

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**AZ OXIDATÍV STRESSZ HATÁSA A HUMÁN DENDRITIKUS
SEJTEK FENOTÍPUSOS ÉS FUNKCIONÁLIS SAJÁTOSSÁGAIRA**

Pázmándi Kitti Linda

Témavezető: Dr. Bácsi Attila, PhD



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2014

AZ OXIDATÍV STRESSZ HATÁSA A HUMÁN DENDRITIKUS SEJTEK FENOTÍPUSOS ÉS FUNKCIONÁLIS SAJÁTOSSÁGAIRA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Pázmándi Kitti Linda
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Bácsi Attila, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
tagok: Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD
Dr. Nagy György, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet „C” épület tárgyalóterem
2014. szeptember 9. 12:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora
Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora
Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora
Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD
Dr. Nagy György, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2014. szeptember 9. 14:00 óra

I. Bevezetés

Az adaptív immunválasz különböző végrehajtó mechanizmusainak elindításában és polarizációjában meghatározó szerepe van a hivatásos antigén prezentáló sejteknek (APC-k), melyek közül a leghatékonyabbak a dendritikus sejtek (DC-k). Napjainkra a DC-k az immunológiai kutatás egyik fő célpontjaivá váltak, mivel működésük célzott megváltoztatásával, illetve DC alapú vakcinákkal modulálni lehet az immunrendszer működését. Vizsgálataink célja az volt, hogy olyan kísérleti közeget hozzunk létre, mely feltehetően hasonlít azon szöveti környezetre, ahol a DC-k antigénnel, illetve allergénnel találkoznak. Ezen szöveti környezetben a DC-k a természetes immunválaszban résztvevő gyulladásos sejtek által termelt reaktív oxigéngyökök (ROS) hatásainak lehetnek kitéve, mely oxidatív környezet feltevésünk szerint befolyásolhatja a DC-k immunválaszban betöltött szerepét. Így munkánk során átfogóan kívántuk tanulmányozni az oxidatív stressz mielőid vagy más néven konvencionális DC-kre (cDC-k), illetve plazmacitoid DC-kre (pDC-k) gyakorolt hatását.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A ROS-ok és az oxidatív stressz

A molekuláris oxigén nélkülözhetetlen eleme az aerob organizmusok anyagcsere folyamatainak, melyek túlnyomórészt oxidatív folyamatok. Ugyanakkor ezen oxidatív folyamatok melléktermékeként ROS-ok keletkezhetnek, melyek nagyobb koncentrációban oxidatív stresszt idézhetnek elő. Ezen oxigén eredetű termékek párosítatlan szabad elektronjaik révén igen reakcióképesek és erőteljes oxidáló tulajdonsággal bírnak. A szabadgyökök keletkezhetnek exogén, illetve endogén tényezők hatására. Ilyen exogén faktorok lehetnek a dohányzás, az aránytalanul sok, többszörösen telítetlen zsírsavak fogyasztása, a környezetben megjelenő levegőszennyező anyagok, ibolyántúli sugárzás, rádióaktív sugárzás, valamint különböző gyógyszerek, főként kemoterapeutikumok. A ROS-ok endogén forrásaiként szolgálhat a mitokondriális elektrontranszportlánc, valamint számos enzimatis reakció, mely intracelluláris, membrán-asszociált vagy szolubilis enzimrendszerek működése révén valósul meg. Ugyanakkor a természetes immunválasz során kialakuló gyulladásos folyamatok is intenzív ROS képződéssel járnak, ami fontos eleme a mikroorganizmusok elleni

védekező mechanizmusoknak. A ROS-ok káros kémiai láncreakciók beindítói lehetnek, lipidek, fehérjék és DNS molekulák oxidációját okozhatják. Ugyanakkor a sejtek antioxidáns kapacitásuk révén képesek védekezni az őket érő ROS-ok káros hatásaival szemben. Ezen védelmi mechanizmus egy többkomponensű rendszer, melynek nem enzimatis (például aszkorbinsav, karotinok) és enzimatis elemei (szuperoxid-dizmutáz, katalázok, peroxidázok) is ismertek. A sejtek oxidatív állapotát tehát legfőképpen a reaktív gyökök és az antioxidánsok sejten belüli aránya határozza meg.

A már korábban említett endogén vagy exogén tényezők hatására fokozott mennyiségben termelődő ROS-ok a szervezetben felhalmozódva számos betegség kockázatát növelik, mint például a szív- és érrendszeri megbetegedések, ahol a lipidek oxidatív módosítása érelmeszesedés kialakulásához vezethet. Ugyanakkor az öregedési folyamatokban és számos olyan kórkép patogenezisében is jelentős szerepet tulajdonítanak az oxidatív stressznek, mint például a különböző rákos, autoimmun és légúti megbetegedések, illetve neurodegeneratív elváltozások. A sejtekben és a szövetek között fiziológiásan uralkodó hipoxiás milió hosszabb életidőt tesz lehetővé a reaktív gyökök számára, így a ROS-ok nem toxikus koncentrációban a sejtek szignalizációs és regulációs folyamatainak fontos elemeivé válhatnak, ami tükrözi ezen molekulák sejtekre gyakorolt sokrétű hatását.

II.2. A DC-k két fő alpopulációja

Környezetünk, melyben élünk otthont nyújt számos patogén természetű mikroorganizmusnak is, ami veszélyt jelenthet az emberi szervezet számára. Az immunrendszerünk egyik legfontosabb feladata ezen patogének elleni hatékony védekezés, melyet a természetes (veleszületett) valamint az adaptív (szerzett) immunválasz összehangolt működése biztosít. Ezen folyamatokban kiemelkedő szerepe van a természetes és adaptív immunválaszokat összekötő DC-knek. Mai ismereteink szerint a DC-k szöveti lokalizációjuk, eredetük, aktivációs állapotuk és funkcionális sajátásaik alapján rendkívül heterogén sejtpopulációt alkotnak. A jelenlegi irodalmi adatok alapján a humán DC-k morfológiájuk, sejtfelszíni markereik, illetve funkcionális sajátásaik alapján két fő alpopulációra különíthetők el, a cDC-k és a pDC-k csoportjára. A pDC-k - nagyfokú specializációjuknak köszönhetően - a többi sejttypusnál 1000-szer

nagyobb mennyiségű I-es típusú interferon (IFN) termelésére képesek vírusfertőzés hatására, ezáltal az antivirális immunválasz egyik legfőbb képviselői. A pDC-k ugyanakkor gyengébb T sejt indukáló képességgel jellemezhetőek, szemben a professzionális antigén prezentáló cDC-kkel, melyek nélkülözhetetlenek a naív T sejtek aktivációjához. A pDC-knek viszont egyedülálló tulajdonsága, hogy professzionális I-es típusú IFN-t termelő sejtekként terminális differenciálódás nélkül képesek ellátni specializált funkciójukat a virális infekció elleni védekezésben, és ezt követően APC-kké differenciálódva beindíthatják az adaptív immunválaszt. Fiziológias körülmények között a pDC-k a csontvelőben, a limfoid szervekben és a vérben lokalizálódnak, eltérően a cDC-ktől, melyek főként a perifériás szövetekben tartózkodnak. A pDC-k jelenléte a periférián csak közvetlen antigén expozíciónak kitett szövetekben mutatható ki. Antigének felismerését követően a hivatásos APC-kké differenciálódott érett pDC-k képesek indukálni tolerogén, illetve immunogén T sejt differenciációs útvonalakat is, az adott antigén stimulus fajtájától, illetve az adott szöveti környezettől függően. A humán pDC-k ezen kettős tulajdonsága, miszerint tolerogén, illetve immunogén irányba is képesek polarizálni az adaptív immunválaszt, világossá teszi számunkra ezen sejtípus jelentőségét a különböző immun folyamatok szabályozásában.

II.3. A DC-k szerepe a természetes és adaptív immunválasz folyamataiban

A DC-k a természetes immunitás részeként a mikroorganizmusok nagy csoportjait azonosítani képes mintázatfelismerő receptorok (Pattern Recognition Receptor, PRR) széles repertoárjával rendelkeznek. Ezek a sejtfelszínen, citoplazmatikusan vagy endoszómálisan expresszálandó receptorok döntően a kórokozók konzervált, közös vagy hasonló, a gazdaszervezetben nem képződő invariáns molekuláris struktúráit, az úgynevezett patogénekhez társult molekuláris mintázatokat (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) ismerik fel, mint például a bakteriális lipopoliszacharidot, lipoproteineket, vagy a metilálatlan CpG-motívumokat tartalmazó bakteriális vagy virális DNS-t. A PRR-ok közé tartoznak a Toll-like receptorok (TLR), a membrán-asszociált C-típusú lektinek, mint például a mannóz receptorok, amelyek a patogén struktúrákban lévő cukor oldalláncokat ismerik fel. A citoplazmában elhelyezkedő Nod-típusú receptorok bakteriális termékek azonosításában vesznek részt,

míg a RIG-szerű helikázok, illetve az AIM2-szerű receptorok a virális nukleinsavak felismerését teszik lehetővé. A perifériás vérben és szövetekben tartózkodó DC-k ezen receptoraik révén képesek érzékelni a szervezetbe kerülő mikrobákat, majd a szöveti környezet változásaira reagálva ezeket a közeli nyirokszervekbe szállítják, ahol bemutatják a naív T limfocitáknak, beindítva ezáltal az adaptív immunválasz folyamatait.

