

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A monocita eredetű dendritikus sejtek migrációjának vizsgálata
aktivációs jelek hatására**

Bacsikai Ildikó

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN 2015

A monocita eredetű dendritikus sejtek migrációjának vizsgálata aktivációs jelek hatására

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

Írta: **Bacsikai Ildikó**
Okleveles Biotechnológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Kónya József, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK Immunológiai Intézet, 2014. június 11. 12 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bajtay Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Goda Katalin, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Dr. Bajtay Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Gócza Elen, az MTA doktora
Dr. Goda Katalin, PhD
Dr. Kókai Endre, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

DE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet tanterme, 2015. október 29. 13 óra

1. Bevezetés

A veleszületett és szerzett immunitás működésének összehangolásában a dendritikus sejtek (DC) kiemelt szerepet töltenek be. A DC-ek az egészséges szervezetben olyan hálózatszerűt hoznak létre, amely lehetővé teszi a bejutó kórokozó azonnali felismerését és bekebelezését, amelyet a felvett antigének nyirokcsomóba történő szállítása követ. A nyirokcsomókban az aktivált DC-ek az általuk feldolgozott antigént a naív T- limfociták számára prezentálják, ami az antigén-specifikus immunválasz elindítását eredményezi. A DC-ek olyan hivatásos antigénprezentáló sejtek (APC), amelyek képesek a naív T-limfociták különböző funkcióra szakosodott végrehajtó (effektor) T-sejtekké történő differenciációját kiváltani. A Th1 sejtek citotoxikus aktivitással rendelkeznek, a Th2 irányba polarizált sejtek elsősorban a humorális immunválasz szabályozásában vesznek részt, míg a Th17 sejtek gyulladásos folyamatokat közvetítenek. Vizsgálataim elsődleges célja a DC-ek migrációját kiváltó és szabályozó molekuláris folyamatok felderítése és a háttérben álló szabályozó mechanizmusok vizsgálata volt. Ebből a célból a DC-ek előzetesen azonosított, fenotípusukban különböző, gyulladástkeltő tulajdonsággal rendelkező CD1a⁺ és a szabályozó funkciójú CD1a⁻ tolerogén alpopulációinak migrációját hasonlítottuk össze különböző aktivációs jelek hatására, kiemelt figyelemmel a DC-ek mátrixmetalloproteáz (MMP) és szöveti MMP inhibitor (TIMP) szekréciójára. Mivel a mesenchymális sztróma sejtek (MSC) ismert tulajdonsága a DC-ekre kifejtett gátló hatás, kísérleteinkben azimmunsuppresszív hatású mesenchymális sztróma szerű sejtek (MSCI) hatását vizsgáltuk a DC-ek fenotípusos jellegzetességeire, funkcióira és migrációjára. A DC-ek működésbeli sokféleségének és rugalmasságának vizsgálatával kapott kutatási eredmények jelentősége, hogy új lehetőségeket tárhat fel a gyulladásos betegségekkel szembeni immunterápiás folyamatok alkalmazásában.

1.1 A dendritikus sejtek (DC)

Az emberi szervezetben kis számban jelenlévő dendritikus sejtek (DC) alapvető szerepet játszanak az immunrendszer mozgósításában, a természetes és szerzett védelmi rendszerek összehangolt működésének irányításában. A DC-ek csontvelői progenitor sejtekből képződő CD11⁺ mieloid előalakból fejlődnek, gyulladásos folyamatok során azonban monocitákból is differenciálódhatnak. Nyugvó állapotban az egészséges szervezet szinte minden szövetében előfordulnak, elsősorban azoknak a felszíneknek a közelében dúsulnak fel (bőr, nyálkahártya), ahol szervezetünk közvetlen kapcsolatban áll a külső környezettel és ezáltal

