

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**GYULLADÁSOS MEDIÁTOROK HATÁSA SZINOVIÁLIS
FIBROBLASZTOK MÁTRIX METALLOPROTEINÁZ-2
TERMELÉSÉRE RHEUMATOID ARTHRITISBEN**

Dr. Pákozdi Angéla



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**GYULLADÁSOS MEDIÁTOROK HATÁSA SZINOVIÁLIS
FIBROBLASZTOK MÁTRIX METALLOPROTEINÁZ-2
TERMELÉSÉRE RHEUMATOID ARTHRITISBEN**

Dr. Pákozdi Angéla

DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Klinikai Orvostudományok doktori iskola

Immunológia doktori program

A Szigorlati Bizottság elnöke:

Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora

A Szigorlati Bizottság tagjai:

Dr. Pfliegler György, Ph.D.

Dr. Sütő Gábor, Ph.D.

A Védési Bizottság elnöke:

Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora

Opponensek:

Dr. Nagy György, Ph.D.

Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora

A Védési Bizottság tagjai:

Dr. Pfliegler György, Ph.D.

Dr. Sütő Gábor, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja és helye:

2009. június 8. 14:00h I.sz. Belgyógyászati Klinika Tanterme

1. BEVEZETÉS

1.1 Szinoviális fibroblasztok rheumatoid arthritisben

A rheumatoid arthritis (RA) egy krónikus gyulladós betegség melyet szinoviális hiperplázia, csont- és porcdestrukció jellemez. A RA szinoviális fibroblasztok részt vesznek az extracelluláris matrix (ECM) komponenseinek és a mátrix lebontó enzimek termelésében.

1.2 Mátrix metalloproteinázok

A mátrix metalloproteinázok (MMP) az ECM degradációjában szerepet játszó fehérjebontó enzimek, melyek fontos szerepet játszanak az ízületi destrukció létrejöttében RA-ben. A RA patogenezisében kulcsszerep jut az angiogenezisnek, mely elősegíti a gyulladós szinóvium növekedését. Az angiogenezishez az ECM proteolízise, proliferációja, az endothel sejtek migrációja és az új mátrixfehérjék szintézise elengedhetetlen. Mindezen túl, a MMP-ok fontos szerepet játszanak a csont újraépülésében, atherosclerózisban, apoptózisban, tumor invázióban és metasztázis képződésben.

A MMP-2 funkciója zselatin, kollagén I, II, III, IV, VII, X, fibronectin, elasztin és laminin degradációja. Fibroblasztok, keratinociták, epitélsejtek, monociták és oszteoblasztok termelik. A MMP-2 fontos szerepet játszik az angiogenezisben és a RA patogenezisében. Osteoarthritisssel összehasonlítva, emelkedett MMP-2 szinteket írtak le RA-es betegek ízületi szinóviumában. Továbbá az is ismert, hogy a radiológiai erózióval rendelkező RA-es betegek szinóviumában szignifikánsan magasabb MMP-2 szintek találhatóak, mint az erózióval nem rendelkező betegekben.

1.3 Macrofág migrációt gátló faktor

A makrofág migrációt gátló faktor (MIF) egy makrofágok által termelt proinflammatorikus citokin, mely ugyancsak fontos szerepet játszik az angiogenezisben és a RA patogenezisében. Több független munkacsoport is hangsúlyozta szerepét az ízületi gyulladás kialakulásában. Egy korábbi megfigyelés szerint neutralizáló MIF antitestek késleltetik az ízületi gyulladás kialakulását kollagén-indukálta arthritises modellben. Hasonlóan, csökkent szinoviális gyulladást figyeltek meg MIF gén deficiens (MIF -/-) egerekben a vad típusú (VT) egyedekhez képest, kollagén-indukálta arthritiszben.

1.4. Epigallocatechin-3-gallate

A zöld tea aktív komponense, az epigallocatechin-3-gallate (EGCG), antioxidáns, gyulladásgátló és tumorelles hatással bír. Korábbi tanulmányok szerint, EGCG hatékonyan gátolja katabólikus mediátorok termelését osteoarthritises chondrocytáknban. Emellett, EGCG ugyancsak gátolja a MMP-1 és a MMP-13 aktivitását human chondrocytáknban. *In vivo*, EGCG mérsékli az ízületi gyulladás létrejöttét kollagén-indukálta arthritiszben.

1.5 Kemokinek

RA-ben a kemokinek irányítják gyulladáshos leukociták ízületi szinoviumba történő áramlását. A négy ismert kemokin főcsoporton belül (CXC, CC, C és CX3C), a CXC, a CC és a fraktalkin játszik fontos szerepet ebben. Az angiogenezisben az ELR motívumot tartalmazó CXC kemokinek, így az epiteliális-neutrofil aktiváló protein-78 (ENA-78)/CXCL5 és a növekedéshel-összefüggő onkogén alfa (gro- α)/CXCL1 bizonyulnak jelentősnek.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Tanulmányunk célja a RA szinovium MMP-2 expressziójának vizsgálata volt, ezért a munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. Célunk volt, hogy meghatározzuk a MIF hatását a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expressziójára.
2. Meghatározni kívántuk a MIF által stimulált MMP-2 expresszióban szerepet játszó szignáltranszdukciós útvonalakat RA szinoviális fibroblasztokban.
3. Megvizsgáltuk a MMP-2 szinoviális expresszióját MIF +/- és VT egerekben in vivo.
4. További célunk volt, hogy meghatározzuk kemokinek szerepét a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expressziójában.
5. Végezetül, tanulmányozni kívántuk az EGCG hatását a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expressziójára.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Szinoviális fibroblaszt sejtkultúra