Az adaptív immunválasz felismerő és végrehajtó (effektor) sejtjei a limfociták, melyek speciális feladataikat csak a természetes immunitás sejtjei és molekulái közreműködésével képesek megfelelő módon elvégezni. A limfociták két funkcionális csoportja a B és T sejtek. Az antigén-specifikus ingerek hatására a B sejtek specifikus ellenanyagot termelő plazmasejttekké differenciálódnak. A T limfociták a natív antigéneket nem képesek felismerni, az antigén felismeréséhez a fehérjék előzetes feldolgozása és megfelelő bemutatása szükséges, melyet a fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC) által kódolt membránfehérjéket kifejező DC-k végeznek. A DC-k a maturáció során az afferens nyirokereken keresztül a környéki nyirokcsomókba vándorolnak, miközben az MHC I és MHC II fehérjék, a kostimulatórikus és az adhéziós molekulák, valamint a DC specifikus érési markerek expressziója fokozódik a sejtfelszínükön. Ezen molekulák sejtfelszíni megjelenése mind szükséges az immunológiai szinapszis kialakításához, amely a T sejtek általi antigén specifikus felismerést teszi lehetővé.

Az antigén prezentációt követően a naív T sejtek különböző effektor T sejtekké differenciálódhatnak az antigén stimulustól függően. Az effektor T sejteknek több alpopulációját is megkülönböztetjük, úgy, mint segítő (helper) T (Th) 1 sejtek, Th2, Th17, Th9, Th22, regulatórikus T (Treg) sejtek, illetve follikuláris helper T (Tfh) sejtek. A Th1 sejtek effektor funkciói közé tartozik az intracelluláris patogének eliminációjának segítése, melyet az IFN- γ termelésével tesznek lehetővé, mely citokin makrofág aktivációt eredményez. A Th2 sejteknek kiemelkedő szerepe van az egysejtű paraziták és férgek elleni immunválaszban, valamint részt vesznek az allergiás reakciókban is. A Th17 sejtek a neutrofilek mediálta gyulladásos válaszok létrejöttét, illetve a B sejtek aktivációját, valamint plazmasejtté való differenciálódását segítik. A Th9 effektor sejtek szerepet játszanak az allergiás reakciókban, az autoimmun folyamatokban, illetve a tumor-ellenes immunválaszokban. A Th22 sejtek pedig egyaránt részt vesznek anti-

inflammatorikus és pro-inflammatorikus reakciókban is. Az immunológiai tolerancia kialakításának legfőbb elemei a Treg-ek, melyek főként az ártalmatlan antigének ellen kialakuló T sejt válaszok kontrollálásában játszanak szerepet, mellyel elkerülhető a krónikus sejt aktiváció és gyulladás. A Tfh sejtek az effektor T sejtek olyan speciális alpopulációját képezik, melyek a limfoid szövetek folliculáris régiójában lokalizálódva az antigén-specifikus B sejt immunválasz kialakulását segítik. A Th sejtek mellett a másik nagy effektor T sejt populációt a specifikus ölképességgel is rendelkező citotoxikus T sejtek alkotják, melyek kiemelkedő jelentőséggel bírnak a fertőzött és a tumoros sejtek elpusztításában.

A fentebb ismertetett effektor T sejtek az adaptív immunválaszban betöltött funkciójukat csak a DC-k által képesek véghezvinni, mely sejtek közvetlen kapcsolatot képesek teremteni az antigén-specifikus segítő és citotoxikus T limfociták előalakjaival és az általuk termelt citokinek révén befolyásolni tudják a T sejtek aktivációját, illetve polarizációját.

II.4. Az oxidatív stressz és a DC-k kapcsolata

II.4.1. Az oxidatív stressz lehetséges hatása a humán DC-k funkcióira

Az antigén expozíció helyén lévő, vagy a gyulladás helyére érkező, a vérkeringésből kilépő DC-k olyan szöveti környezetbe kerülnek, ahol a gyulladásos válasz során termelődött ROS-ok hatnak rájuk, ami befolyásolhatja az immunválaszban betöltött szerepüket. Több tanulmány is beszámol arról, hogy a CD14⁺ monocitákból differenciált DC-ken a hidrogén peroxid (H₂O₂) indukálja a MHC I fehérjék, illetve az MHC II osztályba tartozó HLA-DQ és HLA-DR sejtfelszíni fehérjék expresszióját, valamint fokozza a DC-k T sejt proliferáló képességét. Xantin-oxidáz/xantin enzim-szubsztrát rendszer segítségével kiváltott oxidatív stressz szintén fenotípusos változásokat eredményezett monocitákból származó DC-ken, ami megnyilvánult a sejtek kostimulátorikus és érési markereinek fokozott sejtfelszíni expressziójában. Igazolták továbbá, hogy oxidatív stressz körülményei között a DC-k endocitotikus aktivitása nagymértékben csökkent, ami a DC-k érése utal. Megfigyelték azt is, hogy a H₂O₂-kezelt DC-k TNF- α pro-inflammatorikus citokin, illetve IL-8 kemokin szekréciója fokozódik. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a DC-k esetében az

oxidatív stressz aktivációs szignálként funkcionálhat az adott antigén stimulus mellett. Ugyanakkor az irodalomban nincs adat arra nézve, hogy a pDC-k, amelyek számos tekintetben különböznek a legtöbb vizsgálatban modellként alkalmazott cDC-ktől, hogyan viselkednek oxidatív stressz körülményei között. Így munkám során célul tűztem ki a pDC-k oxidatív stresszre adott válaszreakciójának tanulmányozását.

II.4.2. Allergének által kiváltott oxidatív stressz hatása a DC-k aktivációjára

A pollen eredetű allergiás megbetegedések gyakorisága az elmúlt évtizedekben olyan mértékben megemelkedett, hogy a fejlett országokban az allergiát ma már népbetegségként tartják számon. Hazánkban a parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*) pollenje igen jelentős aeroallergénnek számít, a lakosság közel 20 %-a szenved különböző parlagfű pollen által kiváltott allergiás megbetegedésekben. Az intakt parlagfű pollenszem mérete (20-30 μm) túl nagy ahhoz, hogy az alsóbb légutakba penetráljon, így a felső légutakba jutva okozza a klasszikus allergia tüneteit a parlagfűre érzékeny egyéneknél. Ugyanakkor korábbi kutatási eredmények alapján elmondható, hogy a pollenszemekből hidratáció során úgynevezett szubpollen partikulák (SPP-k) szabadulnak ki, melyek megőrzik az intakt pollenszemekre jellemző allergén komponenseket, illetve ROS generálására képes NAD(P)H oxidáz enzimeket, ezáltal fontos szerepet játszanak az allergiás tünetek kiváltásában. A belégzett SPP-k méretüknél fogva (0,5 – 4,5 μm) már képesek az alsóbb légutakba jutni, ahol közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a légúti DC-kkel. A légúti allergének által kiváltott allergiás reakciók mechanizmusa viszonylag jól tanulmányozott, valamint az is ismert, hogy a ROS-oknak meghatározó szerepe lehet ezen gyulladásos folyamatokban, viszont az aeroallergének által kiváltott allergiás kórképek szenzitizációs lépései kevésbé ismeretesek. Feltételezésünk szerint az SPP-knek fontos szerepük lehet a pollen által indukált allergiás megbetegedések szenzitizációs fázisában, így céljaim között szerepelt az SPP-k DC aktiváló képességének vizsgálata, különös figyelmet fordítva arra, hogy az SPP-k által termelt ROS-oknak milyen szerepük lehet ezen folyamatokban.

II.5. Célkitűzések

1. Antigén expozíciót követően a gyulladás helyére érkező pDC-k a vérkeringésből kilépve olyan szöveti környezetbe kerülnek, ahol oxidatív stressz éri őket, így kísérleteink során tanulmányozni kívántuk, hogy a H₂O₂ kezeléssel kísérletesen kiváltott, oxidatív stressz:

- hogyan befolyásolja a pDC-k életképességét,
- milyen változásokat eredményez aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával aktivált pDC-k fenotípusos, illetve funkcionális tulajdonságaiban,
- milyen hatással van a pDC-k allogén T sejt aktiváló képességére,
- hogyan befolyásolja a pDC-k autológ naív T sejt polarizáló képességét.

