

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A rheumatoid arthritis molekuláris pathogenezise:
myeloid eredetű szuppresszor sejtek mint terápiás célpontok**

Dr. Kurkó Júlia Emese

Témavezető: Prof. Szekanecz Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2018

A rheumatoid arthritis molekuláris pathogenezeise: myeloid eredetű szuppresszor sejtek mint terápiás célpontok

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
Klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: **Dr. Kurkó Júlia Emese** általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája
Mozgásszervi betegségek programja keretében

Témavezető: **Prof. Dr. Szekanecz Zoltán**, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Buzás Edit, az MTA doktora

Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja és helye:

DE ÁOK, Szemészeti Tanszék Könyvtára

2018. november 19., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Tarr Tünde, PhD

Prof. Dr. Nagy György, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Nagy György, az MTA doktora

Dr. Tarr Tünde, PhD

Prof. Dr. Buzás Edit, az MTA doktora

Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja és helye:

DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

2018. november 19., 13 óra

1 BEVEZETÉS

1.1 A rheumatoid arthritis pathogenezisének és terápiájának rövid leírása

A rheumatoid arthritis (RA) egy autoimmun gyulladásos betegség, amely a populáció körülbelül 0,5-1%-át érinti, és krónikus synoviális gyulladást okozva végül az ízületek pusztulásához és mozgáskorlátozottsághoz vezet. A genetikai, környezeti tényezők és az autoimmunitás "Bermuda-háromszöge" váltja ki az RA alapjául szolgáló synovitis kialakulását és fenntartását. Az RA öröklődését kb. 60%-ra becsülik. A genetikai tényezők közül a II osztályú fő hisztokompatibilitási antigének/humán leukocyta antigének (MHC, HLA-DR), valamint nem-HLA gének is érintettek az RA pathogenezisében. A részletek ismertetése nélkül, a GWAS vizsgálatok szerint két gén áll a legszorosabb kapcsolatban az RA-ra való fogékonysággal, a *HLA-DR1*, a "shared-epitóp" és a *PTPN22*. Korábban megerősítettük a *HLADRB1*, valamint a *PTPN22* és az *IL23R* SNP-k társulását az RA-val magyar kohorszokban is. A genetikai és környezeti tényezők, valamint az autoantitest (ACPA) termelés és az autoimmunitás váltják ki a synovitist, valamint az ízületi destrukciót. Számos gyulladásos sejt és mediátor játszik szerepet ebben a folyamatban. A T-sejtek központi szerepet játszanak a gyulladásos synovitis fenntartásában. Az autoreaktív T-sejteknek az RA pathogenezisében való részvételét az a genetikai kapcsolat támasztja alá, mely a betegségre való fogékonyság, valamint antigénprezentáló sejtek által expresszált bizonyos MHCII molekulák (HLA-DR) között, illetve a citrullinált autoantigének (autoAg) T-sejtek általi felismerése között fennáll. Az RA synoviális folyadékában (SF) lévő sejtek fő populációját a granulocyták alkotják (veleszületett immunsejtek). Habár az SF granulocytái (főként neutrofilek) és monocytái proteolitikus enzimek, proinflammatorikus citokinek és egyéb káros anyagok felszabadításával jelentős kárt okozhatnak az ízületi struktúrákban, károsíthatják az ízületet infiltráló T-sejteket is, így gátolva ezen T-sejtek lokális expanszióját. A korai diagnózis és az azonnali, hatékony terápia döntő fontosságú az ízületi károsodás, a funkcionális fogyatékoság és a kedvezőtlen betegség kimenetel megelőzése érdekében. A kortikoszteroidok és a nem szteroid gyulladáscsökkentők, mint tüneti szerek mellett számos hagyományos betegségmódosító szer, köztük a metotrexát, a leflunomid és mások, valamint számos biológikum vált elérhetővé az elmúlt években. Az új kezelési stratégiák ellenére nem minden beteg reagál a terápiára, ezért az arthritis megfelelő kezelésének igénye további kutatásokat és fejlesztéseket eredményez az antirheumatikus terápiában. Bár a sejtalapú terápia, mint pl. az autológ csontvelő (bone marrow, BM) átültetése vagy a hematopoietikus őssejtek, ígéretes választás mind a refrakter RA-ban, mind a terápiával szemben rezisztens juvenilis idiopathiás arthritisben, azonban a transzplantáltak klinikai remissziója még mindig nem teljes. Mindezek alapján új terápiás opciók feltárása szükséges a gyulladást kiváltó immunválaszok kontrollálhatósága céljából.

1.2 A myeloid eredetű szuppresszor sejtek szerepe gyulladásban és arthritisben

A myeloid eredetű szuppresszor sejtek (angol irodalomban myeloid-derived suppressor cells, MDSC-k) a veleszületett immunrendszer részét alkotják, és képesek szuppresszálni az adaptív immunválaszokat. Az MDSC-k nem képeznek egy szűken meghatározott sejtsortot, hanem inkább olyan "monocytaszerű" és "granulocytaszerű" sejtek összességét jelentik, amelyek a myeloid hemopoietikus prekurzorokból származnak, heterogén morfológiájúak és fenotípusúak, és képesek a T-sejt válaszok aktív szuppressziójára. Habár az MDSC-k egészséges szervezetben is jelen vannak alacsony számban, különböző pathológiai esetekben képesek felhalmozódni, mint például daganatos betegségekben, fertőzésekben, sepsisben, traumában, graft-versus-host reakcióban, és autoimmun betegségekben (ideértve a gyulladásos bélbetegségeket, az autoimmun uveoretinitist, az alopecia areatát, az 1-es típusú diabetes mellitust, a sclerosis multiplexet és az RA-t). Mivel a különböző pathológiai állapotok során a mikrokörnyezet változhat, az MDSC-k fenotípusa és funkcionális tulajdonságai eltérőek lehetnek különböző körülmények között. Az MDSC-k alcsoportjait és sejtfelszíni markereit sokkal pontosabban írták le egerekben, mivel az egerek összes MDSC-ja expresszálja a közös myeloid markert, a CD11b-t és Gr-1-t. A Gr-1 molekula két epitópja közül az egyikhez kötődő Gr-1 specifikus antitestek (Ly6C és Ly6G) expressziója alapján a következő altípusokat azonosították: a granulocytoid MDSC-ket $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+\text{Ly6C}^{\text{low}}$ fenotípussal, és a monocytoid MDSC-ket, $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^-\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ karakterrel. Az MDSC-k jelenléte a daganatos betegségekben kifejezetten káros, mivel segítenek a tumorsejteknek elkerülni az immunmediált eliminációt. Ezzel szemben az autoimmun betegségek, mint például az RA esetében az MDSC-k szuppresszív aktivitása az autoreaktív T-sejtek ellen, terápiás célokra hasznosítható lehet. A fent említett kóros állapotok közös jellemzője bizonyos szolubilis faktorok (növekedési faktorok, gyulladásos citokinek) széles körű felszabadulása, amelyek nemcsak a célszerveknél fejtik ki hatásukat, hanem megzavarják a csontvelő normál myelopoiesisét is. Ezen tényezők közül néhány elősegíti az MDSC-k expanzióját a myelopoiesis stimulálásával, mások gátolják az érett myeloid sejtek differenciálódását és hozzájárulnak az MDSC-k felhalmozódásához a gyulladás helyén. Korábbi tanulmányunkban kimutattuk, hogy proteoglikán-indukált arthritises (angol irodalomban proteoglycan-induced arthritis, PGIA) egerek ízületeiből származó synoviális folyadék (SF) tartalmazott egy olyan sejtpopulációt, mely myeloid fenotípusú és az MDSC-khez hasonló biológiai aktivitású volt. Adataink azt sugallták, hogy az SF-ben lévő MDSC-k felhasználhatóak terápiás célokra az autoreaktív T-sejtek expanziójának megakadályozásával. Korábbi tanulmányunk, valamint mások által végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy az RA SF sejtjei olyan MDSC-ket tartalmaznak, amelyek képesek korlátozni az ízületeket infiltráló, patogén T-sejteket. Jelen munkánk az első lépését jelenti

azoknak a vizsgálatoknak, melyek az MDSC-k szerepét vizsgálják az RA-ban jelen lévő T-sejt válaszok szabályozásában.

2 CÉLKITÚZÉSEK

Jelen munka célja, hogy a myeloid eredetű szuppresszor sejtek szerepét tárgyalja az autoimmun arthritisek pathogenezisének tekintetében, valamint a jövőbeli lehetséges terápiás lehetőségeket vizsgálja. Ezen célokkal *in vitro* és *in vivo* állatkísérleteket végeztünk, valamint *ex vivo* kísérleteket human mintákkal.

