agonista vagy antagonistá kezelést követő LPS stimuláció után mértük az IL-1 β mRNS expresszióját. Eredményeink azt mutatták, hogy az LPS stimulációt követően megemelkedett IL-1 β expresszió szintjét a H₄R agonista (4-MH) kezelés tovább növelte, míg specifikus antagonistá alkalmazásával ez a hatás megszűnt, igazolva a hisztamin H₄R-on át zajló IL-1 β kifejeződést befolyásoló hatását.

A DS-ek citokin termelésére vonatkozó irodalmi adatok túlnyomó többsége *in vitro* kísérletek eredményein alapul, így azért, hogy precízebb információkhoz jussunk ezzel a DS folyamattal kapcsolatban, egy *in vivo* assay-t alkalmaztunk, amelyben a WT és H₄R^{-/-} állatokat CFA emulzióval stimuláltuk, majd összehasonlítottuk a belőlük származó DS-ek citokin profilját. A H₄R^{-/-} állatokból származó DS-ekben szignifikánsan változott mind néhány Th1, mind egyes Th2 irányú citokin mRNS expressziója. A legtöbb közlemény a fentiekkel részben ellentétes eredményekről számol be az *in vitro* kísérleti adatok alapján, nevezetesen a Th2 citokinek emelkedéséről, míg a Th1 jellegű molekulák expressziós szintjének csökkenéséről, illetve mindezen folyamatok elsősorban H₂R által mediált szabályozásáról. Gutzmer és munkatársai humán monocita eredetű DS-ekben csökkent IL-12p70 termelést detektáltak, míg az IL-10 expresszióban nem észleltek változást a hisztaminnal történő kezelést követően. A hatás H₂R és H₄R mediáltnak mutatkozott. A vizsgált molekulákat tekintve a TNF- α expressziójában nem tapasztaltunk változást (sem a kezelés hatására, sem a különböző genetikai háttérű egerek esetén), amely eredmény megegyezik az eddigi irodalmi adatokkal. Néhány molekula esetében a CFA kezelés genotípus függő hatást mutatott; csökkentette az IL-6, Gata-3 és T-bet mRNS-ek expresszióját WT DS-ekben, míg H₄R^{-/-} DS-eknél hatástalannak bizonyult. Az IL-6 expresszió tekintetében eredményeink ellentétesek voltak a Dunford és munkatársai által publikált adatokkal: *in vitro* körülmények között, különböző aktivációs stimulusokat alkalmazva csökkent IL-6 fehérje kifejeződést mértek a H₄R blokkolásával. A CFA kezelés érzékenyebben hatott a H₄R^{-/-} DS-ekre, miáltal azok több IFN γ -t termeltek a WT sejtekhez képest. Munkacsoportunk egyik korábbi közleményében hasonló eltérést detektáltunk összevetve a WT és HDC^{-/-} DS-ek citokin profilját.

Kísérleteink másik részében a hisztamin két, fejlődésében kapcsolatban álló, *in vivo* releváns CD14^{high} monocita eredetű DS altípus differenciálódására és működésére kifejtett hatását vizsgáltuk.

Legfontosabb eredményeink: i.) a hisztamin szabályozta a DS-ek differenciálódását, elősegítve a CD1a⁻ DS-ek fejlődését; ii.) ezt a hatást a H₂R-nak tulajdonítottuk, mivel csak ezen HR specifikus inhibitora tudta helyreállítani a CD1a⁺ sejtek képződését; iii.) kimutattuk, hogy a H₂R magasan expresszálódik mindkét DS altípusban, míg a H₁R és H₄R altípus specifikus expressziót mutatott; iv.) a hisztamin a CD1a⁺ DS-ek differenciálódására kifejtett gátló hatásán keresztül szabályozta a DS-ek aktivációját; v.) a hisztamin által kiváltott CD1a⁺ sejszám csökkenés következtében megnövekedett az IL-6 és IL-10 citokinek szekréciója; vi.) a hisztamin a H₂R-on keresztül, altípus specifikus módon szabályozta a C5aR1 expresszióját, illetve vii.) mindkét altípusban indukálta a DS-ek spontán és kemokin mediálta migrációját és szabályozta az MMP-9 és MMP-12 enzimek termelődését, melyek szintén szerepet játszanak a DS-ek migrációjában.