2. Korábbi tanulmányok szerint, a pollenszemekből hidratáció során kiszabaduló SPP-k hordozzák az intakt pollenszemekre jellemző allergén komponenseket, illetve ROS generálására képes NAD(P)H oxidáz enzimeket, ezáltal fontos szerepet játszanak a légúti allergiás gyulladás kiváltásában. Méretüknél fogva pedig képesek az alsóbb légutakba jutni, ahol közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a DC-kkel, így jelentős szerepük lehet a pollen-indukált allergiás reakciók szenzitizációs fázisában is. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy:

- a humán cDC-k képesek-e az SPP-k felvételére,
- az SPP kezelés aktiválja-e a cDC-ket, ha igen, akkor milyen fenotípusos, illetve funkcionális változásokat eredményez a cDC-ken,
- az SPP kezelés hogyan befolyásolja a cDC-k T sejt proliferációt indukáló, illetve allogén T sejt aktiváló képességét,
- az SPP-k NAD(P)H oxidáz enzimjei által termelt ROS-oknak milyen szerepe lehet a DC aktivációban és ezáltal a természetes, illetve adaptív immunválasz folyamataiban.

III. Metodikák

III.1. Etikai nyilatkozat

A kísérletekhez használt, humán eredetű vérkészítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat debreceni Regionális Vérellátó Központjának közreműködésével kaptuk. A human vérkészítményekkel történő munkát az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatója, valamint a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte. Minden vérvétel a donorok előzetes, írásos beleegyezésével történt és a donorok adatainak feldolgozása valamint megőrzése az Orvos Világszövetség által kiadott Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveit követve valósult meg.

III.2. Humán sejtpopulációk izolálása perifériás vérből

Kísérleteinkhez a humán DC-eket és T sejteket egészséges véradók perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből (PBMC) nyertük, mágneses izolálási technikán alapuló sejtseparációval. Ficoll-Paque oldattal (GE Healthcare) történő sűrűség-alapú gradiens centrifugálást követően, az előállított PBMC-ből a megfelelő sejtizoláló kitek (Miltenyi Biotec) segítségével izoláltuk a kísérletekhez szükséges sejtpopulációkat, követve a gyártó által megadott utasításokat. A szeparálást követően a sejtpopulációk tisztasága minden esetben 96 % felettinek adódott.

III.3. Humán cDC-k differenciáltatása CD14⁺ monocitákból

A frissen izolált CD14⁺ monocitákat 24 lyukú tenyésztőlemezben 2×10^6 sejt/ml koncentrációban RPMI 1640 (Sigma Aldrich) médiumban szétosztottuk. A tápfolyadékot 2 mM L-glutaminnal (Sigma Aldrich), 100 U/ml penicillinnel, 100 ng/ml streptomycinnel és 10% végkoncentrációjú hőinaktivált magzati borjú savóval (Invitrogen) egészítettük ki. A differenciációhoz szükséges citokineket, a 80 ng/ml granulocita-makrofág-kolónia stimuláló faktort (Gentaur Molecular Products) és a 100 ng/ml IL-4-et (Peprotech) a differenciáció 0., illetve a 2. napján adtuk a sejtekhez. A differenciáció 5. napján a sejtek több mint 90%-a éretlen DC fenotípust (DC-SIGN/CD209⁺, CD14⁻) mutatott.

III.4. SPP-k izolálása és enzimaktivitásuk vizsgálata

Az SPP-ket intakt parlagfű pollenszemekből (Greer Laboratories) izoláltuk. A pollenszemeket (100 mg) 10 ml steril endotoxin-mentes desztillált vízben 90 percig 4 °C-on hidratáltuk, majd az intakt pollenszemeket alacsony sebességen történő centrifugálással (1600 g, 5 perc, 4 °C) távolítottuk el. A felülúszóból szűrést (Minisart Sterile 5 µm Filter, Supelco Analytical) követően, magas fordulatszámon történő centrifugálással (9000 g, 15 perc, 4 °C) nyertük ki az SPP-ket. A partikulákat tartalmazó pelletet steril, endotoxin-mentes PBS-ben vettük fel és Neubauer kamra segítségével meghatároztuk az SPP-k darabszámát, illetve endotoxin detektálására alkalmas kittel (Lonza Group Ltd.) az SPP szuszpenziók endotoxin tartalmát. Az SPP preparátumokban detektálható igen alacsony endotoxin koncentráció (28 pg/ml) alapján elmondható, hogy kísérleteinket az SPP preparátumok endotoxin tartalma valószínűleg nem befolyásolhatta. A frissen izolált SPP-k NAD(P)H oxidáz enzimaktivitásának vizsgálatához 50 µM koncentrációjú 2', 7'-dihidro-dichlorofluorescein diacetát (H₂DCF-DA; Invitrogen) oldatot és szubsztrátként 100 µM-os NADPH-t használtunk. A kontroll kísérletekhez 72°C-on 30 percig hőinaktivált SPP-t (SPP^H), illetve NAD(P)H oxidáz gátlót, difenilén-jodóniumot (DPI, 5 µM; Sigma Aldrich) alkalmaztunk. Az enzimaktivitás hatására történő fluoreszcencia intenzitás-változást Synergy HT multiplate olvasóval (Bio-TEK® Instruments) 488/530 nm hullámhosszon detektáltuk.

III.5. A DC-k kezelése

A kísérletesen kiváltott oxidatív stressz körülményeinek létrehozásához a sejteket stabilizált H₂O₂ (Sigma Aldrich) megfelelő hígításaival (0,01-10 µM) kezeltük. Antioxidánsként 30 mM-os N-acetil-ciszteint (NAC, Sigma Aldrich) alkalmaztunk. A pDC-k aktiválása TLR7 receptor agonistával (imiquimod, R837, 2,5 µg/ml; Invivogen) történt, 24 órás inkubálással. A cDC-k SPP-vel történő kezelésekor a frissen izolált SPP-ket 1:15 (cDC/SPP) arányban adtuk a sejtekhez a NAD(P)H oxidáz enzim szubsztrátja, 100 µM NADPH (Sigma Aldrich) jelenlétében vagy anélkül. A kontroll kísérletekhez 72°C-on 30 percig hőinaktivált SPP-t (SPP^H), illetve NADPH oxidáz gátlóval, DPI-al (5 µM; Sigma Aldrich) 30 percig előkezelt SPP-t alkalmaztunk. A feleslegben maradt DPI-t

mosási lépéssel távolítottuk el az SPP preparátumokból. A kezelések időtartama 1, 4, illetve 24 óra volt, az adott kísérleti módszereknek megfelelően.

III.6. Sejtek életképességének vizsgálata

A sejtek életképességét 10 µg/ml koncentrációjú 7-aminoactinomycin D / 7-AAD (Sigma Aldrich) festék segítségével vizsgáltuk, amely DNS interkalátorként a nekrotikus sejtek nukleinsavát festi meg és áramlási citometriás mérésekre alkalmas.

III.7. Sejtek intracelluláris ROS termelésének meghatározása

A sejteket 50 µM végkoncentrációjú fluoreszcens ROS-szenzitív H₂DCF-DA (Invitrogen) festék oldattal inkubáltuk sötétben, 20-25 percig 37 °C-os termosztátban. Az inkubációs idő letelte után a fölösleges festéket PBS-es mosással távolítottuk el. A H₂DCF-DA festékkel töltött sejtek intracelluláris ROS szintjét a különböző kezelésekkel követően, a fluoreszcencia intenzitás mérésével határoztuk meg FL1 csatornában (530±15 nm) áramlási citométerrel.

III.8. Sejtek fenotípusos vizsgálata

Kezeléseket követően a DC-k sejtfelszíni markereinek expressziójában bekövetkező változásokat az adott sejtfelszíni antigén elleni, fluoreszcens festékkel konjugált monoklonális antitestek, illetve megfelelő izotípusú antitest kontrollok felhasználásával, áramlási citometriás méréssel detektáltuk. Az általunk használt monoklonális antitestek a következők voltak: anti-CD40, anti-CD83, anti-OX40-L, anti-PDL-1 (mind a BD Pharmingen-től), anti-CD80, anti-HLA-DQ (mindkettő a BioLegend-től), anti-CD86 (R&D Systems), anti-ICOS-L (eBioscience). A FACSCalibur citométerrel (BD Biosciences Immunocytometry Systems) mért adatok kiértékelése FlowJo szoftver (TreeStar) segítségével történt.