Speciális céljaink a következők voltak:

1. Egy *in vitro* tenyésztési módszer kidolgozása olyan MDSC-k előállítására, melyek hasonló karakterisztikájúak a synovialis folyadékban találhatóakéhoz.
2. Potenciális terápiás lehetőségek feltárása (*in vivo* sejtttranszfer proteoglikán-indukált arthritisben).
3. MDSC-k azonosítása és karakterizálása RA-s betegek synoviális folyadékában.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Állatkísérletes tanulmányok

3.1.1 Egerek, immunizáció, az arthritis súlyossági fokának felmérése

Az érett, nőstény BALB/c egyedek a National Cancer Institute-ból származnak (Frederick, MD, USA). A naiv PG specifikus T-sejt receptor transzgenikus (PG-TCR-Tg) BALB/c egerek lépe szolgált a PG/G1-specifikus T-sejt forrásaként.

Arthritis indukálására 3 alkalommal, 3 hetes időközönként felnőtt vad típusú (wild type, wt) BALB/c nőstény egereket injektáltunk intraperitoneálisan (i.p.) 100 µg humán PG proteinnel. Egy standard vizuál pontszám rendszert alkalmazva mértük fel az arthritis súlyosságát.

3.1.2 Egerekből származó szérum, sejt és szerv begyűjtése

Sejtanalízis és anti-PG antitest szint mérése céljából vért vettünk a mélyaltatásban lévő egerekből. Az egereket szén-dioxid belélegeztetésével termináltuk, és lépet, csontvelőt, nyirokcsomókat gyűjtöttünk. Az SF-ot heparin tartalmú csövekben gyűjtöttük az aktív arthritises bokákból, térdekből és előlábakból (az arthritis foka 8-16 pont egerenként), az ízületek punkciója és finom préselése során. A vörösvérsejteket hipotóniás lízissel távolítottuk el, és sejt szuszpenziókat készítettünk az így kinyert mintából.

3.1.3 MDSC-k és DC-k előállítása csontvelőből

Az MDSC-k előállítása naiv wt vagy EGFP-LysM-Tg BALB/c egerek csontvelőjéből történt. A BM sejteket megszámoltuk és Petri-csészékbe tettük 5×10^5 sejt/ml sűrűségű Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközegben (DMEM; Sigma-Aldrich), amely 10% magzati borjúsérumot (FBS) tartalmaz (Hyclone, Logan, UT, USA). A fenotípusos és funkcionális jellemzők alapján a BM-MDSC előállítás optimális protokollját BM-sejtek 3 napos tenyészetén találtuk rmGM-CSF, rmIL-6 és rmG-CSF (egyenként 10 ng/ml) jelenlétében.

3.1.4 Egér sejtek fenotipizálása áramlási citometriával

A számunkra hasznos sejtek begyűjtése után a sejteket szuszpendáltuk mosópufferben (PBS, amely 0,05% marhasérum albumint és 0,05% nátrium-azidot tartalmazott). Az immunfestést fluorokrómmal konjugált mAb-k (BD Biosciences, eBioscience vagy BioLegend, San Diego, CA,

USA) alkalmazásával hajtottuk végre a következő sejtfelszíni markerek ellen: CD11b (patkány mAb, klón M1/70), Gr-1 (patkány mAb, klón RB6-8C5), Ly6C (patkány mAb, klón HK1.4), Ly6G (patkány mAb, klón 1A8), F4/80 (patkány mAb, klón RM8), CD115 (patkány mAb, klón AFS98), CD80 (hörcsög mAb, klón 16-10A1), CD11c (hörcsög mAb, klón N418), MHCII (I-A^d/I-E^d) (patkány mAb, klón M5/114.15.2), CD86 (patkány mAb, klón GL-1), CD3 (hörcsög mAb, klón 145-2C11), CD4 (patkány mAb, klón GK1.5), és CD25 (patkány mAb, klón PC61). Az áramlási citometriai vizsgálatokat BD FACS Canto II készülékkel végeztük, és az adatokat FACS Diva szoftverrel analizáltuk (BD Flow Cytometry Systems, San Jose, CA, USA).

3.1.5 Egér MDSC-k immunofluoreszcens jelölése és citospin preparátum elkészítése

A BM-MDSC-ket fluorokrómmal jelölt mAb-kkel megfestettük Ly6G-re és Ly6C-re a sejtuszuszenzió egy kis aliquotját elhelyeztük egy 0,5 mm-es mélységű képkalkító kamrába (Invitrogen). A sejteket Prairie Ultima két-foton mikroszkóp rendszerrel (Prairie Technologies, Middleton, WI, USA) vizualizáltuk, és a képeket Imaris szoftverrel (Bitplane, South Windsor, CT, USA) hoztuk létre.

A sejt morfológia elemzéséhez a BM-MDSC-ket illetve az SF-sejteket tárgylemezre centrifugálva levegőn szárítottuk és Wright-Giemsa oldattal (Sigma-Aldrich) festettük.

3.1.6 A GM-CSF, IL-6 és G-CSF szintek mérése egér szérumban és SF-ben

A GM-CSF, az IL-6 és a G-CSF koncentrációját arthritises egerek szérumban és sejtmentes SF mintákban a Peprotech-től származó sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitékkel határoztuk meg. A sorozatban hígított (1:50-1:400) szérumban és SF mintákat, valamint a megfelelő standardokat inkubáltuk anti-GM-CSF, anti-IL-6 vagy anti-G-CSF antitestekkel bevont lemezekre, és a lemezhez kötött részeket a gyártó utasításai szerint detektáltuk. Az abszorbanciát 450 nm-en egy Synergy 2 ELISA olvasó (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) detektálta.

3.1.7 T-sejtek tisztítása és Ly6C^{hi} monocytoid MDSC-k depléciója

A T-sejteket naiv PG-TCR-Tg BALB/c egerek lépéből tisztítottuk negatív szelekcióval, EasySep Mouse T Cell Enrichment Kit alkalmazásával (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada).

A teljes BM-MDSC populációból származó Ly6C^{hi} (monocytoid) sejtek deplécióját EasySep Biotin Selection Kit (StemCell Technologies) alkalmazásával végeztük. A nem kívánatos sejteket Ly6C elleni biotinilált mAb-val (patkány mAb, klón HK1.4) jelöltük, melyet a mAb-vel jelölt T-sejtek immunmágneses depléciója követett. Ez lényegében valamennyi Ly6C^{hi} (de nem Ly6C^{int/lo} Ly6G^{hi}) BM-MDSC-t eltávolított, amit áramlási citometriával igazoltunk.

3.1.8 A T-sejt proliferáció MDSC által közvetített gátlásának meghatározására szolgáló assay-k

Az Ag-függő T-sejt proliferáció gátlásának meghatározásához először a DC-eket egy éjszakán át tenyésztettük a humán PG rekombináns G1 doménjével mint antigénnel (rhG1; 7,5 µg/ml), BM-MDSC-k, Ly6C^{hi}-depletált BM-MDSC-k vagy SF-sejtek (mint szuppresszorok) jelenlétében vagy hiányában, 96 lyukú plate-eken. Naiv PG-TCR-Tg egerek lépéből tisztított T-sejteket adtunk hozzá, és további 5 napig tenyésztettük a következő T-sejt:DC:szuppresszor sejt arányban: 1:0,3:1. A sejteket a tenyésztés utolsó 18 órájában [³H] timidinnel (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) jelöltük (1µCi/lyuk), és az izotóp beépülését cpm-ben (counts per minute, percenkénti beütések száma) mértük egy MicroBeta szcintilláció számlálóban (Perkin Elmer).

A T-sejt proliferáció Ag-independens gátlásának mérése érdekében, a 96-lyukú plate-eket először CD3 (hörcsög mAb, klón 145-2C11) és CD28 (hörcsög mAb, klón 37.51) elleni tisztított monoklonális antitestekkel fedtük be (mindegyikből 1 µg/lyuk 100 µl steril nátrium-karbonát pufferben, pH 9,6). A T-sejteket önállóan adtuk hozzá vagy azonos mennyiségű BM-MDSC-kkel, Ly6C^{hi}-depletált BM-MDSC-kkel, vagy SF sejtekkel mint szuppresszorokkal. A háttér kontrollok T-sejtek voltak, melyeket kezeletlen lyukakban, és szuppresszorok, melyeket anti-CD3/CD28-fedett lyukakban tenyésztettünk. A T-sejt proliferációt a tenyésztés 4. napján mértük.

Minden esetben, a proliferációs assay-k eredményeit a szuppresszió százalékában adtuk meg (a háttér proliferációra való korrekció után) a következő egyenletet használva: szuppresszió % = 100 – [(cpm szuppresszorokkal/cpm szuppresszorok nélkül) x 100].