A humán RA szinoviális fibroblasztokat szinovektómia vagy teljes ízületi protézis beültetésén átesett RA-es betegek szinoviumából izoláltuk. A szinoviális szövetet egy diszpázt, kollagenázt és DNázt tartalmazó oldatban emésztettük, majd a sejteket 10% foetális borjúsavót tartalmazó RPMI 1640 tápoldatban tenyésztettük 37° C-on, 5% CO₂-t tartalmazó levegőben.

3.2 Állatok

A MIF ^{-/-} egereket és a kontrollként szolgáló SV129/J VT egereket a University of Michigan patogénmentes kísérleti laboratóriumában tenyésztettük. A kísérleteket az egyetemen működő állatkísérleti bizottság engedélyének megszerzését követően végeztük.

3.3 Arthritis indukció

3.3.1 Zymosan-indukálta arthritis

A zymosan-indukálta arthritist (ZIA) a zymosan (*Saccharomyces cerevisiae*) térdízületi üregbe történő fecskendezésével váltottuk ki. 24 óra elteltével, az egereket leöltük, a ZIA ízületek egyikét proteáz inhibitorokat tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk, a másikat pedig fagyasztásos eljáráshoz OCT-be ágyazva, folyékony nitrogénben fagyasztottuk.

3.3.2 Antigén-indukálta arthritis

Az antigén-indukálta arthritis (AgIA) mind celluláris, mind humorális immunválaszt kiváltó, hisztológiailag a RA-hez hasonló gyulladást utánzó modell. A MIF ^{-/-} és VT egereket komplett Freund adjuvánsban emulzifikált mBSA-val immunizáltuk, majd a 28. napon az állatokat leöltük és a térdízületeket proteáz inhibitorokat tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk.

3.4 MMP szintek mérése ELISA-val

A RA szinoviális fibroblaszt sejtkultúrák MMP-1, MMP-2, MMP-3 és MMP-13 koncentrációját és az egér ízületi homogenizátumok MMP-2 szintjét Quantikine Immunoassay-vel határoztuk meg. Az ELISA esszé detektálta a MMP-2 és MMP-3 pro- és aktív formáját is, míg a MMP-1 és a MMP-13 esetében csak a pro-forma szintjét mérte.

3.5 Sejtlízis és Western blot

A Western blot analízishez a sejteket lízis pufferben homogenizáltuk és a proteintartalmat bicinchoninic acid (BCA) esszével határoztuk meg. Ezután SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel a minták proteintartalmát szétválasztottuk, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben blokkoltuk, majd 5%-os tej-PBS-ben hígított foszfo-specifikus elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át. A membránokat ezt követően megfelelő, másodlagos torna-peroxidázzal kapcsolt antitesttel inkubáltuk, végül az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel, ECL western blot detektáló kittel tettük láthatóvá.

3.6 Zselatináz Assay

A RA szinoviális fibroblaszt sejt kultúra zselatináz aktivitását EnzChek Zselatináz Assay kittel mértük meg. A sejt kultúrák felülúszóját fluoreszcensen jelölt zselatinnal inkubáltuk, majd a fluoreszcenciát Synergie HT Microplate Reader készülékkel állapítottuk meg 495 nm-en.

3.7 Zselatin zimográfia

A RA szinoviális fibroblasztok által szekretált MMP-2 expresszióját zselatint tartalmazó gélen analizáltuk. Ehhez hasonlóan, az AgIA ízületi homogenizátumainak zselatin degradáló képességét is ezzel a módszerrel állapítottuk meg proteinkoncentráció meghatározás után. A mintákat először 2x SDS mintapufferrel kevertük össze, majd a mintákat zimográfias SDS gélekre vittük fel. A géleket a futtatás után renaturáltuk, majd előhívó-pufferben inkubáltuk. Az emésztetlen szubsztrátot Coomassie kék festékkel festettük meg.

3.8 Immunhisztokémia

A fagyasztott szöveti mintákat (MIF -/- és VT egér ZIA ízületek) 7 µm vastagságú szeletekre vágtuk, majd a MMP-2 expressziót alkalikus-foszfátázzal végzett festéssel vizualizáltuk. A metszeteket a sejtek immunreaktivitása alapján vizsgáltuk, az egyes sejttípusokat morfológiai szempontok alapján különböztettük meg. A MMP-2-t expresszáló sejtek százalékos arányát a szinoviális felszíni réteg sejein (fibroblaszt-típusú és makrofág típusú szinoviociták), a szinoviális felszíni réteg alatti nem-limfoid típusú mononukleáris sejteken (monociták, makrofágok, hízósejtek) és endothel sejteken vizsgáltuk.