III.9. Sejtek citokin és kemokin szekréciójának detektálása ELISA módszerrel

A sejtek felülszójából a szekretált citokinek, illetve kemokinek mennyiségét szendvics technikán alapuló, enzim-kötött immunszorbens (ELISA) módszerrel határoztuk meg. Az általunk vizsgált mediátorok között szerepeltek az IL-1β, IL-6, IL-

10, IL-12 (70), IL-17, TNF- α , TGF- β 1 (mind a BD OptEIA; BD Biosciences-től), IFN- α (PBL InterferonSource) citokinek, illetve az IL-8 kemokin (BD OptEIA; BD Biosciences). Az abszorbanciát Synergy HT multiplate olvasó (Bio-TEK® Instruments) segítségével 450 nm hullámhosszon detektáltuk.

III.10. A cDC-k SPP felvétele

Kísérleteink során az SPP izolátumokat fluoreszcens CellVue® Jade festékekkel (45 perc, 4 °C; Polysciences Inc.) konjugáltuk. Ezt követően a sejteket 4 óráig inkubáltuk a fluoreszcensen konjugált SPP preparátummal 4 és 37°C-on, majd áramlási citometria segítségével FL1 fluoreszcens csatornában (530 $\pm$ 15 nm) vizsgáltuk a CellVue® Jade pozitív sejtek arányát a sejt kultúrákban. A mikroszkópos vizsgálatokhoz a fluoreszcens festékekkel konjugált SPP-kkel kezelt DC-ket fixáltuk, majd PE-vel konjugált, specifikus DC markerrel (DC-SIGN/CD209; R&D Systems) jelöltük. A sejteket tárgylemezre helyezve, konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp (Zeiss LSM 510 mikroszkóp, Carl Zeiss AG) segítségével vizsgáltuk. A CellVue® Jade festékekkel konjugált SPP-k fluoreszcens jelét 505-550 nm-en, a jelölt DC-k fluoreszcens emisszióját 560-615 nm-en detektáltuk.

III.11. Proliferációs assay

A proliferációs tesztekhez sejtmembrán permeábilis, fluoreszcens karboxifluorescein szukcinimidil észter (CFSE) festékekkel (Invitrogen) jelölt allogén, naív CD4⁺ T sejteket ko-kultiváltunk megfelelően előkezelt DC-kkel 1:20 arányban (DC: T sejt arány) 1 μ g/ml koncentrációjú anti-CD3 monoklonális antitest (DB Pharmingen) jelenlétében. Öt napos ko-kultivációt követően áramlási citométerrel vizsgáltuk a T sejtekben jelenlévő CFSE festék fluoreszcencia intenzitásának feleződését, mely a T sejtek DC aktivációra bekövetkező proliferációját mutatja meg.

III.12. T sejt polarizáció meghatározása ELISPOT módszer segítségével

A megfelelően előkezelt DC-kkel történő aktiválást követően a T sejtek citokin válaszát IFN- γ -ra, IL-4-re és IL-17-re specifikus enzim-kötött immunszorbens SPOT (ELISPOT) tesztekkel (eBioscience) detektáltuk. Kísérleteinkhez előaktivált DC és allogén CD3⁺ pan-T sejt (1:10) ko-kultúrákat hoztunk létre, majd négy napos inkubációt

követően a CD3⁺ pan-T sejteket a detektálandó citokinre specifikus antitesttel fedett, illetve 10 % FCS-t tartalmazó médiummal blokkolt ELISPOT lemezekre osztottuk szét. A 24 és 48 órás inkubálást követően a sejteket mosással eltávolítottuk, majd az ELISPOT kitek leírását követve biotin-konjugált detektor antitesttel inkubáltuk a lemezeket. Ezt követte a torma-peroxidáz-avidin konjugátum, illetve az enzim szubsztrátjának (AEC, 3-amino-9-ethylcarbazol; BD Biosciences) a felvitele a lemezekre. Az enzim-szubsztrát reakció révén keletkező, színes spotok formájában megjelenő termék detektálása ImmunoScan analizátorral történt, ImmunoSpot 4.0 szoftver (C.T.L.-Cellular Technology Ltd.) segítségével.

III.13. Intracelluláris citokin meghatározás áramlási citométerrel

A T sejt polarizációs kísérletekhez megfelelő módon előkezelt DC-ket ko-kultiváltunk autológ naív T sejtekkel 1:10 arányban humán anti-CD3 monoklonális antitest (BD Pharmingen) jelenlétében. Hat napos ko-kultivációt követően a T sejteket poliklonális aktivátorokkal (2,5 µg/ml humán anti-CD3 monoklonális antitest [BD Pharmingen], 100 ng/ml phorbol 12-miristil 13-acetát, 1 µg/ml ionomycin [Sigma Aldrich]) 7 órán keresztül újraaktiváltuk, a megfelelően detektálható intracelluláris citokinszint elérése érdekében. Az aktiválás utolsó öt órájában a sejtekhez GolgiStop (BD Biosciences) fehérje transzport gátlót adtunk, meggátolva a termelt citokinek extracelluláris térbe történő szekrécióját. Fixálást és permeabilizálást követően a T sejteket IFN- γ -ra és IL-4-re specifikus fluoreszcensen konjugált monoklonális antitest koktéllal és a megfelelő izotípus kontrollal (BD Biosciences) jelöltük és a fluoreszcencia intenzitás-változást áramlási citométerrel detektáltuk.

III.14. Statisztikai elemzés

Az adatok statisztikai analízisére Student-féle t-próbát, valamint variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni post-hoc teszttel. A statisztikai számítások elvégzéséhez SPSS 12.0 programot (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) használtunk. A választott szignifikancia szint: $P < 0,05$.

IV. Eredmények

IV.1. Oxidatív stressz hatásának vizsgálata humán pDC-ken

IV.1.1. A human pDC-k és cDC-k oxidatív stressztűrésének összehasonlítása

Kísérleteinkkel először arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a DC-k milyen mértékben képesek kivédeni a ROS-ok káros hatásait. Így pDC-eket, illetve cDC-eket kezeltünk növekvő koncentrációjú H_2O_2 -vel, majd 7-AAD festék segítségével vizsgáltuk a sejtek életképességét 24 órás inkubációt követően. Az alkalmazott 0,1, 1 és 10 μM -os H_2O_2 koncentrációk mellett a pDC-k életképessége 48, 60, illetve 88%-kal csökkent a kezeletlen sejtekhez képest. Ugyanakkor a cDC-k esetében csak a legnagyobb koncentrációjú, a 10 μM -os H_2O_2 kezelésnél detektáltunk szignifikáns életképesség csökkenést. A sejtek antioxidáns (NAC) történő előkezelése mind a pDC-k és mind a cDC-k esetében felfüggesztette az oxidatív stressz viabilitásra gyakorolt káros hatását, mely azt mutatja, hogy a sejtek kezelést követő életképesség csökkenését valóban a H_2O_2 kezelés idézte elő. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a legalacsonyabb H_2O_2 koncentráció (0,01 μM), mely nem befolyásolja a pDC-k életképességét, megnöveli-e a sejtek intracelluláris ROS szintjét. A sejteket fluoreszcens, ROS-szenzitív $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ festékkel töltöttük meg, majd kezelést követően vizsgáltuk a DCF fluoreszcencia változását. A pDC-k esetében már az alacsony koncentrációjú H_2O_2 kezelés is $3,7 \pm 2,3$ -szoros DCF fluoreszcencia növekedést eredményezett, míg a cDC-knél csak 100-szor nagyobb H_2O_2 koncentrációnál (1 μM) tudunk fluoreszcencia emelkedést detektálni. A két sejttípus antioxidáns kapacitása közötti különbséget mutatta az is, hogy a cDC-k esetében az alacsony koncentrációjú H_2O_2 (0,01 μM) kezelést követően 20 perc elteltével a sejtkultúra felülszójában már nem lehetett kimutatni H_2O_2 -t, míg a pDC kultúrák felülszójában csak 15 perccel később csökkent a H_2O_2 koncentrációja a fluorimetriás módszerrel detektálható határérték alá.

További kísérleteinkben az alacsony koncentrációjú H_2O_2 kezelést (0,01 μM) alkalmaztuk, melynél a pDC-k életképessége a kezeletlen mintákéhoz hasonló volt, így a nekrotizáló sejtek nagyobb arányú jelenléte nem befolyásolhatta kísérleti eredményeinket.