A DS-ek fejlődése egy összetett és finoman szabályozott folyamat, melyet a sejt aktuális szöveti környezete befolyásol. Nemrégiben fedezték fel, hogy a lipidek és lipoproteinek szabályozzák az I és II típusú CD1 fehérjék sejtfelszíni expresszióját, melyek egyrészt mikrobiális gliko- és foszfolipideket prezentáló molekulák, másrészt a humán DS-ek fenotípus markerei. A hisztamin CD1a expressziót és *in vitro* DS differenciációt befolyásoló hatását már korábbi irodalmi adatok alapján ismerjük. Jelen dolgozatban nemcsak megerősítettük ezeket az eredményeket, hanem kiterjesztettük vizsgálatainkat annak érdekében, hogy igazoljuk a hisztamin más DS funkciókra kifejtett altípus specifikus hatását.

Mivel több DS funkció esetében leírták már, hogy szabályozásuk nemcsak egy HR-ral hozható kapcsolatba, vizsgálataink során a monocitákat hisztamin vagy hisztamin és különböző HR antagonisták (H₁R, H₂R, H₄R) jelenlétében differenciáltattuk. Mivel a famotidin, mely hatékony H₂R antagonista, volt az egyetlen ligand, ami gátolni tudta a hisztamin mediálta CD1a⁺ DS differenciációt, így a H₂R-t azonosítottuk ennek a folyamatnak a szabályozásában.

Számos kutatócsoport mutatta ki a HR-kat humán DS-eken, azonban a CD1a⁻ és CD1a⁺ sejteken eddig nem vizsgálták kifejeződésüket. Hasonlóan mások megfigyeléséhez, mi sem detektáltunk H₃R expressziót a humán DS-ekben, azonban a H₂R magas expressziós szintet mutatott mindkét sejtpopulációban. Érdekes módon a H₁R és H₄R kifejeződése altípus specifikus mintázatot mutatott: a CD1a⁻ DS-ek szignifikánsan magasabb H₁R expressziót mutattak a CD1a⁺ sejtekhez képest, míg a H₄R expressziója a CD1a⁺ sejtekben volt szignifikánsan magasabb. Ez a megfigyelés érdekes kérdéseket vet föl a H₄R szerepével kapcsolatban olyankor, amikor a hisztamin jelenléte miatt a CD1a⁺ DS-ek, melyek magasabb arányban hordozzák a receptort, képződése gátolt. Erre a jelenségre alapozva, illetve

figyelembe véve azt a korábban leírt megfigyelést, hogy a $CD1a^+$ DS-ek gyulladásos természetűek, azokban az egyénekben, akik magas $CD1a^+$ sejt aránnyal rendelkeznek, feltételezhetően súlyosabb gyulladás fejlődik ki hisztamin jelenlétében, mint az alacsony $CD1a$ arányú emberekben. A másik lehetőség, hogy ez az expressziós mintázat szabályozó funkciót tölt be, és befolyásolja a hisztamin mediált hatásokat.

A DS-ek érése különböző sejtfelszíni receptorok közreműködésével valósul meg és számos fenotípusos és működésbeli változással jár együtt. A hisztaminnal kapcsolatban kimutatták, hogy átmenetileg növeli az MHCII fehérjék és a CD40, CD80 és CD86 kostimulátor molekulák expresszióját humán monocita eredetű DS-eken, valamint H_1R és H_2R antagonisták meggátolják a hisztamin indukálta CD86 expresszió változást, viszont a CD40 molekula kifejeződését nem befolyásolják. Amikor a DS-eket LPS+IFN γ -val aktiváltuk, azt tapasztaltuk, hogy a hisztamin által kiváltott $CD1a^+$ DS szám csökkenésnek köszönhetően a $CD1a^+CD83^+$ sejtek száma is csökkent, míg a $CD1a^-CD83^+$ sejt frakció aránya növekedett. Ez a megfigyelés azt bizonyítja, hogy a hisztamin ellensúlyozva a $CD1a^+$ DS differenciációt, hatással van az érett DS alpopulációk eloszlására és azt is igazoltuk, hogy ezek a hatások a H_2R -on keresztül valósulnak meg.