3.9 Immunofluoreszcens festés

A fedőlemezen tenyésztett RA szinoviális fibroblasztokat MIF-ral történő stimulációt követően jéghideg acetonnal fixáltuk. Ezt követően a sejteket blokkoló oldattal permeabilizáltuk és blokkoltuk, majd a megfelelő blokkoló oldatban hígított foszfo-specifikus antitestekkel inkubáltuk. A sejtek mosását követően, Alexa Fluor-konjugált másodlagos antitestekkel végeztük az immunreakciót. Végül a mintákat DAPI sejtmagfestékkel festettük meg és fedőlemezzel fedtük be őket. Az immunofluoreszcens festést Olympus BX51 fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk és DP Manager imaging software-rel elemeztük.

3.10 Statisztikai analízis

Az eredményeinket Student's *t*-teszt segítségével analizáltuk. A P-értéket 0.05 alatt tekintettük szignifikánsnak. A számított értékeket átlag ± SEM módon adtuk meg.

3. EREDMÉNYEK

3.1 A MIF hatása a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expressziójára

3.1.1 A MIF stimulálja a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expresszióját

Bár a RA szinoviális fibroblasztok MIF-ral (50nM) történő stimulációja nem volt hatással a MMP-1, MMP-3 és MMP-13 fehérjék szekrécijára, azt találtuk hogy a MIF-ral kezelt RA szinoviális fibroblasztok szignifikánsan nagyobb mennyiségű MMP-2 proteint termeltek a nem stimulált kontroll sejtekhez képest (ELISA). Ezt a hatást 6 órás inkubációt (nem stimulált: 7.13 ± 0.86 ng/ml; MIF stimulált: 16.28 ± 1.71 ng/ml; $p < 0.05$) és 24 órás inkubációt követően (nem stimulált: 23.88 ± 7.49 ng/ml; MIF stimulált: 51.36 ± 5.55 ng/ml; $p < 0.05$) is megfigyeltük.

3.1.2 MIF serkenti a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 aktivitását

A RA szinoviális fibroblasztok felülúszójának enzimikus aktivitását zselatináz esszé segítségével állapítottuk meg. A MIF-ral stimulált RA szinoviális fibroblasztok felülúszójának fokozott enzimikus aktivitását figyeltük meg a kontroll sejtekhez képest 24 óra elteltével (649 ± 34 átlagos fluoreszcencia, vs. 503 ± 19 , sorrendben; $p < 0.05$). Zselatin zimográfia ugyancsak fokozott zselatin degradációs képességet igazolt a MIF-ral kezelt RA szinoviális fibroblasztokban.

3.1.3 A MIF által kiváltott RA szinoviális fibroblaszt MMP-2 expresszió idő és koncentráció függő

A MIF időfüggő módon stimulálta a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expresszióját. Stimuláló hatása már egy órás inkubációt követően is észlelhető volt, és folyamatosan

fokozódott 24 órán át. A RA szinoviális fibroblasztok immunfluoreszcens festése MMP-2 antitesttel, a MMP-2-nek egy erős sejtmag körüli és egy diszkrét diffúz citoplazmikus elhelyezkedését tüntette fel egy órás MIF stimulációt követően.

A MIF által kiváltott MMP-2 expresszió nemcsak időtartamtól, de a MIF koncentrációjától is függ. Kísérleteinkben, a MIF 1 nM koncentrációban nem váltott ki stimuláló hatást a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 termelésére, míg magasabb koncentrációk fokozott MMP-2 termelést indukáltak. Hasonló mértékű MMP-2 expresszió mutatkozott 25 és 50 nM MIF koncentrációalkalmazása esetén.

3.2 A MIF indukálta RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expressziójában szerepet játszó szignáltranszdukciós folyamatok

3.2.1 Jelátviteli molekulák a MIF által kiváltott MMP-2 expresszióban

A jelátviteli folyamatok tanulmányozásához a RA szinoviális fibroblasztokat MIF-ral stimuláltuk különböző jelátviteli molekulák inhibitorainak jelenlétében, majd a sejt kultúrák felülúszóinak MMP-2 koncentrációját ELISA-val mértük meg. Azt találtuk, hogy a MIF által kiváltott MMP-2 upregulációt a pan-PKC, a JNK és részben a Src jelátviteli molekulák inhibitorai gátolták, sugallva ezzel azt hogy ezen molekulák szerepet játszanak a MIF által kiváltott szignáltranszdukcióban.

Mindezen túl, azt is megvizsgáltuk mely PKC izoforma játszik szerepet a MMP-2 termelést stimuláló MIF jelátvitelében RA szinoviális fibroblasztokban. Míg a PKC α/β specifikus inhibitor Gö6976 jelenléte nem befolyásolta, addig a PKC δ izoformára specifikus inhibitor rottlerin gátolta a MIF által kiváltott MMP-2 expressziót RA szinoviális fibroblasztokban.