IV.1.2. Oxidatív stressznek kitett pDC-k fenotípusos vizsgálata

A H_2O_2 kezelés által kiváltott fenotípusos változásokat áramlási citométer segítségével detektáltuk. A vizsgált sejtfelszíni markerek között szerepeltek kostimulatórikus molekulák (CD40, CD80, CD86), érési marker (CD83), valamint az antigén prezentációban központi szerepet játszó HLA-DQ fehérje. A H_2O_2 kezelés csak kismértékben változtatta meg a CD40, CD80, CD86, illetve CD83 fehérjék expresszióját, ugyanakkor jelentős mértékben csökkentette a HLA-DQ protein szintjét a sejteken. Ha a pDC-ket R837-tel, azaz a TLR7 receptor egyik agonistájával kezeltük, akkor minden általunk vizsgált sejtfelszíni marker expressziós szintje ugrásszerűen megnőtt, viszont együtt alkalmazva az aktivátort a H_2O_2 -vel, a H_2O_2 felfüggesztette a TLR7 agonista pDC-kre gyakorolt aktiváló hatását.

A fenotípusos vizsgálatok eredményei alapján fontosnak tartottuk kizárni a H_2O_2 kezelés R837 ligandra kifejtett esetleges oxidáló hatását, mely negatívan befolyásolhatja a ligand receptorhoz való kötődését. Így fenotípusos vizsgálatainkat megismételtük olyan kondíciók mellett is, ahol a pDC-khez nem az R837-tel együtt, hanem az R837-tel történő kezelést követően, 30 perccel később adtuk a H_2O_2 -ot. Ezen időintervallum alatt az R837 már hozzákötődik a receptorához, így kizárható hogy a H_2O_2 közvetlenül befolyásolja a ligand-receptor kölcsönhatást. Ilyen kísérleti kondíciók mellett is hasonló eredményeket kaptunk, mint az R837 és a H_2O_2 egyidejű alkalmazása esetén, így valószínűsíthető, hogy a H_2O_2 kezelés nem az R837 ligand és a TLR7 receptor közötti interakció befolyásolásával, hanem más mechanizmussal módosítja a pDC-k működését.

IV.1.3. Oxidatív stressz hatása a pDC-k citokin és kemokin termelésére

A kezeléseket követően a sejtkultúrák felülúszójából meghatároztuk a sejtek citokin (IL-6, TNF- α , IFN- α), illetve kemokin (IL-8) szekrécióját ELISA módszer segítségével. Önmagában a H_2O_2 kezelés nem indukálta egyik általunk vizsgált mediátor szekrécióját sem, míg a TLR7 agonista jelentős mértékben növelte a sejtek citokin, illetve kemokin termelését. A TLR7 agonista és a H_2O_2 együttes alkalmazása esetén a citokinek, illetve a kemokin mennyisége lecsökkent a felülúszókban, a kizárólag TLR7 liganddal aktivált sejtekéhez képest, ami azt mutatja, hogy az oxidatív stressz gátolja a

pDC-k aktiválódását. Az IFN- α esetében csak a TLR7 agonistával aktivált sejtek felülúszójából tudtunk kimutatni citokint.

IV.1.4. Oxidatív stressznek kitett pDC-k allogén T sejt aktiváló képessége

További kísérleteinkben az oxidatív stressznek kitett pDC-k allogén T sejt aktiváló képességét vizsgáltuk, amihez H₂O₂-vel és R837-tel előkezelt pDC-ket együtt tenyésztettünk allogén CD3⁺ pan-T sejtekkel, majd 4 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T sejtek IL-4, IL-17 és IFN- γ termelését ELISPOT módszerrel, mert ezek a citokinek felvilágosítást adhatnak az adaptív immunválasz polarizáltságát illetően. Az allogén T sejtekkel történő ko-kultivációt követően megfigyeltük, hogy a TLR7 agonistával kezelt pDC-k mindhárom citokin termelését fokozzák, míg az oxidatív stressznek kitett pDC-k hatékonyabban aktiválják az IL-4-termelő T sejteket, mint a kezeletlen pDC-k. A H₂O₂ kezelés ugyanakkor nem változtatta meg a pDC-k IFN- γ - vagy IL-17-termelő T limfocitákat aktiváló képességét.

IV.1.5. Oxidatív stressz hatása a pDC-k naív T sejt polarizáló képességére

Az oxidatív stressznek kitett pDC-k naív T sejt polarizáló képességének meghatározásához H₂O₂-vel és R837-tel előkezelt pDC-ket együtt tenyésztettünk autológ naív T sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T sejtek tulajdonságait. A H₂O₂-vel előkezelt pDC-ket tartalmazó ko-kultúrák felülúszójában a Treg sejtek kialakulását jelző IL-10 citokin szintje alacsonyabb volt, mint a többi ko-kultúra esetében, illetve a H₂O₂-vel előkezelt pDC-k fenotípusa sem kedvezett a Treg sejtek kialakulásának, mivel az oxidatív stressz nem fokozta a tolerogén markerek (ICOS-L, PDL-1) expresszióját a pDC-ken. A H₂O₂-vel előkezelt pDC-k nem indukálták az IL-17 citokin termelő T sejtek keletkezését sem. Ugyanakkor a ko-kultúrákban intracelluláris citokin festéssel kimutattuk, hogy a naív autológ T sejtekkel történő ko-kultiváció előtt oxidatív stressznek kitett pDC-k inkább Th2 (IL-4 termelő T sejtek), mint Th1 (IFN- γ termelő T sejtek) irányú polarizációt segítenek elő, valószínűleg a fokozott OX40-L kifejeződés következtében.

IV.2. Parlagfű SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-ok hatásainak vizsgálata humán cDC-ken

IV.2.1. SPP kezelés által indukált oxidatív stressz vizsgálata cDC-ken

Munkánk során a cDC-eket parlagfű SPP izolátumokkal kezeltük meg, melyeket intakt parlagfű pollen hidratálása révén nyertünk. Minden parlagfű SPP izolálást követően ROS-szenzitív, fluoreszcens H_2DCF -DA festék segítségével megvizsgáltuk a preparátumok NAD(P)H oxidáz aktivitását. A frissen izolált SPP mintákban a DCF fluoreszcencia 2,5-szörös emelkedést mutatott a PBS kontrollhoz viszonyítva, és ez a növekedés az enzim szubsztrátjának (NADPH) jelenlétében tovább fokozódott. Az SPP-k $72^{\circ}C$ -on 30 percig történő inaktiválása, valamint az enzim specifikus, membrán szolubilis gátlószerének (DPI) használata a fent leírt jelenséget felfüggesztette. A következőkben a NAD(P)H oxidáz aktivitással bíró SPP szuszpenziókkal kezeltük meg a ROS-szenzitív H_2DCF -DA festékkel töltött cDC-eket, majd vizsgáltuk az intracelluláris ROS szintjének változását a sejtekben. Az SPP kezelés szignifikáns növekedést eredményezett az intracelluláris DCF fluoreszcenciában, melyet az enzim szubsztrátjának, azaz a NADPH-nak a jelenléte tovább fokozott. A hőinaktivált SPP-vel (SPP^H) történő kezelés, illetve a DPI kezelés önmagában nem eredményezett DCF fluoreszcencia növekedést a kezeletlen mintákhoz képest. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a cDC-k intracelluláris ROS szint növekedését főként az SPP-k NAD(P)H oxidáz aktivitása okozta.

IV.2.2. A cDC-k SPP felvételének vizsgálata

Fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy a cDC-k milyen mértékben képesek felvenni az SPP-eket, így kísérleteinkben fluoreszcensen jelölt SPP-vel kezeltünk meg cDC-eket $4^{\circ}C$ -on, illetve $37^{\circ}C$ -on, majd 4 óra elteltével áramlási citométer segítségével vizsgáltuk az SPP pozitív sejtek arányát a sejt kultúrákban. Az SPP pozitív sejtek aránya a $37^{\circ}C$ -on történt kezeléseket követően - donortól függően - 25-58 % -nak adódott. A citometriás mérések alapján nem dönthető el, hogy az SPP pozitív sejtek valóban felvették-e a partikulákat, vagy azoknak csak a sejtmembránhoz való kötődése eredményezi a pozitivitást, így az SPP-k sejten belüli lokalizációját konfokális mikroszkópos felvételek segítségével is igazoltuk.

IV.2.3. Az SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-ok hatásai a cDC-k fenotípusos és funkcionális tulajdonságaira

Az SPP kezeléseket követően megvizsgáltuk a sejtek fenotípusos változásait. A vizsgált sejtfelszíni markerek között szerepeltek a CD40, CD80, CD86 kostimulatórikus molekulák, illetve az antigén prezentációban szerepet játszó HLA-DQ fehérje. Az SPP kezelés fokozta mind a négy sejtfelszíni fehérje expresszióját. Ha az SPP kezelés NADPH jelenlétében történt, akkor további növekedés volt tapasztalható a fehérjék expressziós szintjében, de ez az emelkedés csak a CD40, illetve a CD80 molekulák esetében volt szignifikáns. Az SPP^H-val, illetve a NAD(P)H oxidáz gátlószerével, azaz DPI-vel történő kezelés nem eredményezett statisztikailag szignifikáns változásokat egyik sejtfelszíni protein kifejeződésében sem.