Az aktivált DS-ek egyik jellemző tulajdonsága, hogy különböző citokineket és kemokineket termelnek, amelyek autokrin vagy parakrin módon fejthetik ki hatásaikat. Előzetes eredmények igazolták, hogy a hisztamin megváltoztatja a DS-ek citokin termelését és Th2 irányba tolja el a T limfociták fejlődését. Az is irodalmi tény, hogy az éretlen $CD1a^-$ és $CD1a^+$ DS-ek különböző citokin mintázattal bírnak. Ezekkel az eredményekkel összhangban munkacsoportunk azt figyelte meg, hogy CD40L vagy TLR ligandok által kiváltott aktivációkor mind a $CD1a^-$, mind a $CD1a^+$ DS-ek gyulladásos citokineket kezdtek el termelni. Az IL-12p70 és CCL1 termelése főként a $CD1a^+$ sejteknek volt tulajdonítható, míg az IL-10 citokint elsősorban a $CD1a^-$ sejtek szekretálták. Azok a DS-ek, amelyek hisztamin jelenlétében fejlődtek, majd LPS+IFN γ -val aktiváltuk őket, szignifikánsan több IL-6-ot és IL-10-et termeltek, mint a hisztamin hiányában differenciáltatott sejtek. Ebben az esetben is a famotidin volt az egyetlen inhibitor, amely megakadályozta a hatás kialakulását. Kísérleteink során IL-12p70 szekréciót csak a magas (>60%) $CD1a^+$ sejt aránnyal rendelkező donorok esetében detektáltunk és a famotidin nem fejtett ki számottevő hatást ennek a citokinnek a termelésére, jelezve, hogy az IL-12p70 termelés nem H_2R függő módon szabályozódik. Egy nemrégiben megjelent publikációban az IFN γ -ról kimutatták, hogy emeli a H_4R expressziót, illetve ezen HR stimulálása, az IL-12p70 és CCL2 molekulák termelésének csökkenését eredményezi humán monocita eredetű DS-ekben.

A nyugvó DS-ek jellemző sajátása, hogy migrációs képességük folytán eljutnak mind a test határfelületeire, mind az intersticiális területekre, ahol saját és idegen antigénnel kerülhetnek kapcsolatba. Az antigénnel történő aktivációt követően a sejtek a nyirokáram útján a limfoid szervekbe vándorolnak, ahol megvalósulhat a DS-ek és T sejtek találkozása. Számos független kutatócsoport kimutatta, hogy a hisztamin vagy HR agonisták kemotaktikus hatást fejtenek ki az éretlen DS-ekre, míg az aktivált sejtek migrációját nem befolyásolják. Specifikus receptor antagonistával végzett kísérletek a H₃R és H₁R szerepét igazolták a hisztamin által kiváltott migrációs folyamatok kapcsán. Egy bőr DS migrációs assay-ben a hisztamin és a H₄R agonista egyaránt emelkedett kemotaxist váltott ki, amelyet H₁R és H₄R antagonisták gátoltak. Hasonló eredményeket tapasztaltak *in vitro* csontvelői őssejtekben származó DS-ekkel végzett kísérletekben. Korábbi saját eredményeink a H₄R szerepét támasztották alá az egér DS-ek migrációs folyamataiban.

Migrációs kísérleteinkben a hisztamin növelte mind a spontán, mind pedig a MIP-3 β kemokin indukálta DS migrációt. A famotidin volt az egyetlen HR antagonista, amely visszafordította ezt a hatást. Irodalmi adat, hogy a hisztamin befolyásolja a mátrixdegradáló fehérjék expresszióját, illetve *in vitro* kísérletben kimutatták, hogy a hisztamin növeli az MMP-13 és MMP-3 mátrixbontó enzimek termelődését. Basement membrán újraképző assay-ben és *in vivo* a környéki nyirokcsomóba történő migráció során mérték az MMP-9-nek a DS-ek migrációjában betöltött szerepét. Az MMP-12 expresszióját szintén kimutatták DS-ekben. MMP-ekkel végzett vizsgálataink során a hisztamin növelte az MMP-9 és MMP-12 mRNS-ek expresszióját, a H₂R blokkoló famotidin pedig hatékonyan ellensúlyozta ezt, megerősítve ezzel a H₂R szerepét ebben a DS folyamatban is.