3.2.2 A MIF által aktivált jelátviteli molekulák

A JNK, c-jun és PKC foszforilációját foszfo-specifikus antitesteket használva mértük meg Western blot segítségével. A MIF aktiválta a JNK foszforilációját egy perces inkubációt követően és maximális serkentő hatását 15 perc múlva érte el. A c-jun foszforilációját MIF hatására, 30 perces stimulációt követően figyeltük meg. Az immunfluoreszcens festés a foszforilált JNK molekula diffúz festődését ábrázolta MIF hatására. A foszforilált c-jun intracelluláris lokalizációja elsősorban a magra korlátozódott, bár egy kis mennyiségű citoplazmikus festődést is megfigyeltünk. Érdekes módon, a MIF stimuláció hatására viszont erős magi festődést fedeztünk fel, sugallva ezzel a c-jun magba történő transzpozícióját. A PKC izoformákat illetően, MIF specifikusan aktiválta a PKC δ foszforilációját, míg nem volt hatással a pan-PKC, PKC α_1/β_{11} and PKC ϵ izoformák foszforilációjára. MIF hatására, a PKC δ aktivációja 1 perces stimulációt követően már megfigyelhető volt, majd maximális foszforilációját 30-45 perc után találtuk.

3.2.3 A szignáltranszdukciós kaszkád

A MIF által aktivált szignáltranszdukciós kaszkád tanulmányozásához a RA szinoviális fibroblasztokat különböző jelátviteli molekulák inhibitoraival kezeltük egy órával a MIF stimulációt megelőzően. Azt találtuk, hogy a Src inhibitor PP2 gátolta a JNK molekula foszforilációját, míg a c-jun aktivációja elmaradt a JNK és a Src jelátviteli molekulák inhibitorainak jelenlétében. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a MIF egy olyan szignáltranszdukciós kaszkádot indít el, amelyben először a Src, majd a JNK foszforilációja következik be és végül ez a c-jun aktivációjához vezet. A PKC δ aktivációját mind a Src, mind a JNK inhibitora gátolta, ami arra enged következtetni, hogy a PKC δ aktivációja a Src és a JNK molekulák foszforilációját követően jön létre.

3.3 A MIF *in vivo* szerepe az ízületi MMP-2 termelésben

3.3.1 A MMP-2 expresszió akut gyulladós arthritisben

A MIF MMP-2 termelésben betöltött *in vivo* szerepének tanulmányozásához ízületi gyulladást indukáltunk a zymosan MIF *-/-* és VT egerek ízületi üregébe való fecskendezésével. A ZIA egy olyan ízületi gyulladást utánzó model, melyben a gyulladós válasz egy korai (24 óra) és egy késői fázisra osztható. 24 órával a ZIA indukciót követően az egereket leöltük és a MMP-2 koncentrációját a térdízületek homogenizátumában ELISA segítségével mértük meg. Érdekes módon, szignifikánsan emelkedett MMP-2 szinteket találtunk VT egerek ízületében MIF *-/-* egerekhez képest (1.3 ± 0.08 ng/mg protein vs. 0.82 ± 0.08 ng/mg, sorrendben, $p < 0.05$), feltételezve ezzel azt, hogy a MIF fontos szerepet játszik az ízületi MMP-2 szabályozásában.

3.3.2 A MMP-2 expresszió AgIA modellben

A MIF *-/-* és VT egerek ízületi MMP-2 expresszióját zselatin zimográfiával mértük meg 28 nappal az AgIA indukcióját követően. Előző eredményeinket alátámasztva, emelkedett MMP-2 aktivitást figyeltünk meg (mind a pro-, mind az aktív MMP-2-t illetően) VT egerek ízületi homogenizátumában.

3.3.3 A MMP-2 expresszió immunhisztológiai analízise a gyulladós ízületben

A gyulladós szinovium egyes sejtjeinek MMP-2 expresszióját kívántuk meghatározni a ZIA szinoviumban immunhisztokémiai festést követően. Azt figyeltük meg, hogy a MMP-2-t leginkább a szinoviális felszíni réteg sejtei (fibroblaszt-típusú és makrofág típusú szinoviociták), a szinoviális felszíni réteg alatti nem-limfoid típusú mononukleáris sejtek és endotél sejtek expresszálták. Az immunfestést a sejtek MMP-2 festődést mutató százalékos arányával fejeztük ki. A MMP-2 szinoviális expressziója emelkedettnek

bizonyult mind a szinoviális felszíni réteg és a felszíni réteg alatti nem-limfoid típusú mononukleáris sejtekben VT egerekben a MIF $-/-$ egerekhez képest (szinoviális felszíni réteg sejtei: $74\% \pm 7$ vs. $38\% \pm 7$, a szinoviális felszíni réteg alatti nem-limfoid típusú mononukleáris sejtek: $72\% \pm 4.9$ vs. $22\% \pm 3.8$, sorrendben, $p < 0.05$). Bár hasonló trendet figyeltünk meg endothel sejtek esetében, szignifikáns eredmény nem született ($41\% \pm 13.5$ vs. $14.4\% \pm 4.8$, sorrendben).

3.4 EGCG hatása RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 termelésére

A EGCG-nek MMP-2 expresszióra kifejtett hatásának tanulmányozásához a RA szinoviális fibroblasztokat EGCG-vel kezeltük 12 órán át, majd a sejteket IL-1 β -val (10 ng/ml) stimuláltuk 24 órán keresztül. A RA szinoviális fibroblasztoknak IL-1 β -val történő stimulációja 2.5-szeres MMP-2 aktivitás emelkedést eredményezett ($p < 0.05$), zselatin zimográfiával mérve. A RA szinoviális fibroblasztok 10 μ M és 20 μ M EGCG-vel történő előinkubációja $58 \pm 14\%$ és $75 \pm 16\%$ gátlást fejtett ki az IL-1 β -indukálta MMP-2 aktivitásra ($p < 0.05$).