Az SPP kezelt sejtek citokin, illetve kemokin szekrécióját vizsgálva megállapítottuk, hogy az SPP kezelés nem indukálja az IL-1 β , illetve az IL-12 pro-inflammatórikus citokinek termelődését, viszont az IL-6, TNF- α , IL-8 és IL-10 fehérjék szekrécióját fokozza. A NADPH szubsztrát jelenléte további növekedést eredményezett az IL-6, TNF- α és IL-8 fehérjék szintjében, viszont ezen változás csak az IL-8 kemokin esetében volt statisztikailag szignifikáns. A fenotípusos változásokhoz hasonlóan az SPP^H, illetve a DPI kezelés nem mutatott szignifikáns változásokat egyik citokin, illetve kemokin esetében sem.

IV.2.4. SPP kezelt cDC-k T sejt proliferáló képességének vizsgálata

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy az SPP kezelt cDC-k milyen mértékű T sejt proliferációt képesek indukálni. Így SPP kezelt cDC-ket ko-kultiváltunk CFSE-vel jelölt naív T sejtekkel, majd 5 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T sejtek osztódását áramlási citométer segítségével. Az SPP kezelt cDC-k 71,1 %-os T sejt proliferációt idéztek elő, míg NADPH jelenlétében aktiválódott cDC-k a T sejtek 83,3 %-át készítették osztódásra. Az SPP^H-val előkezelt cDC-k a kezeletlen cDC-khez képest szintén fokozták a T sejt osztódást, de kisebb mértékben, mint az SPP kezelt cDC-k, illetve az SPP^H-val kezelt cDC-k esetében a NADPH jelenléte nem fokozta a T sejt proliferációt indukáló képességet. Ugyanakkor mind az SPP, illetve mind az SPP^H kezelt cDC-k DPI jelenlétében nem voltak képesek T sejt osztódást indukálni a ko-kultúrákban.

IV.2.5. SPP kezelés hatása a cDC-k allogén T sejt aktiváló képességére

Az SPP kezelt cDC-k allogén T sejt stimuláló képességének vizsgálatához az SPP kezelt cDC-ket ko-kultiváltunk parlagfű allergiás, illetve nem allergiás egyének CD3⁺ pan-T sejtjeivel. A donorok atópiás státuszának megállapítása a szérum össz-IgE, illetve a parlagfű specifikus IgE szint alapján történt. A 6 napos ko-kultivációt követően megvizsgáltuk a T sejtek IL-4, IFN- γ , IL-17 citokin termelését ELISPOT módszer segítségével. A ko-kultúrák felülszójából az IL-10 és TGF- β 1 citokineket ELISA módszerrel mértük. Ezen citokinek ugyanis felvilágosítást adhatnak az adaptív immunválasz polarizáltságáról. Az allogén CD3⁺ pan-T sejtekkel történő ko-kultivációt követően a sejt kultúrákban nem voltak jelen IL-10 és TGF- β 1 termelő tolerogén T sejtek, míg az SPP-vel kezelt cDC-k aktiválták az IFN- γ , illetve IL-17 szekretáló T sejteket, függetlenül a donor atópiás státuszától. Ugyanakkor az IL-4 citokint termelő T sejtek aktivációját kizárólag parlagfűre allergiás egyének mintáiban tudtuk detektálni. Ezekben a kísérleteinkben az SPP kezelt cDC-k a NAD(P)H oxidáz szubsztrátjának, azaz exogén NADPH-nak a jelenlétében nagyobb mértékű T sejt aktivációt okoztak mindhárom T sejt populáció esetében. Ezzel szemben az SPP kezelt cDC-k specifikus NAD(P)H oxidáz inhibitor jelenlétében nem indukálták a T sejtek aktivációját, mely arra enged következtetni, hogy az SPP NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-oknak részben szerepe lehet a cDC-k T sejt aktiváló képességében.

V. Megbeszélés

Az antigén expozíciót követő gyulladásos folyamatok kialakulásában és fenntartásában fontos szerepe van az oxidatív stressznek, melynek elsődleges feladata a mikroorganizmusok, illetve célsejtek elpusztítása. A gyulladt perifériás szövetekbe vándorló DC-k a ROS-ok emelkedett szintjével találkoznak, mely hatással lehet az immunválaszban betöltött funkcióikra.

Több tanulmány is vizsgálta már az oxidatív stressz hatását cDC-ken, viszont a pDC-k oxidatív stresszre adott válaszát eddig még nem tanulmányozták, holott számos tulajdonságuk tekintetében jelentősen különböznek a cDC-ktől. Eredményeink azt mutatták, hogy a pDC-k jóval érzékenyebben reagálnak a kísérletesen kiváltott oxidatív stresszre, mint a cDC-k, ami megnyilvánult életképességük jelentős csökkenésében. A

cDC-k oxidatív stresszel szemben tanúsított nagyfokú ellenállóképessége valószínűleg a sejtek pDC-khez viszonyított nagyobb antioxidáns kapacitásának köszönhető.

Az irodalomban több adat is van arra nézve, hogy a CD14⁺ monocitákból differenciáltott DC-ken a kísérletesen kiváltott oxidatív stressz indukálja a MHC I és MHC II osztályba tartozó sejtfelszíni proteinek, illetve kostimulatórikus molekulák és érési markerek expresszióját. A pDC-k esetében ugyanakkor a H₂O₂ kezelés nem eredményezett szignifikáns növekedést egyik általunk vizsgált kostimulatórikus molekula expressziójában sem, illetve csökkentette az antigén prezentáló HLA-DQ molekula expresszióját. Továbbá a H₂O₂ kezelés nem növelte az általunk vizsgált IL-8, IL-6, TNF- α és IFN- α szekrécióját, viszont gátolta a TLR7 ligand által kiváltott fokozott kemokin, illetve citokin termelést. Ezzel szemben, korábbi megfigyelések szerint a H₂O₂ kezelés hatására a cDC-k TNF- α , illetve IL-8 szekréciója fokozódik. Feltételezésünk szerint, a H₂O₂ kezelt pDC-k alacsony kemokin, illetve citokin szekréciójának molekuláris hátterében az NF- κ B, illetve az IRF7 szignalizációs útvonalak blokádja állhat. Igazolták ugyanis, hogy a H₂O₂-vel kezelt aktivált, illetve memória T sejtek csökkent citokin termelését az NF- κ B gátolt funkciója okozza, valamint egér modellben kimutatták, hogy az öregedő pDC-k, melyeket az öregedési folyamatok következtében nagyobb mértékű oxidatív inzultus ért, csökkent IFN- α szekrécióval válaszolnak TLR9 receptor aktiválást követően, mely az IRF7 csökkent aktivációjának a következménye.

Az oxidatív stressznek a cDC-kre gyakorolt aktiváló hatását mutatja az is, hogy az oxidatív inzultusnak kitett cDC-k jelentős mértékben képesek indukálni a T sejtek proliferációját. Eredményeink szerint a H₂O₂-vel kezelt pDC-k nem indukálták sem Treg sejtek, sem Th17 sejtek kialakulását. Ugyanakkor az oxidatív stressznek kitett pDC-k Th1/Th2 polarizáló képességét vizsgálva megállapítottuk, hogy a ROS-ok hatására a pDC-k inkább az anti-inflammatórikus Th2 irány kialakulásának kedveztek, mind az autológ, mind az allogén T sejt aktiváció során. Kimutattuk továbbá, hogy a H₂O₂ kezelés negatív hatással volt a TLR7 agonistával aktivált pDC-k fenotípusos, illetve funkcionális válaszára, valamint csökkentette az aktivált pDC-k autológ, illetve allogén T sejt stimuláló képességét.

Ezen eredményeinkre alapozva feltételezhető, hogy az *in vivo* körülmények között oxidatív stressznek kitett pDC-k valószínűleg anti-inflammatórikus, azaz

gyulladásokat csökkentő tulajdonsággal bírnak, szemben a cDC-kkel, melyek főleg az inflammatórikus Th1 irányú válaszok kialakulásának kedveznek.