A DS-eknek a perifériás szervek felől a másodlagos nyirokszervek irányába történő vándorlása nagyon komplex folyamat és számos citokin, kemokin és azok receptora vesz részt ennek a folyamatnak a szabályozásában. Azok a kemokin receptorok, amelyek a hisztamin jelenlétében fejlődött és LPS+IFN γ -val aktivált DS-ek érése során indukálódnak, a korábban a vérben található DS-ek legnagyobb hányadát képező sulpho-LacNAc expresszáló DS-ekben (más néven slanDS-ek/MDC-8) azonosított C5aR1, CXCR4 és CX3CR1 molekulákat foglalja magába. Ezek a cirkuláló DS-ek az általuk termelt TNF- α and IL-12p70 citokinek miatt gyulladáskeltő tulajdonságúak, de a CD1c⁺ konvencionális vér DS-ekkel ellentétben nem hordoznak CD11c, CD14 és CD1 markereket. A C5a gyulladást kiváltó mediátor, melyet nemrégiben fedeztek fel monocita eredetű DS-ekben. Receptoráról, a C5aR1-ről kimutatták, hogy a Treg sejtek és Th17 sejtek fejlődését szabályozza. Eredményeink azt mutatták, hogy a

hisztamin jelenlétében fejlődött, LPS+IFN γ által aktivált monocita eredetű DS-ek CD1a⁻ C5aR1⁺ sejtekké fejlődnek.

A CXCR4 kemotaktikus aktivitással rendelkező molekula, melynek expressziója megnő a DS-ekben LPS, TNF- α vagy CD40L által kiváltott aktivációs inger hatására és kapcsolódása a specifikus ligandjának számító CXCL12-vel elősegíti a DS-ek aktivációját, túlélését és kemotaxisát *in vitro* és *in vivo* körülmények között egyaránt. A CX3CR1 transzmembrán fehérje mennyisége nő IFN γ hatására a monocita eredetű TNF/iNOS termelő DS-ekben és szerepe van a DS-ek toborzásában specifikus ligandja, a CX3CL1/fraktalkin által. Eredményeinkre alapozva azt feltételezzük, hogy a hisztamin gyulladást kiváltó szignálokkal együtt hatva meghatározott kemokin receptor kombinációt képes aktiválni, ezáltal szabályozva a monocita eredetű DS-ek működését is. Azonban ez a hatás tovább fokozható a CCL19/MIP-3 β kemokin jelenlétében, mely specifikusan a CCR7-et kifejező aktivált DS-eket vonzza.

A hisztamin DS-ekre kifejtett hatásaira vonatkozóan végzett *in vivo* és *in vitro* kísérleteink bizonyították, hogy a hisztamin számos sejtműködést szabályoz mind egér, mind humán DS-ek esetén. A H₄R hiánya az egér DS-ek megnövekedett antigén prezentáló és adhézios képességét eredményezi. Ezeken túlmenően a H₄R hiánya csökkentette az egér DS-ek migrációját és bizonyos citokinek génexpresszióját, illetve azok indukálhatóságát.

Tapasztalataink szerint a megfigyelt változások sokkal kifejezettebbek a H₄R krónikus hiányakor, mint a receptor akut gátlása során. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a H₄R defektusa mind közvetlen, mind pedig közvetett módon befolyásolhatja a DS-ek működési folyamatait. További eredményeink azt mutatták, hogy a hisztamin markáns hatással van a humán CD1a⁺ DS-ek fejlődésére, mely folyamat központi receptora a H₂R. Ennek a szabályozásnak további következménye a citokin termelésben bekövetkezett változás, amely mint ismeretes, alap állapotban is különbözik a CD1a⁻ és CD1a⁺ sejtekben. Mivel a H₂R magas expressziós szintet mutatott mindkét DS alpopulációban, ez a receptor típus jelentős szereppel bírhat számos DS funkció szabályozásában. Ezzel szemben a H₁R és H₄R altípus specifikus expressziója szabályozó vagy összehangoló szerepet tölthet be a hisztamin által kiváltott működési folyamatokban.

A hisztamin nemcsak az akut gyulladásos folyamatok és azonnali típusú hiperszenzitivitási reakciók fontos mediátora, hanem hatással van a krónikus gyulladásos folyamatokra és számos alapvető immunfolyamatra is. Az is köztudott, hogy a DS-ekre, melyek a belső homeosztázis fenntartásában szerepet játszanak és az akut és krónikus gyulladást is szabályozzák, hatással lehet ez a kis biogén molekula. Ezáltal a hisztamin DS-

ekre kifejtett hatásainak molekuláris mechanizmusáról szerzett ismeretek alapvető fontosságúak a gyulladásos betegségek kezelésére alkalmazott hatékony terápiás stratégiák kifejlesztésében.