3.1.9 Reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Total RNS-t izoláltunk BM-MDSC-kból és kontroll lépsejtekből, TRI reagens (Sigma-Aldrich) segítségével a gyártó utasításai szerint. cDNS-t szintetizáltunk SuperScript First Strand kit-et (Invitrogen) használva, és 35 ciklusos (95°C 20 sec-ig, 57°C 30 sec-ig, and 72°C 45 sec-ig) PCR-t végeztünk HotStart Taq Plus enzyme-t alkalmazva (Qiagen, Carlsbad, CA, USA), majd végül 72°C-

on 10 percig alkalmaztuk a C1000 Thermal Cycler készüléket (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Az amplifikáció után a mintákat 1,5% -os agaróz gélekre töltöttük.

3.1.10 Western blot

A BM-MDSC-eket és a kontroll lépsejteket Halt proteáz inhibitor keveréket (Pierce/Thermo Fisher, Rockford, IL, USA) tartalmazó hideg RIPA pufferben lizáltuk, és a fehérjetartalmat bicinchoninic savas assay-vel (Pierce) határoztuk meg. A sejt-lizátumokból származó fehérjéket (egyenként 20 µg) 7,5% -os SDS-PAGE gélre (Bio-Rad) vittük fel és oldottuk fel, redukáló körülmények között. A fehérjéket ezután nitrocellulóz membránokra transzferáltuk. A membránokat anti-egér iNOS mAb-vel (egér mAb, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) blottoltuk 1: 500 hígításban. Torma peroxidáz- (HRP) konjugált nyúl anti-egér IgG1-t (Invitrogen) használtunk másodlagos antitestként 1: 10 000 hígításban. A fehérjesávokat fokozott kemilumineszcencia módszerrel (Amersham/GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) mutattuk ki. A membránokat egy HRP-konjugált, β-actin elleni mAb (egér mAb, klón mAbcam 8226, Abcam, Cambridge, MA, USA) 1: 5000 hígításával újra teszteltük, hogy egyenlő mintaterhelést biztosítsunk.

3.1.11 iNOS aktivitás mérése

Az iNOS enzim aktivitás mérése (NO termelés) 2 napos rágszáló BM-MDSC-k, DC-k és T-sejtek ko-kultúráinak felülúszójából, a nitrit/nitrát kolorimetriás assay-t használtuk a gyártó protokolljának megfelelően (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Az eredményeket teljes nitrátkoncentrációban (µM) fejeztük ki.

3.1.12 PGIA indukálása adoptív transzferrel SCID egerekbe, illetve BM-MDSC transzfer

Adoptívan átvitt PGIA SCID BALB/c egerekben való indukálása érdekében arthritises wt BALB/c donorokból lépsejteket injektáltunk intravénásan SCID recipiensekbe (~10⁷ sejt/egér). Amikor az arthritis kezdett kialakulni (15 nappal a splenocyták átvitele után), az egereket 2 csoportra osztottuk (n=10 egér/csoport). Az egyik csoport kapott egy második transzfert 10⁷ splenocytával és 100 µg human PG-val i.p., a másik csoportot lépsejtekkel és BM-MDSC-kel injektáltuk (~10⁷ sejt minden sejtípusból/egér) azonos dózisú PG-val együtt. Az egereket hetente kétszer vizsgáltuk a betegség aktivitás szempontjából, majd 34 nappal az első sejtttranszfer után termináltuk. Hisztopathológiai és PG-specifikus immunválaszok vizsgálatát végeztük.

3.1.13 PG-specifikus T-sejt válaszok és szérumban antitestek mérése SCID egerekben

A SCID egerek lépeit összegyűjtöttük és a splenocytákat 96 lyukú plate-ekre oltottuk 2×10^5 sejt/lyuk sűrűségben 10% FBS-t tartalmazó DMEM-ben, Ag-ként tisztított humán PG (25 µg/ml) jelenlétében vagy hiányában, három párhuzamosban. A sejteket 5 napig tenyésztettük, a proliferációt pedig a [3 H]timidin beépülés alapján mértük. Az eredményeket stimulációs indexben (SI) fejeztük ki, ami az izotóp beépülés (cpm) aránya PG által stimulált és nem stimulált tenyészetek esetén. A SCID-s egerek szérumban a PG-specifikus antitestek koncentrációját ELISA-val határoztuk meg, ahogyan azt korábban leírtuk.

3.2 Humán vizsgálatok

3.2.1 RA-s betegek

Összesen 11 olyan RA-s beteg vett részt a tanulmányban a Rush University Medical Centerben, akik két klinikán (Section of Rheumatology of the Department of Internal Medicine, and Rheumatology Associates) terápiás ízületi folyadék aspirációban részesültek. A 11 RA-s beteg mindegyike adott SF-ot, és 9-en közülük vért is. Minden betegnél a 2010-es ACR/EULAR klasszifikációs kritériumok alapján állították fel az RA diagnózist és mindenkinek terápiás aspirációt igénylő jelentős ízületi folyadékgyülem volt. Az RA-s betegek (9 nő és 2 férfi) átlagéletkora 50,3 év volt (korcsoport: 33-61 év).

3.2.2 Human (RA-s) ízületi folyadékban lévő sejtek sejtfelszíni markereinek és morfológiájának analízise

Az SF-ből származó sejteket centrifugáltuk (1000 rpm, 10 percig 4°C-on), és steril oldattal mostuk. A sejteket ezután megszámloltuk, és további szeparálás nélkül fenotipikus, morfológiai és funkcionális analízisekhez használtuk. Az SF sejtek egy aliquotját immunológiai módszerekkel jelöltük és feldolgoztuk áramlási citometriához. A sejteket fluorokróm jelölt monoklonális antitestekkel (mAbs) festettük meg a következő felületi markerek ellen: CD11b, CD33, HLA-DR, CD14 és CD15 (eBioscience vagy BioLegend). Az áramlási citometriát BD FACS Canto II eszközzel végeztük, és az adatokat FACS Diva szoftverrel elemeztük. A sejtmorfológia elemzéséhez az SF sejtek egy aliquotját tárgylemezre centrifugáltuk, levegőn szárítottuk és Wright-Giemsa oldattal (Sigma-Aldrich) festettük.

3.2.3 A sejtek izolálása humán perifériás vérből és szuppressziós vizsgálatok

Vénás vért gyűjtöttünk heparin tartalmú csövekbe, és perifériás vérből származó mononukleáris sejteket (angol irodalomban: peripheral blood mononuclear cell, PBMC) *Ficoll-sűrűség gradiens* segítségével izoláltuk (GE Healthcare Life Sciences) a standard protokoll alkalmazásával. A PBMC-ket 96-lyukú plate-kre oltottuk le, a plate-ket korábban bevontuk anti-human-CD3 elleni antitestekkel (1 µg/lyuk; BioLegend) lyukanként 1×10^5 sűrűségben, mely antitestek 10%-os FBS-t tartalmazó DMEM-ben voltak, autológ (nem szeparált) SF sejtek jelenlétében vagy hiányában, 1:1 arányban. Anti-CD28 monoklonális antitesteket (1 µg/lyuk; BioLegend) adtunk minden olyan sejtenyészethez, mely anti-CD3-fedett lyukakban volt. A sejteket 4 napig tenyésztettük, a tenyésztés utolsó 18 órájában [^3H]timidinnel (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) jelöltük (1 µCi/lyuk). Az izotóp beépülését az osztódó sejtekbe cpm-ben mértük egy MicroBeta szcintilláció számlálóban (Perkin Elmer). Három betegből (7-es, 8-as és 9-es RA-s beteg) elegendő mennyiségű PBMC-t és SF sejtet kaptunk, hogy egymás után összehasonlíthassuk az SF sejtek hatását a T-sejtek anti-CD3/CD28-indukált (nem Ag-specifikus) és alloreaktív (Ag-specifikus) proliferációjára. Az Ag-specifikus (allogén kevert leukocyta) válasz indukálására, RA PBMC-ket ko-kultúrában tenyésztettünk eltérő HLA-jú egészséges donor allogén PBMC-ivel, autológ SF sejtek jelenlétében vagy hiányában, RA PBMC : normál PBMC : RA SF sejtek 1:1:1 arányában. Az allogén sejteket a ko-kultúra előtt a sejtosztódás megakadályozására 30 percig Mitomycin C-vel (40 µg/ml; Sigma-Aldrich) kezeltük, az autológ (RA) T-sejtek proliferációját pedig az 5. napon [^3H]timidin beépülés alapján határoztuk meg.