A korábban említett irodalmi adatok alapján bizonyos, hogy a cDC-k esetében a gyulladásos immunreakciók során megjelenő oxidatív stressz aktivációs szignált jelenthet. Munkacsoportunk egy korábbi kísérletsorozatban azt találta, hogy az oxidatív stressz szerepet játszhat a pollen allergének általi cDC aktiválásban és ezáltal az adaptív immunválasz kiváltásában. Ismert, hogy atópiás egyének esetében a pollen allergének nagymértékű légúti gyulladást válthatnak ki. Megfigyelték azonban, hogy a légúti allergének koncentrációja a levegőben nincs szoros kapcsolatban a pollenszemek számával ugyanis paradox módon, könnyű nyári záporokat követően, miközben jelentősen csökken a pollenszemek mennyisége a levegőben, ugrásszerűen megnő a légúti allergiás tünetek előfordulása a pollen-szenzitizált egyének körében. Ilyenkor ugyanis a talajszintre mosódott és ott az esővízben hidratálódott pollenszemek jelentős mennyiségű SPP-t bocsátanak ki magukból, melyek a légáramlatok közvetítésével a légutakba jutva képesek kiváltani az allergiás reakciókat. Ezen SPP-k, a munkacsoportunk korábbi, illetve jelenlegi megfigyelései alapján is, hordozzák az intakt pollenszemekre jellemző allergéneket, továbbá NAD(P)H oxidázokat, amely enzimek ROS-ok generálása révén hozzájárulnak az allergén expozíciót követő oxidatív stressz kialakulásához. Kísérleteinkben az SPP expozíció a cDC-kben intracelluláris ROS emelkedést eredményezett, ami összhangban van azon korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint az SPP kezelés hasonló hatást fejtett ki epitheliális sejteken. Az SPP-k hőinaktivált formája, illetve a NAD(P)H oxidáz enzim specifikus inhibitora (DPI) gátolta a fentebb említett hatást, míg az enzim szubsztrátjának jelenlétében nagyobb mértékű intracelluláris ROS emelkedést lehetett mérni a sejtekben, ami azt mutatja, hogy az oxidatív stressz indukálásában jelentős szerepe lehet az SPP-k NAD(P)H oxidázai által termelt ROS-oknak. Kimutattuk továbbá, hogy a humán cDC-k képesek a parlagfű pollenből származó SPP-k felvételére, és ebben a folyamatban nagy valószínűséggel szerepet játszik a sejtek felszínén expresszáldó surfactant protein D, melyről leírták, hogy a humán bronchiális hámsejtek ezen fehérjék közvetítésével képesek megkötni az SPP-ket.

Munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy az intakt parlagfű pollenszemekkel történő közvetlen kölcsönhatás eredményeként a DC-k felszínén megnövekszik az aktivációs, illetve érési markerek expressziója. Jelen eredményeink szerint az intakt pollenszemekből felszabaduló SPP-k is hasonló fenotípusos változásokat eredményeztek a cDC-ken. Ha a kezelést a NAD(P)H oxidáz szubsztrátjának hozzáadásával végeztük el, a fehérjék expressziója tovább fokozódott, DPI jelenlétében viszont a fehérjék kifejeződése az alapszint közelében maradt, ami bizonyítja, hogy az észlelt fenotípusos változásokban – legalább részben – az SPP-k NAD(P)H oxidázai által termelt ROS-ok is szerepet játszhatnak.

Az oxidatív stressz a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) által mediált jelátvivő útvonalon és az NF- κ B transzkripciós faktoron keresztül számos gyulladásos citokin és kemokin termelődését tudja kiváltani, illetve fokozni. SPP expozíciót követően fokozódott az általunk vizsgált összes mediátor szekréciója, hasonlóan korábbi kísérleteinkhez, melyben a cDC-eket intakt pollenszemekkel kezeltük. Igazoltuk, hogy az általunk vizsgált mediátorok szekréciójának fokozódása oxidatív stressz függő módon megy végbe, mivel az SPP-k ROS termelésének gátlása csökkentette, míg a NAD(P)H oxidáz enzim szubsztrátjának jelenléte fokozta az általunk megfigyelt jelenséget.

Mivel a cDC-eket professzionális APC-kként tartják számon, valamint a ROS esszenciális mediátora az antigén prezentációs folyamatoknak, kíváncsiak voltunk, hogy az SPP-kezelt cDC-k milyen mértékben képesek T sejt proliferációt kiváltani. Eredményeink azt mutatják, hogy az SPP kezelés nagymértékben fokozta a cDC-k T sejt aktiváló képességét, melyet a NAD(P)H oxidáz enzim gátlása felfüggesztett. Ha az SPP-kezelt cDC-eket atópiás, illetve nem atópiás egyének allogén CD3⁺ pan-T sejteivel kokultiváltuk, a cDC-k képesek voltak aktiválni IFN- γ és IL-17 szekretáló T sejteket is, függetlenül a donor atópiás státuszától. Ugyanakkor az IL-4 citokint termelő T sejtek aktivációját kizárólag parlagfűre allergiás egyének mintáiban tudtuk detektálni, mely arra enged következtetni, hogy az SPP-kezelt cDC-k aktiválják a parlagfű pollen allergén-specifikus Th2 effektor sejteket. Kísérleteinkben bizonyítottuk tehát, hogy az intakt parlagfű pollenből felszabaduló SPP-k képesek cDC aktiválásra, melyben részben szerepet játszanak az SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-ok. Mivel ezen SPP-k méretüknél fogva az alsóbb légutakba is képesek lejutni, esszenciális szerepük lehet a DC

aktiváción keresztül az adaptív immunválasz kiváltásában és ezáltal a pollen-indukált allergiás reakciók szenzitizációs fázisában.

Munkánkkal sikerült azon oxidatív stresszel asszociált immunológiai folyamatok újabb részleteit feltárni, amelyekben jelentős szerepet játszanak a DC-k. Eredményeink rávilágítanak arra is, hogy az oxidatív stressznek kitett szöveti környezetben a DC alpopulációk összehangolt, egymást kiegészítő, inflammatórikus, illetve gyulladásokat csökkentő sajátosságai szükségesek ahhoz, hogy a patogének eliminálása a saját szervezetet károsító hatások nélkül valósulhasson meg.

VI. Összefoglalás

A gyulladásos folyamatokban jelentős szerepet játszik az oxidatív stressz, így munkánk során átfogóbban kívántuk tanulmányozni a reaktív oxigéngyökök humán dendritikus sejtek (DC-k) működésére gyakorolt hatását.

Eredményeink szerint a plazmacitoid DC-k (pDC-k), a konvencionális DC-khez (cDC-k) viszonyítva érzékenyebben reagáltak a kísérletesen kiváltott oxidatív stresszre, mivel már alacsonyabb hidrogén peroxid koncentráció mellett is jelentősen csökkent az életképességük. Kimutattuk továbbá, hogy pDC-k esetében a hidrogén peroxid kezelés csökkentette az antigén prezentációban résztvevő fehérjék expresszióját, nem váltott ki gyulladásos kemokin, illetve citokin termelést, nem indukált I-es típusú interferon szekréciót, illetve felfüggesztette a Toll-like receptor 7 agonista pDC-kre gyakorolt aktiváló hatását. Az adaptív immunválasz polarizálódásának vizsgálatára irányuló kísérleteink alapján elmondható, hogy *in vivo* a gyulladásos sejtek által termelt reaktív gyököknek kitett pDC-knek a gyulladásokat csökkentő hatása lehet, az oxidatív stressz hatására főként inflammatórikus választ indukáló cDC-kkel szemben.

További kísérleteinkben a cDC-k fenotípusos, illetve funkcionális sajátosságait vizsgáltuk pollen allergének által kiváltott allergiás folyamatokban. Korábbi megfigyelések szerint a pollenszemekből felszabaduló allergének, illetve a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt reaktív oxigéngyökök súlyos légúti allergiás gyulladás kiváltására képesek atópiás egyéneknél. Ugyanakkor az intakt pollenszemek méretüknél fogva nem jutnak le az alsóbb légutakba, ahol közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a DC-kkel, így a pollen-indukált allergiás reakciók szenzitizációs fázisának mechanizmusa még

tisztázatlan. Munkánk során igazoltuk, hogy a pollenszemekből a hidratáció során felszabaduló szubpollen partikulák jelentős szerepet játszhatnak ezekben a folyamatokban. A cDC-k ugyanis képesek voltak a parlagfű szubpollen partikulákat fagocitálni, mely megemelkedett intracelluláris reaktív oxigéngyökök koncentrációval, megnövekedett antigén prezentációval, citokin és kemokin szekrécióval, valamint fokozott T sejt aktiváló képességgel társult. Megállapítottuk továbbá, hogy a szubpollen partikulák NAD(P)H oxidázai által termelt reaktív oxigéngyökök részt vehetnek a légúti DC-k aktiválásában, és ezáltal fontos szerepet játszhatnak az allergiás reakciók szenzitizálódási szakaszában.

Munkánk során sikerült részletesebben megismernünk a humán DC-k egyes altípusainak oxidatív stresszre adott válaszreakcióit, mellyel reményeink szerint hozzájárulunk olyan immunológiai kórképek patomechanizmusának jobb megértéséhez, melyekben az oxidatív stressz jelentős szereppel bír.