3.5 A kemokinek hatása a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expressziójára

3.5.1 A kemokinek serkentik a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expresszióját

A RA szinoviális fibroblasztokat különböző kemokinekkal (100 ng/ml) inkubáltuk 24 órán keresztül. ENA-78/CXCL5, gro- α /CXCL1, és RANTES/CCL5 indukálta a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 aktivitását 3.9-, 5.4- és 4.9-szeres mértékben, sorrendben ($p < 0.05$). A kemokinek indukálta MMP-2 aktivitás 1.1-, 1.5- és 1.3-szeres növekedését figyeltük meg az IL-1 β által kiváltott válaszhoz képest, sorrendben.

3.5.2 EGCG hatása a kemokinek indukálta MMP-2 expresszióra RA-ben

Az EGCG, mind a 10 μ M és a 20 μ M koncentrációban blokkolta a kemokinek által kiváltott MMP-2 aktivitás fokozódást; a gátlás mértéke ENA-78 esetében 33% illetve 75%, a gro- α esetében 52% és 80%, míg RANTES esetében 55% és 84% volt, sorrendben ($p < 0.05$).

4. MEGBESZÉLÉS

A RA-ben létrejövő progresszív ízületi porc- és csontdestrukció az ízület funkcionális károsodásához vezet. Közismert, hogy a MMP-ok és a katepszinek az ízületi destrukcióban központi szerepet játszó molekulák. A MMP-ok számos patológiai folyamatban jelentőséggel bíró enzimek, így például szerepük van a tumorsejtek inváziójában, angiogenezisben, atherosclerosisban és RA-ben. Az angiogenezis kulcsfontosságú folyamat az ízületi szinoviális hártya burjánzásában RA-ben. Ehhez az ECM proteolízise és proliferációja, az endothel sejtek migrációja, valamint az új mátrixfehérjék képződése elengedhetetlenül fontos.

Az ízületi destrukcióban és az angiogenezisben szerepet játszó MMP-k legfőbb forrása a szinoviális felszíni rétegben jelen lévő szinoviális fibroblasztok. A MMP-ok feladata az ECM lebontása; zselatin, kollagének, fibronectin és laminin degradációja. A MMP-ok közül a MMP-2 döntő szerepet játszik az érújdonképződésben. Bár a RA-ben betöltött szerepe nem teljesen ismert, több tanulmány is igazolta jelentőségét. RA-es betegek szérumában és szinoviális folyadékában magasabb MMP-2 szintek mérhetőek, mint osteoarthritis betegekben. Továbbá, az is ismert, hogy az emelkedett MMP-2 expresszió összhangban áll a RA szinoviális fibroblasztok invazív képességeivel. Ezt ismerve, tanulmányunkban arra törekedtünk, hogy jobban megértsük a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 termelésében szerepet játszó serkentő és gátló hatású tényezőket, *in vitro* és *in vivo*.

A RA-es betegek szinoviumában lévő MIF egy proinflammatorikus hatású citokin, mely stimulálja RA szinoviális fibroblasztok MMP-1 és MMP-3 expresszióját. A MIF angiogenezisben betöltött szerepét számos *in vitro* és *in vivo* tanulmány is alátámasztotta. Függetlenül egymástól, két munkacsoport is leírta a MIF ízületi gyulladásban betöltött *in vivo* jelentőségét. Neutralizáló MIF ellenanyag jelenléte nemcsak késlelteti, de gátolja is az ízületi gyulladás létrejöttét egerekben. Hasonló eredményeket találtak MIF -/- egerekben VT egyedekhez képest. Azonban a MIF szöveti destrukciót kiváltó szerepéről még keveset tudunk. Tanulmányunkban ezért, a MIF egy teljesen új funkcióját vizsgáltuk meg RA szinoviális fibroblasztokban.

Vizsgálatainkban először tanulmányoztuk a MIF hatását a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 termelésére. Korábbról már ismert volt a MIF és a prosztata tumorsejtek MMP-2 expressziója közötti pozitív korreláció. *In vitro* módszereket alkalmazva (zselatin zimográfia, ELISA és immunfluoreszcens festés), bemutattuk, hogy MIF indukálja a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 termelését. Ezen hatás feltételezhetően szerepet játszik a RA-es ízületi destrukció létrejöttében.

A MIF MMP-2 termelésben való *in vivo* szerepét MIF -/- és VT egerekben vizsgáltuk ZIA-ben. Korábbi tanulmányok demonstrálták hogy a zymosan által kiváltott ízületi gyulladás időben két fázisú; kezdeti maximális értékét egy nap elteltével éri el, majd folyamatos csökkenés után a 14. napon egy másodlagos csúcsot mutat. Egy nappal a ZIA indukciót követően, csökkent ízületi MMP-2 expressziót figyeltünk meg MIF -/- egerekben VT egerekhez képest. Ezen folyamat feltehetően hozzájárul ahhoz a korábban leírt jelenséghez, mely szerint a VT egerekkel összehasonlítva, egy kevésbé súlyos ízületi gyulladás jön létre MIF -/- egerekben.