3.3 Statisztikai analízis

Leíró statisztikákat alkalmaztunk az átlag, $\pm$ SEM (standard hiba) és 95% konfidenciaintervallumok (95% CI) meghatározására, hacsak másképp nem jelezzük. A statisztikai analíziseket GraphPad Prism 6 program (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. Az állatkísérleteknél, a paraméteres Student-féle t-próbát vagy a nem parametrikus Mann-Whitney U-próbát alkalmaztuk két adatcsoport összehasonlítására. Többszörös összehasonlításokat a Kruskal-Wallis-teszt alkalmazásával végeztünk, amit Dunn többszörös összehasonlító vizsgálata követett. Az ismételt mérésekből származó adatok elemzését a kétirányú ismétlődő mérések varianciaanalízise alapján végeztük. A humán vizsgálatoknál páros t-próbát és páros Wilcoxon-próbát alkalmaztunk (adott esetben) statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségek kimutatására a cpm értékekben és az RA PBMC-k proliferációs arányaiban a különböző tenyésztési körülmények között. Minden esetben 0,05-nél kisebb p értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A G-CSF, GM-CSF és IL-6 jelenlétében tenyésztett rágcső BM sejtek az SF-MDSC-khez hasonló sejtpopulációhoz vezetnek

Előkísérletek során meghatároztuk, hogy a GM-CSF és IL-6 jelenlétében 3-7 napig tenyésztett csontvelői sejtek felveszik-e az SF-MDSC-szerű fenotípust. A csontvelői sejt kultúrához a granulocytoid vonalat erősítendő G-CSF-et adtunk, ami a csak Ly6G-t expresszáló sejtpopuláció termelődéséhez, vagy (magas szinten) Ly6G-t és alacsony vagy közép szinten a monocytoid MDSC marker Ly6C-t ko-expresszáló sejtek termelődéséhez vezetett. Ezt a fenotípust 3 napos tenyésztéssel érték el GM-CSF, IL-6 és G-CSF jelenlétében (egyenként 10 ng/ml). Csontvelőből SF-MDSC-szerű sejtek előállítására szolgáló növekedési faktoroknak azért ezt a kombinációját választottuk, mert azt találtuk, hogy a PGIA-s egerek synoviális folyadéka nagy mennyiségű GM-CSF-et és G-CSF-et tartalmazott, és detektálható mennyiségű IL-6-ot. Minden esetben, ezen faktorok SF koncentrációja meghaladta a szérum szintekét. A BM-MDSC-szerű sejtek áramlási citometriai profilja és morfológiája nagyobb heterogenitást mutatott, mint a friss SF-sejteké, ami arra utal, hogy a kettős pozitív Ly6G^{hi}Ly6C^{int/lo} sejtek domináns populációján kívül (melyek az SF-ben is jelen vannak), a BM-MDSC tenyészetek különböző éretlen myeloid sejteket is tartalmaztak átmeneti (intermediate) fenotípusokkal.

4.2 A BM-MDSC-k képesek mind az Ag/DC-dependens, mind az Ag-independent T-sejt proliferációt szuppresszálni *in vitro*

Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk a BM-MDSC-szerű sejtek Ag-specifikus T-sejt proliferációra kifejtett hatását, Ag (rhG1)-fedett DC-ket tenyésztettünk naiv PG-TCR-Tg egerek lépéből izolált T-sejtekkel, BM-MDSC-k mint szuppresszorok jelenlétében vagy hiányában. További "szuppresszorok" (összehasonításképp) voltak az SF sejtek, és a Ly6C^{hi} sejtekben depletált BM-MDSC-k. Az Ag-függő T-sejt proliferáció drámai módon csökkent BM-MDSC jelenlétében, vagyis a BM-MDSC-mediált szuppresszió közel 100% -ot ért el. Az SF sejtekkel összehasonlítva a BM-MDSC-k ugyanannyira hatásosak voltak a T-sejt proliferáció szuppressziójára. Amint az az SF sejteknél is ismert, a BM-MDSC-k Ly6C monocytoid alcsoportjának depléciója nem csökkenti a szuppressziós kapacitásukat. Az Ag-specifikus T-sejt proliferáció BM-MDSC-mediálta szuppresszióját mind az intracelluláris citokineket (IFN γ a T_H1 és IL-10 a T_H2 sejtekben) tartalmazó CD4⁺ T helper (T_H) sejtek százalékos arányának, mind a T_{REG} sejtek (FoxP3-at tartalmazó CD4⁺CD25⁺ sejtek) százalékos arányának szignifikáns csökkenése kísérte. Annak érdekében, hogy eldönthessük, hogy a BM-MDSC-k a T-sejt proliferációra kifejtett szuppresszív hatása Ag-dependens (amihez a DC-

k jelenléte szükséges) vagy Ag-independens volt-e, PG-TCR-Tg T-sejteket stimuláltunk anti-CD3 vagy anti-CD28 monoklonális antitestekkel BM-MDSC-k jelenlétében vagy hiányában. Ebben az Ag/DC-független rendszerben a BM-MDSC-k szintén erős szuppresszor aktivitást mutattak, míg az SF sejtek általi szuppresszió nagyon gyenge volt. Várakozásunknak megfelelően, az Ly6C^{hi} sejtek deplécióna nem csökkentette a BM-MDSC-k szuppressziós kapacitását a T-sejtek anti-CD3/CD28-indukált proliferációjára.

4.3 A BM-MDSC-k T-sejtekre gyakorolt szuppresszív hatását az iNOS inhibitorok in vitro megfordíthatják

Annak érdekében, hogy feltárjuk, hogy a BM-MDSC-k szuppresszív aktivitásának mi a lehetséges mechanizmusa, megismételtük az Ag-függő és Ag-független T-sejt proliferációs vizsgálatokat az MDSC-k ismert effektor molekulák különböző inhibitorainak jelenlétében vagy hiányában; mint pl. argináz 1 (nor-NOHA), iNOS (L-NMMA és a szelektívebb 1400 W) és ROS (kataláz). Egy kaszpáz (apoptózis) inhibitor (Z-VAD-FMK) használtunk MDSC-független kontrollként. Mind az Ag (rhG1)-, mind az anti-CD3/CD28-indukált T-sejt proliferáció elnyomva maradt az argináz 1 inhibitor, a ROS scavenger, vagy a kaszpáz inhibitor jelenlétében. Azonban, a BM-MDSC-k T-sejt proliferációt szuppresszáló képessége nagymértékben csökkent mindkét indukciós rendszerben iNOS inhibitorok jelenlétében, ami arra utal, hogy a T-sejtek szuppresszióját közvetítő fő MDSC termék a NO volt.

4.4 A BM-MDSC-k upregulált iNOS expressziót és emelkedett NO termelést mutatnak

A BM-MDSC-kben a lépsejtekkel összehasonlítva szignifikánsan upregulálva volt a *Nos2* mRNS-e, míg a háztartási gén (*Actb*, mely a β -actint kódolja) azonos mennyiségben expresszáldott. A Western blot eredményei megegyeztek az RT-PCR eredményeivel, nagy mennyiségű iNOS fehérjét (~130 kDa) mutattak BM-MDSC-kben, szemben a lépsejtekkel. Az iNOS enzimatisz aktivitását a nitrit/nitrát koncentráció (mint a NO termelés indikátorai) mérésével határoztuk meg, BM-MDSC-k (DC-k és rhG1 jelenlétében tenyésztve T-sejtekkel vagy anélkül) és lépsejtek kultúráinak felülúszójában. Összhangban az iNOS expresszió eredményeivel, sokkal magasabb NO szinteket mértünk a BM-MDSC-kezt tartalmazó kultúrák felülúszójában, mint a lépsejtekében.

4.5 BM-MDSC-kkel történő sejtttranszfer csökkenti az Ag-specifikus immunválaszt és javítja az adoptívan átvitt arthritist SCID egerekben

A 0. napon arthritis-es wt BALB/c donor egerek lépsejtjeit injektáltuk SCID recipiensekbe Ag-nel (human PG). Amikor az arthritis klinikai jelei kezdtek kialakulni az egereket 2 csoportba osztottuk hasonló betegségaktivitási értékekkel, majd egy második injekció következett. Az első (kontroll) csoport csak arthritis-es lépsejteket és PG-t, míg a második ugyanezt plusz BM-MDSC-t kapott. Az arthritis súlyossági értékei a kontroll csoportban tovább nőttek, míg ezzel éles ellentétben, a BM-MDSC-vel kezelt SCID egerek értékei alacsonyak maradtak a követési idő (34. nap) végéig. A hisztopathológiai kép masszív leukocytá infiltrációt és synoviális hyperplasiát, valamint porc eróziót írt le az arthritis-es donorok lépsejtjeivel injektált kontroll SCID egerek boka (tibio-talaris) ízületeiben. Ezzel szemben, csak enyhe synovialis hyperplasia volt megfigyelhető a lépsejtekkel és BM-MDSC-kkel injektált SCID egerek bokázületeiben. A PG-specifikus T-sejt proliferáció szignifikánsan kisebb mértékű volt a BM-MDSC-injektált csoportban. Az IgG1 izotípusú anti-PG antitestek szérum szintjei szintén szignifikánsan alacsonyabbak voltak a BM-MDSC-t kapó csoportban. Egy különálló kísérletben meghatároztuk az átvitt EGFP⁺ BM-MDSC-k eloszlását és alcsoport megoszlását PGIA-val adoptívan transzferált SCID egerek különböző folyadékaiban és szöveteiben 19 nappal a BM-MDSC injekció után (ami ugyan fele volt az optimális terápiás dózishoz, de így lehetőség nyílt SF nyerésére). A perifériás vér, a synoviális folyadék és a csontvelő jól detektálható Ly6C^{int}Ly6G^{hi} (granulocytoid) sejtpopulációkat, de sokkal kisebb mennyiségű Ly6C^{hi}Ly6G⁻ (monocytoid) sejtpopulációkat tartalmazott.