VII. Tárgyszavak

Dendritikus sejt, oxidatív stressz, gyulladás, szubpollen partikulák, szenzitizáció, allergia, sejt aktiváció, immunreguláció, adaptív immunválasz

VIII. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/95/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Pázmándi Kitti Linda

Neptun kód: I70KZ3

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

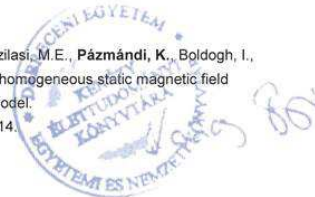
Mtmt azonosító: 10034553

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pázmándi, K.**, Magyarics, Z., Boldogh, I., Csillag, A., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Modulatory effects of low-dose hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52 (3), 635-645, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.022>
IF: 5.271
2. **Pázmándi, K.**, Kumar, B.V., Szabó, K., Boldogh, I., Szóór, Á., Vereb, G., Veres, Á., Lányi, Á., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Ragweed subpollen particles of respirable size activate human dendritic cells. *PLoS One.* 7 (12), e52085, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052085>
IF: 3.73

További Közlemények

3. Csillag, A., Kumar, B.V., Szabó, K., Szilási, M., Papp, Z., Szilási, M.E., **Pázmándi, K.**, Boldogh, I., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A., László, J.F.: Exposure to inhomogeneous static magnetic field beneficially affects allergic inflammation in a murine model. *J. R. Soc. Interface.* 11 (95), 20140097-20140097, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0097>
IF: 4.907 (2012)



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☐ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. ☐ Tel.: (52) 518-600
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ☐ Honlap: lib.unideb.hu



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



4. Szabó, A., Magyarics, Z., **Pázmándi, K.**, Gopcsa, L., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: TLR ligands up-regulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner.
Immunol. Cell Biol. "accepted by publisher", 2014.
IF:3.925 (2012)
5. Szabó, A., Gogolák, P., **Pázmándi, K.**, Kis-Tóth, K., Riedl, K., Wizel, B., Lingnau, K., Bácsi, A., Réthi, B., Rajnavölgyi, É.: The Two-Component Adjuvant IC31H Boosts Type I Interferon Production of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells via Ligation of Endosomal TLRs.
PLoS One. 8 (2), e55264-, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055264>
IF:3.73 (2012)
6. Csillag, A., Boldogh, I., **Pázmándi, K.**, Magyarics, Z., Gogolák, P., Sur, S., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Pollen-Induced Oxidative Stress Influences Both Innate and Adaptive Immune Responses via Altering Dendritic Cell Functions.
J. Immunol. 184 (5), 2377-2385, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803938>
IF:5.745
7. Magyarics, Z., Csillag, A., **Pázmándi, K.**, Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening.
Cytometry A. 73 (3), 254-258, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20529>
IF:3.259

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30.567

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9.001

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



Debrecen, 2014.05.06

Válogatott előadások:

Pázmándi K., Magyarics Z., Csillag A., Rajnavölgyi É., Bácsi A.: A reaktív oxigén gyökök lehetséges szerepe az immunológiai tolerancia kialakításában. *A Magyar Szabadgyök-kutató Társaság V. Kongresszusa, 2009. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország, I. helyezés*

K. Pazmandi: The oxidative stress influences the phenotypical and functional properties of human plasmacytoid dendritic cells. *3th Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, 7-10 January 2010, Mariazell, Austria*

K. Pazmandi, Z. Magyarics, A. Csillag, E. Rajnavölgyi, A. Bacs: Oxidative stress blocks the stimulatory effects of TLR7 and TLR9 ligands on human plasmacytoid dendritic cells. *5th ENII EFIS/EJI Immunology Summer School, 9-16 May 2010, Capo Caccia, Sardinia, Italy*

K. Pazmandi: Human plasmacytoid dendritic cells exposed to oxidative stress promote Th2 polarization. *4th Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, 11-14 January 2011, Galyatető, Hungary*

Pázmándi K., Magyarics Z., Boldogh I., Csillag A., Rajnavölgyi É., Bácsi A.: Hidrogén peroxid kezelés hatása a humán plazmacitoid dendritikus sejtek fenotípusos és funkcionális sajátosságaira. *Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, 2011. október 12-14., Kecskemét, Magyarország, I. helyezés*

Pázmándi K., Kumar B.V., Szabó K., Boldogh I., Szőőr Á., Vereb Gy., Rajnavölgyi É., Bácsi A.: Parlagfű szubpollen partikulák NAD(P)H oxidáz enzimjei által termelt reaktív oxigén gyökök hatásainak vizsgálata humán dendritikus sejteken. *Magyar Immunológiai Társaság 41. Vándorgyűlése, 2012. október 17-19., Debrecen, Magyarország*

K. Pazmandi: Effect of native and oxidatively modified exogenous mitochondrial DNA on the functions of human plasmacytoid dendritic cells. *7th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 7-10 January 2014, Galyatető, Hungary*

Válogatott poszter prezentációk:

K. Pazmandi, Z. Magyarics, A. Csillag, E. Rajnavölgyi, A. Bacs: Plasmacytoid dendritic cells exposed to oxidative stress may have tolerogenic function. *Student Congress of the Hungarian Immunological Society, 29-30 October 2009, Harkány, Hungary*

K. Pazmandi, Z. Magyarics, A. Csillag, E. Rajnavölgyi, A. Bacs: The oxidative stress influences the phenotypical and functional properties of plasmacytoid dendritic cells. *2nd International Workshop on "Plasmacytoid Dendritic Cells and Immune Responses", 17-18 December 2009, Paris, France*

K. Pazmandi, E. Rajnavölgyi, A. Bacs: Human plasmacytoid dendritic cells exposed to oxidative stress promote TH2 polarization. *6th ENII Immunology Summer School, 15-22 May 2011, Capo Caccia, Sardinia, Italy*

K. Pazmandi, Z. Magyarics, I. Boldogh, A. Csillag, E. Rajnavölgyi, A. Bacs: Modulatory effects of exogenous hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells. *3rd International Workshop on „Plasmacytoid Dendritic Cells and Immune Responses”, 8-9 December 2011, Paris, France*

K. Pazmandi, B.V. Kumar, K. Szabó, I. Boldogh, A. Szőör, Gy. Vereb, A. Veres, A. Lányi, E. Rajnavölgyi, A. Bacs: Reactive oxygen species generated by NAD(P)H oxidases in ragweed subpollen particles activate human dendritic cells. *European Congress of Immunology, 5-8 September 2012, Glasgow, Scotland*

K. Pazmandi, B.V. Kumar, I. Boldogh, A. Kemeny-Beke, M. Szilasi, E. Rajnavölgyi, A. Bacs: Antibodies against ROS-producing ragweed pollen proteins may prevent allergic sensitization. *Immunology 2013 AAI Annual Meeting, 3-7 May 2013, Honolulu, Hawaii*

K. Pazmandi, V. Sógor, I. Boldogh, E. Rajnavölgyi, A. Bacs: Effect of native and oxidatively modified exogenous mitochondrial DNA on the functions of human plasmacytoid dendritic cells. *Magyar Immunológiai Társaság 42. Vándorgyűlése, 2013. október 16-18., Pécs, Magyarország*

IX. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Bácsi Attilának, aki kiemelkedő szakmai tudásával, elmés és olykor zseniális meglátásaival munkámat az elmúlt évek során fáradságot nem kímélve mindvégig segítette, és aki mind szakmailag és mind emberileg ösztönzően hatott rám és nélkülözhetetlen támogatást nyújtott eredményeim eléréséhez.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Rajnavölgyi Évának, aki intézetvezetőként lehetővé tette számomra az Immunológiai Intézetben a doktori értekezésemhez szükséges kísérletes munkák elvégzését, és aki biztosította szakmai fejlődésemet az immunológia tudományterületén.

Külön köszönet illeti Dr. Magyarics Zoltánt, akitől szakdolgozói időszakom alatt rengeteg segítséget kaptam az új módszerek elsajátításában, illetve a kísérletes munkák megtervezésében és technikai kivitelezésében.

Köszönettel tartozom Veres Ágotának, Brahma V. Kumarnak Szabó Krisztinának, valamint munkacsoportunk minden tagjának a laboratóriumi munkák terén nyújtott lelkes segítségükért, akik áldozatos munkájukkal hozzájárultak kísérleteim gyors és hatékony megvalósításához.

Köszönetet mondok továbbá az Immunológiai Intézet összes dolgozójának, illetve kollaborációs partnereinknek, akik munkájukkal vagy szakmai tudásukkal mind hozzájárultak doktori értekezésem elkészüléséhez.

Köszönöm Családomnak és Barátaimnak a mérhetetlen szeretetet, támogatást és biztatást, ami erőt adott nekem és az évek során mindvégig ösztönözte munkámat és céljaim elérését.