Hasonlóan, AglA-ben is jelentős különbség mutatkozott a MIF -/- és VT egerek ízületi

MMP-2 expressziójában. A MMP-2-nek mind a pro, mind az aktív formáját detektáltuk AgIA ízületekben, ezen felül, mindkét forma emelkedett szintjét találtuk VT egerekben.

A ZIA ízületek immunhisztokémiai festését követően elemeztük a MMP-2-t expresszáló fő sejt típusokat, és úgy találtuk, hogy a szinoviális felszíni réteg sejtei, a szinoviális felszíni réteg alatti nem limfoid típusú mononukleáris sejtek és az endothel sejtek expresszáltak MMP-2-t. Ezen felül, a szinoviális felszíni réteg sejtei és a felszíni réteg alatti nem limfoid eredetű mononukleáris sejtek csökkent MMP-2 expresszióját is bemutattuk MIF -/- egerekben.

Tanulmányunkban ezután feltérképeztük a MIF indukálta MMP-2 expresszióban szerepet játszó szignáltranszdukciós folyamatokat. Bemutattuk, hogy a JNK, PKC δ és Src jelátviteli molekulák inhibitorai gátolják a MIF által stimulált MMP-2 választ RA szinoviális fibroblasztokban. Ezt a megfigyelést támasztja az is alá, hogy MIF aktiválja ezen jelátviteli molekulák foszforilációját időfüggő módon. Továbbá azt is leírtuk, hogy a MIF egy olyan szignáltranszdukciós kaszkádot indít el, amelyben először a Src, majd a JNK és végül a c-jun foszforilációja következik be. Hasonlóan, a PKC δ aktivációja a Src és JNK molekulák aktivációját követően jön létre.

A RA pathogenezisében szerepet játszó MMP-k egyik funkciója RA szinoviális fibroblasztok kötőszöveti inváziójának elősegítése. Egy korábbi tanulmány a kemokinek aktív részvételét hangsúlyozta a RA destruktív fázisában, melyben a sejtek migrációja, proliferációja és a RA szinoviális fibroblasztok MMP termelése jellegzetes. Munkánk során ezért a kemokinek szerepét kívántuk tanulmányozni a RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 termelésében. Bemutattuk, hogy bizonyos kemokinek, mint az ENA-78/CXCL5, a gro- α /CXCL1 és a RANTES/CCL5 jelentős MMP-2 expressziót indukáló hatással bírnak a RA

szinoviális fibroblasztokra. Hatásukra, 3.9-5.4-szeres növekedést találtunk a MMP-2 expresszióban.

Újabban a kemokinek és kemokin receptorok gátlása, egy vonzó terápiás megközelítés krónikus gyulladásos betegségekben, és így a RA-ben. A zöld tea gyulladásgátló hatással bír, mint azt korábban epidemiológiai és állatkísérletekkel alátámasztották. Az egészségre kifejtett jótékony hatását egyik komponensének az EGCG-nek köszönheti. Korábban leírták, hogy EGCG gátolja tumor sejtek MMP-2 és MMP-9 aktivitását; s bár ismeretlen mechanizmussal, de csökkenti az ízületi gyulladás mértékét kollagén indukálta arthritisben *in vivo*. Tanulmányunkban bemutattuk, hogy EGCG gátolja az IL-1 β és a kemokinek által indukált RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 aktivitását. Az EGCG két különböző koncentrációját alkalmazva megfigyeltük, hogy 33-84%-ban gátolja a kemokinek által kiváltott MMP-2 expressziót.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy tanulmányunkban demonstráltuk a MIF RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 termelésében betöltött jelentős szerepét, amely feltételezhetően hozzájárul az ízületi destrukció létrejöttéhez RA-ben. A MIF MMP-2 expresszióra kifejtett hatását vizsgáltuk arthritises állatkísérleti modellekben, MIF $-/-$ és VT egerekben *in vivo*. Mindezen túl, elemeztük a MIF által kiváltott RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expressziójában szerepet játszó szignáltranszdukciós útvonalakat. Munkánk során arra a megállapításra jutottunk, hogy a JNK, PKC δ és Src jelátviteli molekulák közvetítik a MIF MMP-2 expressziót stimuláló hatását. Továbbá megfigyeltük, hogy az ENA-78/CXCL5, a gro- α /CXCL1 és a RANTES/CCL5 kemokinek indukálják RA szinoviális fibroblasztok MMP-2 expresszióját. Ezen utóbbi hatást az EGCG gátolja, sugallva ezzel azt, hogy természetes anyagok, ugyanúgy mint farmakológiai ágensek is, gátolhatják az arthritisben kialakuló gyulladásos és destruktív folyamatokat.

5. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

5.1 AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Pakozdi A, Amin MA, Haas CS, Martinez RJ, Haines GK 3rd, Santos LL, Morand EF, David JR, Koch AE, Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther.* 2006;8(4):R132. IF: 4,035
2. Ahmed S, Pakozdi A, Koch AE, Regulation of interleukin-1beta-induced chemokine production and matrix metalloproteinase 2 activation by epigallocatechin-3-gallate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum.* 2006 Aug;54(8):2393-401. IF: 7,751
3. Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 2009 E1, 44-51. IF: 2,989
4. Pakozdi A, Besenyei T, Paragh G, Koch AE, Szekanecz Z. Endothelial progenitor cells in arthritis-associated vasculogenesis and atherosclerosis. *Joint Bone Spine* (in press) IF: 1,659

5.2 AZ EGYÉB TÉMAKÖRBE MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

1. Pakozdi A, Rass P, Lakatos P, Szabo Z, Vegvari A, Szanto S, Szegedi G, Bako G, Szekanecz Z. A D vitamin receptor gén Bsm1 polimorfizmusa rheumatoid arthritisben és társuló osteoporosisban. *Ca és Csont*, 5: 13-22, 2002.
2. Rass P, Pakozdi A, Lakatos P, Szabo Z, Vegvari A, Szanto S, Szegedi G, Bako G, Szekanecz, Z.: A D vitamin receptor gén Bsm1 polimorfizmusának vizsgálata rheumatoid arthritisben és társuló osteoporosisban. *Ca és Csont*, 5: 23-30, 2002.

3. Takacs I, Pakozdi A, Szekanez Z, Vagvolgyi A, Dezso B, Devenyi K, Sapy P. Májresectio ritka parazitás fertőzés miatt. Visceralis típusú larva migrans szindróma. *Orv Hetil*, 145: 1333-1336, 2004.
4. Rass P, Pakozdi A, Lakatos P, Zilahi E, Sipka S, Szegedi G, Szekanez Z. Vitamin D receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis and associated osteoporosis. *Rheumatol Int.*, 26: 964-971, 2006. IF: 1,477
5. Czirjak L, Pakozdi A, Kumanovics G, Varju C, Szekanez Z, Nagy Z, Szucs G. Survival and causes of death in 366 Hungarian patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 67: 59-63, 2008. IF: 6,411
6. Amin MA, Mansfield PJ, Pakozdi A, Campbell PL, Ahmed S, Martinez RJ, Koch AE. Interleukin-18 induces angiogenic factors in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblasts via distinct signaling pathways. *Arthritis Rheum.* 2007 Jun;56(6):1787-97. IF: 7,751
7. Pakozdi A, Howell K, Wilson H, Gonzales L, Black CM, Denton CP, Inhaled iloprost for the treatment of Raynaud's phenomenon, *Clin Exp Rheum* 2008 Jul-Aug;26(4):709. IF: 2.27
8. Haas CS, Amin MA, Ruth JH, Allen BL, Ahmed S, Pakozdi A, Woods JM, Shahrara S, Koch AE. In vivo inhibition of angiogenesis by interleukin-13 gene therapy in a rat model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Aug;56(8):2535-48. IF: 7,751
9. Amin MA, Ruth JH, Haas CS, Pakozdi A, Mansfield PJ, Haghshenas J, Koch AE. H-2g, a glucose analog of blood group H antigen, mediates mononuclear cell recruitment via Src and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Arthritis Rheum.* 2008 Mar;58(3):689-95. IF: 7,751
10. Ahmed S, Marotte H, Kwan K, Ruth JH, Campbell PL, Rabquer BJ, Pakozdi A, Koch AE. Epigallocatechin-3-gallate inhibits IL-6 synthesis and suppresses transsignaling

by enhancing soluble gp130 production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 23;105(38):14692-7. IF: 9,643

11. Rabquer BJ, Pakozdi A, Michel JE, Gujar BS, Haines GK 3rd, Imhof BA, Koch AE. Junctional adhesion molecule C mediates leukocyte adhesion to rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum. 2008 Oct;58(10):3020-9. IF: 7,751
12. Besenyi T, Pakozdi A, Vegvari A, Szabo Z, Szekanecz Z. The role of endothelium, cell migration, chemokines and angiogenesis in inflammatory rheumatic diseases, Hun Immunol 2008;7(1-2):4-21
13. Akin-Deko O, Pakozdi A, Evans DT, Jaleel H, Long term suppressive therapy for genital herpes simplex, Int J STD AIDS. 2009 Feb;20(2):138-9 IF: 1,3
14. Pakozdi A, Wilson H, Fox S, Black CM, Denton CP, Does long term therapy with lansoprazole slow progression of oesophageal involvement in systemic sclerosis?, Clin Exp Rheum (in press) IF: 2.27

5.3 AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN KÉSZÜLT ABSZTRAKTOK

1. Pakozdi A, Amin MA, Martinez RJ, David JR, Koch AE, Macrophage migration inhibitory factor, a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis: decreased production of MMP-2 in MIF gene deficient mice, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, San Diego, 2005
2. Ahmed SA, Pakozdi A, Koch AE, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits IL-1beta-induced chemokine production and MMP-2 activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, Experimental Biology Annual Meeting, San Francisco, 2006