4.6 Az MDSC-khez hasonló fenotípusú és morfológiájú sejtek jelen vannak az RA-s betegek synoviális folyadékában

Az MDSC-szerű sejtek keresését áramlási citometriával végeztük 11 RA-s betegből gyűjtött SF minták vizsgálatával. Az MDSC-k felszíni markerei elleni monoklonális antitesteket alkalmaztunk; ilyen marker például a közös myeloid marker CD11b, az „éretlen” myeloid sejt marker CD33, MHCII (HLA-DR), a monocytoid MDSC altípus marker CD14 és a granulocytoid altípus marker CD15. Az RA synoviális folyadékában a predomináns sejttípus a CD11b⁺CD33⁺HLA-DR^{lo/-}CD14⁻CD15⁺ granulocytoid MDSC volt, de egy kis populáció a CD11b⁺CD33⁺HLA-DR^{lo/-}CD14⁺CD15⁻ monocytoid altípusból szintén jelen volt. Az MDSC-szerű sejtek az összes SF sejt ~85%-át alkották, és ezeknek az MDSC-szerű sejteknek ~95%-a tartozott a granulocytoid alcsoporthoz.

4.7 A RA-s betegek synoviális folyadékának sejtjei jelentősen szuppresszálják az autológ T-sejtek anti-CD3/CD28-indukált proliferációját

Annak meghatározásához, hogy az RA-s synoviális folyadékban azonosított MDSC-szerű sejtek valóban szuppresszív tulajdonságokkal rendelkeznek-e, anti-CD3/CD28 monoklonális antitestekkel stimuláltuk a (PBMC-ben jelen lévő) T-sejteket, ugyanabból a betegből származó SF sejtek jelenlétében vagy hiányában. A PBMC-ben lévő anti-CD3/CD28-stimulált T-sejtek kevésbé proliferáltak autológ SF sejtek jelenlétében, mint annak hiányában, ahogyan azt a teljes [³H]timidin beépülés különbsége mutatta. A nem stimulált PBMC-k vagy az anti-CD3/CD28-kezelt SF sejtek izotóp beépülése (cpm) alacsony volt, de még detektálható. 9 RA-s betegből származó PBMC-ket és SF sejteket teszteltünk ugyanabban az *in vitro* rendszerben, és azt találtuk, hogy az SF sejtek minden betegben szuppresszálták az anti-CD3/CD28-indukált T-sejt proliferációt. Végül kiszámítottuk a háttér-korrigált proliferációs arányokat a vizsgált 9 beteg esetében. Az anti-CD3/CD28-indukált T-sejt proliferáció SF-sejtek által mediált szuppressziója statisztikailag szignifikáns volt ($p = 0,0039$; 95% CI = 0,4682-0,7495).

4.8 Az azonos RA-s betegekéből származó SF sejtek sokkal hatékonyabbak az Ag-specifikus, mint az anti-CD3/CD28-indukált autológ T-sejt proliferáció gátlásában

Összehasonlítottuk az RA-s SF sejtek azonos betegekéből gyűjtött, anti-CD3/CD28-indukált vs. alloAg-indukált autológ T-sejtek proliferációjára gyakorolt hatását.

Ezen RA-s betegek (7-es, 8-as és 9-es beteg) sejt kultúráinak egymás melletti összehasonlítása azt mutatta, hogy az SF sejtek szignifikánsan ($p=0,0389$), de mérsékelten gátolják az anti-CD3/CD28-stimulált autológ T-sejtek jelentős proliferációját, és szintén szignifikánsan ($p=0,0087$), de sokkal effektívebben szuppresszálják ugyanazon T-sejtek Ag-indukált (és sokkal szerényebb) proliferációját. Mivel az ugyanazokból az RA-s betegekéből származó SF sejtpopulációk szignifikánsan ($p=0,0413$) különböző fokú szuppressziót mutattak két különböző tenyésztési körülmény között, ezek az eredmények azt is sugallták, hogy a T-sejt proliferáció gátlása nem egyszerűen a tenyésztés során degranulálódó vagy apoptotikus SF sejtekből felszabaduló citotoxikus anyagok jelenlétével magyarázható.

5 MEGBESZÉLÉS

5.1 Rágcsáló csontvelőből in vitro generált MDSC-k és lehetséges terápiás szerepük autoimmun arthritisben

Az MDSC-k a természetes immunrendszer sejtjei, melyek jelentős képességgel rendelkeznek az adaptív immunválaszok befolyásolására. Bár először tumoros állatokban és rákos betegekben írták le ezen sejteket, MDSC-ket nemrég azonosítottak számos olyan autoimmun állapotban, amelyeket az adaptív immunrendszer túlzott aktivációja jellemez.

Korábban publikáltuk, hogy PGIA-s egerek (az RA elfogadott állatmodellje) synoviális folyadékba egy olyan sejtpopulációt is tartalmaz, mely teljesíti az MDSC-k kritériumait. Adataink szerint a gyulladt ízület a PGIA-ban egy olyan támogató mikrokörnyezet, amelyben a myeloid sejtek túlélnek és főként granulocytoid MDSC-szerű fenotípust és erős szuppresszor aktivitást szereznek a DC-k és az Ag-specifikus T-sejtek irányába. A patogén T-sejtek expansiójának és a DC-k helyi vagy lymphoid szervekben való érésének korlátozásával az SF-ben jelen lévő MDSC-k elnyomhatják a helyi gyulladást, vagy megakadályozhatják az ízületi gyulladás más ízületekbe való terjedését. Ezt a hipotézist legjobban az SF-MDSC-k korai PGIA-fázisban lévő egerekbe történő átvitelével tesztelhetjük. Azonban az egéredetű SF-ből gyűjthető sejtek száma korlátozott, és az SF-MDSC-k nehezen szaporodnak a tenyésztésben. Ezért kerestünk egy alternatív sejtforrást, hogy nagy mennyiségű MDSC-t állítsunk elő, a PGIA-ban való potenciális terápiás beavatkozás céljából (sejttranszfer révén). Mivel a csontvelő jelentős mennyiségű myeloid prekursorot tartalmaz, jó forrásnak tűnt olyan sejtek számára, melyek megfelelő tenyésztési körülmények között SF-MDSC-szerű sejtekké válhatnak.

Ahogy ebben a munkában kimutattuk, rágcsáló BM sejteket GM-CSF, IL-6 és G-CSF jelenlétében 3 napig tenyésztve a domináns populáció a Ly6G^{hi}Ly6C^{int/lo} granulocytoid SF-MDSC-szerű sejtek lesznek, de az ilyen kultúrák intermedier fenotípusú sejtek kisebb populációit is tartalmazzák.

Korábban felvetettük, hogy az ízületbe belépő MDSC prekursorok érés-rezisztens fenotípust szerezhetnek myelopoietikus növekedési faktorokban és citokinekben gazdag környezetben. Valóban, PGIA-s egerek sejtmentes synoviális folyadékában magas GM-CSF és G-CSF, és detektálható mennyiségű IL-6 szinteket találtunk. Ezen faktorok sokkal magasabb szintjét mutattuk ki PGIA-s egerek synoviális folyadékában, mint a szérumban. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a GM-CSF-t, G-CSF-t és IL-6-ot, más proinflammatorikus mediátoroktól eltérően, mind RA-ban, mind PGIA-ban lokális ízületi rezidens sejtek termelik, és valószínűleg támogatják az MDSC-k túlélését és szuppresszor aktivitását az SF-ben.

Azok az MDSC-szerű sejtek, melyeket rágszáló csontvelőből a leírt feltételek mellett létrehoztunk, valódi MDSC-k voltak, mivel jelentős szuppresszív hatást gyakoroltak mind az Ag-specifikus, mind a nem-specifikus (poliklonális) T-sejt proliferációra *in vitro*. Amíg mind a BM-MDSC-k, mind az SF sejtek hasonló módon gátolták az Ag-stimulált T-sejtek expanszióját, az anti-CD3/CD28-indukált poliklonális T-sejt proliferációt a BM-MDSC-k sokkal jobban szuppresszálták, mint az SF sejtek. Ez azt sugallja, hogy az SF sejtek szuppressziós képessége szelektív, míg a BM-MDSC-k képesek gátolni a T-sejt válaszokat Ag-specifikus vagy nem-specifikus ingerekre.