Mivel a DS-ek a gyulladásos microkörnyezetben fellelhető hisztamin termelő sejtek, például bazofilok és hízósejtek környezetében fordulnak elő, potenciális célpontjai a hisztaminnak. Kapott eredményeink a hisztamin és DS-ek kapcsolatának néhány érdekes részletére világítottak rá, amelyek segíthetnek a hisztamin által szabályozott folyamatok hátterében álló mechanizmusok megértésében. Természetesen további kutatások szükségesek a hisztamin által befolyásolt immunfolyamatokban részt vevő DS-ek szerepének megértésére vonatkozóan, azonban minden lépéssel közelebb kerülünk ahhoz, hogy a kísérleti eredményeket a klinikumban hasznosíthassuk, különös tekintettel a gyógyszertervezés és fejlesztés területén.



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /12/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Simon Tünde

Neptun kód: UIF8DA

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Simon, T.**, Gogolák, P., Kis-Tóth, K., Jelinek, I., László, V., Rajnavölgyi, É.: Histamine modulates multiple functional activities of monocyte-derived dendritic cell subsets via histamine receptor 2. *Int. Immunol. Epub ahead of print (2012)*
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxr107>
IF:3.301 (2010)
2. **Simon, T.**, László, V., Falus, A.: Impact of histamine on dendritic cell functions. *Cell Biol. Int.* 35 (10), 997-1000, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/CBI20100844>
IF:1.747 (2010)
3. **Simon, T.**, László, V., Lang, O., Buzás, E., Falus, A.: Histamine regulates relevant murine dendritic cell functions via H4 receptor. *Front Biosci (Elite Ed)*. 3, 1414-1424, 2011. *
4. **Simon, T.**, Jelinek, I., Apponyi, G., László, V., Rajnavölgyi, É., Falus, A.: Expression and function of histamine H4 receptor in mouse splenic dendritic cells. *Inflamm. Res.* 59 (Suppl.2), S201-S203, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-009-0130-7>
IF:2.004



További Közlemények

5. **Simon, T.**, F. Semsei, Á., Ungvári, I., Hadadi, É., Virág, V., Nagy, A., S. Vángor, M., László, V., Szalai, C., Falus, A.: Asthma endophenotypes and polymorphisms in the histamine receptor HRH4 gene.
Int. Arch. Allergy Immunol. "accepted by publisher", 2012.
IF:2.235 (2010)
6. Lányi, Á., Baráth, M., Péterfi, Z., Bogel, G., Orient, A., **Simon, T.**, Petrovski, E., Kis-Tóth, K., Sirokmány, G., Rajnavölgyi, É., Terhorst, C., Buday, L., Geiszt, M.: The homolog of the five SH3-domain protein (HOF/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading.
PLoS One. 6 (8), e23653, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023653>
IF:4.411 (2010)

Összesített impakt faktor: 13.698

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 7.052

* A 2009-ben kapott szerkesztői felkéréskor a *Frontiers in Bioscience* szerkesztője levelében egyértelműen utalt a lap impakt faktorára (IF: 3.6 2008), azonban a folyóirat a következő évben 3 szekcióra bomlott s a 2010 évi IF számításnál már csökkentett cikkszámmal jelent meg az új "Landmark edition" (IF: 4.048), az "Elite edition"-ben megjelenő közleményhez pedig nem rendelhető IF. A közleményt a PubMed és Scopus szerepelteti, típusa "peer-reviewed original article".

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.02.13



Poszterek és konferencia előadások:

Detection and function of H4R in spleen-derived dendritic cells

(European Histamine Research Society Konferenciája, Fulda, 2009., poszter prezentáció)

Detection and function of H4R in spleen-derived dendritic cells

(Semmelweis Egyetem PhD Napok Konferencia, Budapest, 2009., poszter prezentáció)

Detection and function of H4R in spleen-derived dendritic cells

(Magyar Immunológiai Társaság Konferenciája, Harkány, 2009., poszter prezentáció)

Role of histamine and its H4 receptor in murine dendritic cell functions

(European Histamine Research Society Konferenciája, Durham, 2010., előadás)

A hisztamin és a hisztamin H4 receptor szerepe az egér dendritikus sejtek működésében

(Magyar Immunológiai Társaság Konferenciája, Szeged, 2010., előadás)

A hisztamin és a hisztamin H4 receptor szerepe az egér dendritikus sejtek működésében

(Semmelweis Egyetem PhD Napok Konferencia, Budapest, 2011., előadás)

Histamine modulates multiple functional activities of monocyte-derived dendritic cell subsets via histamine receptor 2

(World Immune Regulation Meeting VI. Konferencia, Davos, 2012., poszter prezentáció)