5.4 AZ EGYÉB TÉMAKÖRBEN KÉSZÜLT ABSZTRAKTOK

1. Pakozdi A, Nihtyanova SI, Brough GM, Black CM, Denton CP, Clinical and serological hallmarks of systemic sclerosis overlap syndromes, British Society for Rheumatology Annual Scientific Meeting, Glasgow, 2009
2. Pakozdi A, Wilson H, Fox S, Black CM, Denton CP, Does long term therapy with lansoprazole slow progression of oesophageal involvement in systemic sclerosis?, British Society for Rheumatology Annual Scientific Meeting, Liverpool, 2008
3. Pakozdi A, Howell K, Wilson H, Fox S, Gonzales L, Black CM, Denton CP, Inhaled iloprost for the treatment of Raynaud's phenomenon, British Society for Rheumatology Annual Scientific Meeting, Liverpool, 2008
4. Pakozdi A, Howell K, Black CM, Denton CP, Addition of the short term phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil to iloprost therapy for scleroderma digital vasculopathy, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Boston, 2007
5. Pakozdi A, Howell K, Wilson H, Gonzales L, Black CM, Denton CP, Inhaled iloprost for the treatment of Raynaud's phenomenon, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Boston, 2007
6. Rabquer BJ, Pakozdi A, Michel JE, Imhof BA, Koch AE, Junctional adhesion molecule-C mediates leukocyte recruitment to the rheumatoid arthritis synovium, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Boston, 2007
7. Ahmed S, Kwan K, Pakozdi A, Koch AE, Epigallocatechin-3-gallate downregulates PGE₂ mediated production of interleukin-6 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Boston, 2007
8. Amin MA, Mansfield P, Pakozdi A, Ruth JH, Morand EF, Santos LL, David JR, Koch AE, Macrophage migration inhibitory factor plays an important role in inflammatory

- arthritis models by upregulating monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-1, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Boston, 2007
9. Ruth JR, Haas CS, Amin MA, Allen BL, Ahmed S, Pakozdi A, Woods JM, Shahrara S, Koch AE, IL-13 gene therapy as an effective antagonist of angiogenesis in rat adjuvant induced arthritis, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Boston, 2007
 10. Ahmed S, Pakozdi A, Koch AE, Epigallocatechin-3-gallate inhibits IL-1 β -induced IL-6 production and cyclooxygenase-2 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts in vivo, Experimental Biology Annual Meeting, Washington D.C., 2007
 11. Pakozdi A, Gujar BS, Haas CS, Haines KG, Koch AE, Junctional adhesion molecules in rheumatoid arthritis: upregulation of JAM-B by TNF- α in RA synovial fibroblasts, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Washington D.C., 2006
 12. Amin MA, Mansfield PJ, Pakozdi A, Ruth JH, Campbell PL, Koch AE, Interleukin-18 induces angiogenesis via src and jnk kinase, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Washington D.C., 2006
 13. Czirjak L., Pakozdi A., Kumanovics G., Varju C., Szekanecz Z., Nagy Z., Szucs G.: Survival analysis in systemic sclerosis. Survival and causes of death in a personal series of 366 Hungarian patients. 7th Annual European Congress of Rheumatology, Amsterdam, 2006
 14. Amin MA, Pakozdi A, Mansfield P, Martinez RJ, Koch AE, Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast stromal-derived factor-1 α production via p38, phosphatidylinositol 3 kinase, and nuclear factor kappa B, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, San Diego, 2005
 15. Amin MA, Ruth JH, Haas CS, Pakozdi A, Manion T, Koch AE, Soluble Lewis Y/H Antigen, a novel mediator of monocyte recruitment in rheumatoid arthritis in vitro and

- in vivo via src and phosphatidylinositol 3 kinase pathways, American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, San Diego, 2005
16. Szentpetery A, Pakozdi A, Szucs G, Takacs I, Szekanecz Z, Visceralis larva migrans syndrome in rheumatoid arthritis, Annual National Congress of the Association of Hungarian Rheumatologists, Sopron, 2005
 17. Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z, Szanto S, Csepany T, Szucs G, Suranyi P, Veres K, Soos L, Simon Z, Vancsa A, Pakozdi A, Gaspar L, Soltesz P, Central nervous system demyelination in rheumatoid arthritis: common pathogenic pathway? 4th International Congress on Autoimmunity, Budapest, 2004
 18. Szekanecz Z, Pakozdi A, Matesz K, Dezso B, Csernatony Z, Gaspar L, Szabo J, Szepesi K, Gaspar L, Total hip prosthesis loosening, Annual National Congress of the Association of Hungarian Rheumatologists, Budapest, 2004
 19. Pakozdi A, Szekanecz Z, Association of rheumatoid arthritis and LGL leukaemia, Annual National Congress of the Association of Hungarian Rheumatologists, Szeged, 2003
 20. Soos, L., Vegvari, A., Pakozdi, A., Szekanecz, Z.: Löfgren syndrome: rheumatology and pulmonology, Annual National Congress of the Association of Hungarian Rheumatologists, Szeged, 2003
 21. Szekanecz Z, Rass P, Pakozdi A et al., Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis, Third International Congress on Autoimmunity, Geneva, 2002
 22. Pakozdi A, Szekanecz Z, Rass P et al., Vitamin D receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis, Frigyes Koranyi Scientific Conference, Budapest, 2001