Habár a korábbi nézet az volt, hogy az Ly6G⁺Ly6C^{hi} monocytoid MDSC-k potensebb szuppresszorok, mint a granulocytoid alcsoport, mi azt találtuk, hogy a Ly6C^{hi} szubpopuláció depléciójának ellenére a BM-MDSC-k megtartották a T-sejtek elleni szuppresszív képességüket.

A BM-MDSC-mediált szuppresszió molekuláris mechanizmusát feltáró kísérleteink azt mutatták, hogy az iNOS inhibitorai képesek visszafordítani mind az Ag-specifikus, mind a nem-specifikus T-sejt proliferáció szuppresszióját. Ezzel a megfigyeléssel összhangban, az iNOS mind mRNS, mind fehérje szinten upregulálva volt a BM-MDSC-kben, és a NO nagy mennyiségben volt jelen a BM-MDSC kultúrák felülszintjében. A NO sokféle mechanizmus útján képes gátolni a T-sejtek funkcióját, például a TCR kémiai módosításával, az IL-2 receptor jelátviteli útvonalaiban részt vevő kinázok és transzkripciós faktorok gátlásával. Az RA-val kapcsolatban emelkedett NO koncentrációkat találtak RA-s betegek szérumában és SF-jében, és az SF szintek jóval magasabbak voltak a szérumban mérteknél, ami arra utal, hogy a NO helyben az ízületben termelődik. Mivel az RA-s synoviális folyadék fő sejtpopulációját a granulocytoid fenotípusú sejtek alkotják, ezek lehetnek a NO primer forrásai, így lokális granulocytoid MDSC-ként funkcionálva.

A CD4⁺ sejtek T_H1 alcsoportja által termelt proinflammatorikus citokin, az IFN γ intracelluláris koncentrációját a BM-MDSC-k csökkentették, csakúgy, mint a T_H2 sejtekből származó antiinflammatorikus citokin, az IL-10 koncentrációját. Ezen eredmények különböznek egy mostanában megjelent tanulmány eredményeitől (Park és mtsai). Ezen tanulmány szerint a CIA-s egerek lépéből származó MDSC-k szuppresszív képessége *in vitro* és *in vivo* körülmények között is IL-10 dependens volt. Egyfelől meghatározták különböző antiinflammatorikus molekulák mRNS expresszióját az MDSC-kben és összehasonlításképp a monocytákban. Azt találták, hogy az IL-10 mRNS szintje magasabb volt az MDSC-kben. Másfelől, a T-sejtekből és MDSC-kből álló ko-kultúrákhoz az IL-10 inhibitor hozzáadásával antagonizálható volt a T_{REG} sejtek MDSC-k általi indukciója. Sőt, IL-10 deficiens egerekből származó MDSC-kkel végzett adoptív transzfer során a CIA kialakulása nem volt megakadályozható. A két tanulmány eredményei között lévő különbségek a két eltérő állatmodell (PGIA és CIA) eltérő tulajdonságaiból adódhatnak.

Megfigyeléseink azt sugallják, hogy a BM-MDSC-k szuppressziós hatása nem szelektív és több T-sejt alcsoportra is kiterjedhet, mivel mindhárom $CD4^+$ T-sejt populációja (T_H1 , T_H2 , $CD4^+CD25^+FoxP3^+$) csökkent a BM-MDSC-k jelenlétében.

Számos tanulmány beszámolt több betegség esetén is sikeres intervencióról MDSC-k átvitelével *in vivo*. Highfill és munkatársai tumormentes egerek csontvelőjéből MDSC-ket állítottak elő *in vitro*, GM-CSF, G-CSF és IL-13 jelenlétében. Ezek a sejtek gátolták az allogén sejtek elleni válaszokat *in vitro* és a graft-versus-host betegségben is. A gyulladásos bélbetegség egy állatmodelljében az izolált $CD11b^+Gr-1^+$ sejtek átvitele gátolta az enterocolitist, direkt immunregulációs hatást váltva ki NO termelése révén. Fujii és munkatársai (főként granulocytoid fenotípusú) MDSC-k akkumulációját írták le CIA-s egerek lépében a betegség csúcán. CIA-s egerek lépéből izolált granulocytoid MDSC-k szuppresszálták az anti-CD3/CD28-indukált T-sejtek proliferációját, de az Ag (II-es típusú kollagén)-specifikus immunválaszokra gyakorolt hatását nem vizsgálták. PGIA-ban az SF-MDSC-k Ag-specifikus módon gátolták a T-sejteket, és nem voltak hatékonyak az Ag-independens rendszerben, míg PGIA csúcán a lépéből izolált $CD11b^+$ myeloid sejtek egyik ilyen *in vitro* rendszerben sem voltak szuppresszívak. Ahogyan azt jelen tanulmányban leírtuk, a naiv egerek csontvelőjéből előállított MDSC-k képesek voltak gátolni mind az Ag-specifikus, mind a nem-specifikus T-sejt válaszokat. Ezeket a látszólagos eltéréseket az MDSC-k funkcionális heterogenitása magyarázhatja.

A PGIA adoptív transzfer modelljét alkalmazva azt találtuk, hogy a BM-MDSC-k egyszeri injekciója SCID egerekbe az arthritis első jelei után, gátolta a betegség progresszióját és megelőzte a további ízületi károsodást. Annak megállapítására, hogy a BM-MDSC-k kifejtene-e immunmoduláns hatást *in vivo*, a recipiens egerekben megmértük az Ag-specifikus T-sejt proliferációt, illetve a szérum antitesteket. Az eredmények igazolták, hogy mind a T, mind a B-sejtes válaszok szignifikánsan gátolva voltak a BM-MDSC-vel kezelt egércsoportban.

Az átvitt BM-MDSC-k *in vivo* követése feltárta, hogy ezek az MDSC-k elsősorban a csontvelőben és a synoviális folyadékban akkumulálódtak, ahol a lokálisan termelt myelopoietikus növekedési faktorok és citokinek túlélésüket legjobban támogatták. Ezek az eredmények hangsúlyozzák az MDSC-k ízületekbe irányuló migrációs képességének fontosságát.

Az utóbbi években egyre több adat támasztja alá az MDSC-k terápiás potenciálját az autoimmun arthritisek tekintetében. Érdekes módon, Guo és mtsai ezzel ellentétes adatokat közöltek, melyek szerint pozitív korrelációt találtak az MDSC-k expanziója és a CIA súlyossága között. A $CD11b^+Gr1^+$ sejtekkel végzett adoptív transzfer során (mely sejteket CIA-s egerek lépéből izoláltak) súlyosbodott a gyulladás mértéke, míg ezen sejtek depletálása a tünetek javulását hozta. Az egymásnak ellentmondó eredmények hátterében az MDSC-k plaszticitása és sokszínűsége állhat. Az eredményeket nagyban

befolyásolja az alkalmazott állatmodell tulajdonsága, a szövet és anatómiai környezet, amelyből az MDSC-ket izolálják, a pontos citokinkörnyezet, és az alapbetegség aktivitása.

Valószínű, hogy az SF-MDSC-k gátolják a (pathogén) T-sejtek ízületi homingját, mind RA-ban, mind a betegség állatmodelljeiben. Fontos megjegyezni, hogy az arthritises ízületek synoviális folyadéka mind RA-s betegekben, mind egerekben nagyon kevés mennyiségű T-sejtet tartalmaz. Ezen kívül, az RA-s betegek SF-jéből izolált T-sejtek a mitogén stimulusokra hyporeaktivitást mutatnak, összehasonlítva ugyanazon betegek véréből származó T-sejtekkel. Lehetséges tehát, hogy az SF-MDSC-k lokálisan korlátozzák a T-sejtek expanszióját, ezáltal hozzájárulva az ízületi gyulladás csökkenéséhez.

Összefoglalva, jelen munkánkban bemutatunk egy olyan *in vitro* eljárást, melynek során nagy mennyiségű MDSC előállítása válik lehetővé rágcsáló csontvelőből, kontrollált és reprodukálható módon. Bizonyítottuk, hogy a rágcsáló BM-MDSC-k, melyek részben hasonlítanak a PGIA-s egerek synoviális folyadékában jelenlévő MDSC-kre, hatékonyan gátolják a T-sejt válaszokat *in vitro* és *in vivo*. Ezek az eredmények betekintést nyújtanak egy olyan veleszületett kontroll mechanizmusba, amely szerepet játszik az immunválaszok szabályozásában és az arthritis pathomechanizmusában RA-s állatmodellekben és valószínűleg humán betegekben is. Jóllehet további vizsgálatok indokoltak, eredményeink azt is sugallják, hogy a csontvelő *in vitro* dúsítása MDSC-ben javíthatja az autológ csontvelő transzplantáció terápiás hatékonyságát súlyos, terápiaerezisztens RA-ban szenvedő betegeknél.

5.2 MDSC-k azonosítása RA-s betegek synoviális folyadékában

Az állatmodellekhez kapcsolódó számos, fentebb leírt tanulmánnyal szemben, az MDSC humán RA-ban betöltött szerepéről sokkal kevesebb beszámoló van. Jiao és mtsai az MDSC-szerű sejtek emelkedett frekvenciáját találták RA-s betegek vérében az egészséges kontrollokéhoz viszonyítva, és negatív korrelációt írtak le RA-s betegekben a cirkuláló MDSC-szerű sejtek és a T_H17 sejtek között. Meg kell jegyeznünk, hogy az MDSC-szerű sejteket pusztán a fenotipikus markerek expressziója alapján azonosították, és ezen sejtek T-sejtekre vonatkozó szuppresszor aktivitását ez a munka nem vizsgálta.

Ezen eredményekkel szemben Guo és mtsai az MDSC-ket az RA pathomechanizmusában mint potenciális proinflammatorikus faktort említik. A szerzők emelkedett számú cirkuláló MDSC-t találtak magas betegségaktivitás esetén, míg az alacsony betegségaktivitásnál és a normál kontrolloknál ez nem volt megfigyelhető. Ebben a témában megjelent közleményünket követően ez a munkacsoport is kimutatta az RA-s betegek SF-jében az MDSC-k jelenlétét. Pozitív korrelációt találtak az ízületben

megtalálható MDSC-k száma és az IL-17 szintek között, amelyből azt a következtetést vonták le, hogy az MDSC-k hozzájárulnak a T_H17 sejtek differenciációjához, ezáltal az ízületi gyulladás súlyosbodását okozzák.

Tudomásunk szerint jelen munkánk írja le először, hogy MDSC-szerű sejtek jelen vannak RA-s betegek synoviális folyadékában. Ezek a sejtek valódi MDSC-k, mivel képesek szuppresszálni az autológ T-sejtek *ex vivo* indukált proliferációját.

A fenotípus tekintetében, azt találtuk, hogy az MDSC-szerű RA-s SF sejtek többsége a neutrofil morfológiájú granulocytoid CD11b⁺CD33⁺HLA-DR^{lo/-}CD14⁻CD15⁺ alcsoporthoz tartozik; csak egy kis populációt találtunk a CD11b⁺CD33⁺HLA-DR^{lo/-}CD14⁺CD15⁻ fenotípussal a monocytoid alcsoportból a betegek SF sejtjei között.

Habár Guo és mtsai leírják, hogy pozitív korreláció van az MDSC-k száma, a betegségaktivitás és a T_H17 sejtek között RA-ban, ezzel az MDSC-k proinflammatorikus szerepét hangsúlyozva, nem zárható ki, hogy az MDSC-k számának növekedése inkább következménye, mint előidézője a gyulladásos folyamatnak. Sajnos jelen munkánkban nem volt módunk vizsgálni a DAS28 értékek és az MDSC-k száma közötti összefüggést, az azonban elmondható, hogy tekintettel arra, hogy a vizsgált mintáink aktív RA-s betegektől származtak, eredményeink az MDSC-k aktív betegség során betöltött szerepét tükrözik, és legalábbis *in vitro*, egyértelműen T-sejt gátló hatást mutattak, tehát antiinflammatorikusak voltak.

Hasonlóan a PGIA-s egerekből gyűjtött SF sejtekhez, azt találtuk, hogy az RA-s betegek SF sejtjei sokkal hatékonyabban gátolják az autológ T-sejtek Ag-specifikus, mint az anti-CD3/CD28-indukált proliferációját. Ugyanakkor, az egér SF sejtektől eltérően, RA-s betegek SF MDSC sejtjei az anti-CD3/CD28-stimulált T-sejtek erőteljes proliferációjára is szignifikáns gátló hatást tudtak gyakorolni. Ezen megfigyelések szerint az SF MDSC-k a T-sejt expansió nem-szelektív gátlóinak tekinthetők, illetve az Ag-specifikus vs. nem-specifikus rendszereknél megfigyelt szuppresszív potenciál különbsége egyszerűen csak a T-sejteknek ezen stimulusokra adott válaszreakcióinak a különbsége miatt következhet be.

A myelopoiesist segítő faktorok, mint például a GM-CSF, a G-CSF és az IL-6 részt vesznek az MDSC-k indukciójában és túlélésében. Ezek a növekedési faktorok magas koncentrációban vannak jelen az RA-s betegek synoviális folyadékában, így biztosítva olyan miliőt, melyben az MDSC-k felhalmozódhatnak. Másrészt, az RA-s synoviális folyadék T-sejtjeinek széles körben megfigyelt, mitogén stimulusokra mutatott „hyporeaktivitása” (összehasonlítva az ugyanazon beteg véréből származó T-sejtek reakciójával) összefüggésben lehet, legalábbis részben, azzal, hogy az ízületi exudátumban a T-sejtek hosszú ideig ki vannak téve az MDSC expozíciónak. Továbbá, habár a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatórikus T-sejtek jelen lehetnek az RA synoviális folyadékában, a

gyulladásos környezet jelentősen csökkenti ezen regulatórikus T-sejteknek az effektor T-sejtek aktivitására és expansiójára gyakorolt gátló hatását, *ex vivo* vagy az ízületen belül.

Feltételezhető, hogy az RA-s betegek synoviális folyadékában jelen lévő MDSC-k, amellet, hogy az ízületi szövetek károsodását okozzák, a helyi T-sejt expansió negatív regulátoraiként is fellépnek, megtörve ezáltal az autoimmunitás és a gyulladás ördögi körét.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A genetika, a környezeti faktorok és az autoimmunitás “Bermuda háromszöge” fontos szerepet játszik a rheumatoid arthritis (RA) pathogenezisében. Az autoimmunitás az adaptív immunválasz diszregulációjának eredményeképpen jön létre, de a természetes immunrendszer hibás működése is közrejátszhat az adaptív immunrendszer szabályozásának kisiklásában.

A myeloid eredetű szuppresszor sejtek (MDSC-k) a veleszületett immunrendszer részét képezik és a T-sejt funkció szuppressziójára képesek.

Jelen munkánk célkitűzése az volt, hogy kidolgozzunk egy *in vitro* módszert, amely segítségével hasonló fenotípusú MDSC-ket nyerjünk, mint amilyen fenotípusú sejtet korábbi munkánkban karakterizáltunk PGIA-ben, valamint hogy ezen sejtek terápiás potenciálját vizsgáljuk.

Kísérleteink során az egerekből izolált csontvelősejteket 3 napig tenyésztettük granulocytamakrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF), interleukin-6 (IL-6), valamint granulocytakolóniastimuláló faktor (G-CSF) jelenlétében. Az ilyen módon nyert sejtek fenotípusát áramlási citometriával, mikroszkópos módszerekkel, és biokémiai módszerekkel vizsgáltuk, az immunszuppresszív képesség tanulmányozása pedig T-sejt szuppressziós assay-vel történt. SCID egerekben a PGIA klinikai tüneteinek csökkentésére az *in vivo* immunszuppresszív képesség teszteléséhez adoptív sejtranszfert hajtottunk végre. Ezen kívül RA-es betegek ízületi folyadékában található sejtek morfológiáját is vizsgáltuk áramlási citometriával, olyan sejtfelszíni markermintázatokat keresve, amelyek az MDSC-kre jellemzőek. Vizsgáltuk továbbá ezen sejtek autológ perifériás T-sejtekkel szembeni szuppresszív hatását *ex vivo* kísérletekben, ahol antigén-specifikus és nem antigén-specifikus módon történő T-sejt proliferáció gátlást határoztunk meg.

A GM-CSF, IL-6, G-CSF jelenlétében tenyésztett csontvelősejtekben felhalmozódott egy olyan sejtpopuláció, amely rendelkezett a potens MDSC-k tulajdonságaival. Kimutatható volt ezen sejtek T-sejtekre irányuló szuppresszív hatása, mely antigén-dependens és antigén-independens módon is szignifikánsnak adódott. A szuppresszió molekuláris mechanizmusa mindkét esetben az indukálható nitrogén-monoxid szintáz fokozott expressziójával, illetve emelkedett nitrogén-monoxid szintekkel magyarázható. Az MDSC-vel történő transzfer során a kezelt SCID egerek csoportjában szignifikánsan csökkent az ízületi gyulladás, a PG-specifikus T-sejt válasz, valamint a szérum anti-PG antitest szintjei is.

Sikerült kimutatnunk, hogy a RA-es betegek ízületi folyadékából MDSC-k izolálhatók, melyekre jellemző, hogy döntően granulocytoid fenotípussal rendelkeznek, és szignifikánsan csökkentik a T-sejt proliferációt. Összehasonlítva ezen sejtek T-sejt proliferációs potenciálját antigén-dependens és

antigén-independens módon, a szuppresszió mértéke sokkal nagyobb volt az alloantigén-indukált rendszerben.

Eredményeink előrevetítenek egy újabb terápiás lehetőséget terápia rezisztens RA-s betegek számára, amely hasznosítható lehet a későbbiekben a csontvelő transzplantáció területén. Kimutattuk, hogy az MDSC-k jelen vannak a RA-s betegek ízületi folyadékában lévő gyulladásos neutrofil granulocyták között, valamint, hogy jelenlétük nagy valószínűséggel jótékony hatású, hiszen képesek limitálni az az autoreaktív T-sejtek expansióját, ezáltal csökkenteni az ízületi gyulladás mértékét.

7 ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, EREDMÉNYEK

1. Jelen PhD munkában kifejlesztettünk egy *in vitro* módszert PGIA-ban, egy RA-s állatmodellben, MDSC-k létrehozására. Csontvelői sejtekből GM-CSF, G-CSF és IL-6 segítségével olyan sejteket nyertünk, melyek hasonlóak voltak a PGIA-s egerek synoviális folyadékában korábban talált MDSC-khez. A sejtek domináns fenotípusa Ly6C^{int}Ly6G^{high} volt, amely a granulocytoid MDSC szubtypusra jellemző. *In vitro* körülmények között a BM-MDSC-k jelentősen tudták gátolni az Ag-dependens és az Ag-independens T-sejt proliferációt NO függő módon.
2. A csontvelői eredetű MDSC-k adoptívan átvitt PGIA-s SCID egerekbe terápiás hatást mutattak. A BM-MDSC-k megelőzték az ízületi gyulladás klinikai jeleit valamint a T- és B-sejt válaszokat is. A gyulladásos folyamat gyógyulásának szövettani jelei szintén láthatóak voltak a kezelt mintákban. A transzferált sejtek útjának követése során bizonyítottuk, hogy az MDSC-k valóban a gyulladásos helyszínen halmozódnak fel.
3. RA-s betegek synoviális folyadékában is azonosítottunk MDSC-szerű fenotípussal rendelkező és immunsuppresszív aktivitást mutató sejteket. A domináns szubtypus a CD11b⁺CD33^{lo/hi}HLA-DR^{lo/-}CD14⁻CD15⁺ (granulocytoid) MDSC volt. Az RA-s betegektől származó SF sejtek gátolták az autológ T-sejtek Ag-specifikus és anti-CD3/CD28-indukált proliferációját.

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte hálámat témavezetőmnek, **Prof. Dr. Szekanecz Zoltánnak**, nem csak azért, mert ott volt utam minden lépésénél, hanem mert mindig utat mutatott, türelmes volt és időt fektetett munkánkba. Az a tudás és bölcsesség, amelyet mutatott nekem, nagy segítséget és támogatást nyújtott az elmúlt években.

Nem tudom eléggé hangsúlyozni hálámat a chicago-i Rush Egyetemen dolgozó mentoromnak, **Prof. Dr. Mikecz Katalinnak**. Nemcsak kiváló tanár, hanem barát is, nagy inspiráció volt a számomra. Arra ihletett, hogy kemény munkával és elkötelezettséggel törekedjem céljaim elérésére. Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Glant Tibornak**, hogy csatlakozhattam a kutatócsoportjához, köszönöm segítségét, türelmét és azt, hogy biztosította az összes szükséges eszközt a laborban.

Köszönettel tartozom **Anjali Nairnak, Colt Egelstonnak, Vida Andrásnak**, akik nemcsak kutatóként, de barátként is mellettem álltak. Nagyra értékelem a laborban a kollégáim technikai segítségét és asszisztenciáját: **Dr. Besenyei Tímea, Dr. Kádár András, Rauch Tibor, Beata Trynieszewska, Ocskó Tímea, Carla R. Scanzello**.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Ficzer Andreának** a támogatásáért és barátságáért, amelyet karrierem során mutatott.

Örökké hálás vagyok a barátaim és a családom segítségéért és támogatásáért, akik nélkül nem lehetnék abban a helyzetben, mint ma, különösen férjem, **Olaszi Tamás**, fiam, **Botond**, édesanyám, **Dr. Kurkó Mária**, édesapám, **Dr. Kurkó László** és a húgom, **Vinnai-Kurkó Réka**.

A PhD disszertáció alapjául szolgáló munka a GINOP-2.3.2-15-2016-00015 pályázat támogatásával készült. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



Nyilvántartási szám: DEENK/163/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kurkó Júlia Emese
Neptun kód: HWVD71
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kurkó, J. E.**, Vida, A., Glant, T. T., Scanzello, C. R., Katz, R. S., Nair, A., Szekanecz, Z., Mikecz, K.: Identification of myeloid-derived suppressor cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: a pilot study.
BMC Musculoskelet. Disord. 15, 1-7, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2474-15-281>
IF: 1.717
2. **Kurkó, J. E.**, Vida, A., Ocskó, T., Tryniszewska, B., Rauch, T. A., Glant, T. T., Szekanecz, Z., Mikecz, K.: Suppression of proteoglycan-induced autoimmune arthritis by myeloid-derived suppressor cells generated In Vitro from Murine Bone Marrow.
PLoS One. 9 (11), 1-14, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111815>
IF: 3.234
3. **Kurkó, J. E.**, Besenyei, T., Laki, J., Glant, T. T., Mikecz, K., Szekanecz, Z.: Genetics of Rheumatoid Arthritis: a Comprehensive Review.
Clin. Rev. Allergy Immunol. 45 (2), 170-179, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12016-012-8346-7>
IF: 4.728





További közlemények

4. Mikecz, K., Glant, T. T., Markovics, A., Rosenthal, K. S., **Kurkó, J. E.**, Carambula, R. E., Cress, S., Steiner, H. L., Zimmerman, D. H.: An epitope-specific DerG-PG70 LEAPS vaccine modulates T cell responses and suppresses arthritis progression in two related murine models of rheumatoid arthritis.
Vaccine. 35 (32), 4048-4056, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.009>
IF: 3.235 (2016)
5. Soós, B., **Kurkó, J. E.**, Besenyei, T., Szabó, Z., Szántó, S., Meskó, B., Pólska, S., Nagy, L., Laki, J., Glant, T., Mikecz, K., Szekanecz, Z.: A rheumatoid arthritis genetikája és genomikája: I. patogenetikai vonatkozások.
Magyar Reumatol. 54 (1), 7-17, 2013.
6. Glant, T. T., Besenyei, T., Kádár, A., **Kurkó, J. E.**, Tryniszewska, B., Gál, J., Soós, G., Szekanecz, Z., Hoffmann, G., Block, J. A., Katz, R. S., Mikecz, K., Rauch, T. A.: Differentially expressed epigenome modifiers, including aurora kinases A and B, in immune cells in rheumatoid arthritis in humans and mouse models.
Arthritis Rheum. 65 (7), 1725-1735, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.37986>
IF: 7.871
7. Szekanecz, Z., Meskó, B., Pólska, S., Váncsa, A., Szamosi, S., Végh, E., Simkovics, E., Laki, J., **Kurkó, J. E.**, Besenyei, T., Mikecz, K., Glant, T. T., Nagy, L.: Pharmacogenetics and pharmacogenomics in rheumatology.
Immunol. Res. 56 (2-3), 325-333, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-013-8405-z>
IF: 3.525
8. **Kurkó, J. E.**, Glant, T. T., Mikecz, K.: Myeloid eredetű szuppresszor sejtek: jellemzőik és szerepük autoimmun és egyéb kórképekben.
Immunol. Szle. 4 (4), 4-13, 2012.
9. Besenyei, T., Kádár, A., Tryniszewska, B., **Kurkó, J. E.**, Rauch, T. A., Glant, T. T., Mikecz, K., Szekanecz, Z.: Non-MHC Risk Alleles in Rheumatoid Arthritis and in the Syntenic Chromosome Regions of Corresponding Animal Models.
Clin. Dev. Immunol. 2012, 1-14, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/284751>
IF: 3.064





10. Egelston, C., **Kurkó, J. E.**, Besenyei, T., Tryniszewska, B., Rauch, T. A., Glant, T. T., Mikecz, K.:
Suppression of dendritic cell maturation and T cell proliferation by synovial fluid myeloid cells
from mice with autoimmune arthritis.
Arthritis Rheum. 64 (10), 3179-3188, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.34494>
IF: 7.477
11. Gaál, J., Varga, J., Szekanecz, Z., **Kurkó, J. E.**, Ficzer, A., Bodolay, E., Bender, T.:
Balneotherapy in elderly patients: effect on pain from degenerative knee and spine conditions
and on quality of life.
Isr. Med. Assoc. J. 10 (5), 365-369, 2008.
IF: 0.626

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35,477

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,679**

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

Debrecen, 2018.05.15.