potenciális behatolási kapukat biztosítanak a kórokozók számára. A DC-ek elsődleges feladata a szervezetbe jutó különböző eredetű antigének felismerése és feldolgozása. Hatékony fagocita sejtekként működnek, a különböző típusú antigéneket sejtfelszíni és intracelluláris receptoraik segítségével ismerik fel, amelyeket összefoglaló néven mintázat felismerő receptoroknak nevezünk (PRR). A PRR-oknak számos altípusát különítették el, köztük a Toll-szerű receptorokat (TLR), a citoszólikus Nod-szerű receptorokat (NLR) és a RIG-szerű receptorcsaládot (RLR). A DC-ek citoplazmájában kifejeződő RIG-I, MDA5 és LGP-2 receptorok az RLR családba tartoznak, és fontos szerepet játszanak a szervezetbe bejutó ssRNS, dsRNS vagy DNS vírusok felismerésében és eliminálásában. Az antigén felismerését követően a DC-ek aktiválódnak, aminek következtében olyan differenciálódási állapotba kerülnek, hogy felszínükön új, az aktivált DC-ek funkcióihoz szükséges receptorokat, kostimulációs és adhéziós molekulákat fejeznek ki. Ezek a fehérjék elősegítik a sejtek nyirokcsomókba történő vándorlását, ahol a felvett, majd feldolgozott antigént a DC-ek az MHC molekulák segítségével a T-limfocitáknak prezentálják, kiváltva ezzel a T-limfociták proliferációját.

Előzetes kutatási eredményeink igazolták, hogy a DC-ek két, eltérő funkcionális sajátosságokkal rendelkező altípusra oszthatóak, amelyek a CD1a sejtfelszíni molekula megjelenése alapján különíthetők el. A CD1a fehérjék a fő hisztokompatibilitási gén komplex (MHC) molekuláihoz szerkezetileg hasonlóak, de funkcionálisan eltérőek, legfontosabb szerepük a bakteriális eredetű glikolipid antigének bemutatásában nyilvánul meg. Korábbi kutatási eredményeink azt mutatták, hogy a CD1a⁺ sejtek a gyulladásos celluláris immunválasz (*Th1*), míg a CD1a⁻sejtek a tolerogén humorális immunválasz (*Th2*) kialakulását segítik elő. Mivel a CD1a fehérje jelenléte nem csak a monocita-eredetű, hanem a szöveti és a nyirokcsomói DC altípusokra is jellemző, feltételezhető, hogy a két populáció *in vitro* igazolt eltérő sajátosságai *in vivo* körülmények között is eltérően befolyásolják az immunrendszer működését.

A DC-ek aktivációját a sejtfelszíni kemokin receptorok megjelenése, az MHC I és II fehérjék, kostimulációs és adhéziós molekulák, valamint a CD83 aktivációs marker kifejeződésének fokozódása jellemzi. Ezzel párhuzamosan a sejtek fagocitáló képessége csökken. Az aktivált DC-ek felszínén kifejeződő CCR7 kemokin receptor teszi lehetővé a DC-ek nyirokcsomó felé irányított, aktin vezérelt megnyúlását, valamint a nyirokszöveti sejtek által szecernált CCL21/CCL19 kemokinek receptorhoz kötődését. Az aktivált sejtek az ECM-on keresztül haladva az általuk szecernált MMP enzimek lebontásával jutnak el a közeli nyirok

kapillárisokhoz. A DC-ek migrációjának szabályozása sokrétű folyamat, amelynek során a DC-ek szövetek közti vándorlási képessége határozza meg a migráció határfokát, amit öt lépcsős modell rendszerrel jellemeztek. A folyamat lépései minden migrációra képes sejtípusban az aktin-vezérelt sejt megnyúlásával kezdődnek (I), amit a célszövetben kifejeződő integrinekkal kialakított kölcsönhatások követnek (II). A szövetek közti extracelluláris mátrix (ECM) elbontása érdekében a sejtek különböző típusú proteázokat szecernálnak (III), majd az aktin-miozin-mediált összehúzódnást követően (IV.) a sejt az elbontott mátrixhoz húzódik, (V.), és aktin-vezérelt megnyúlással halad tovább. A folyamatban fontos szerepe van az enzimek által kiváltott pericelluláris proteolízisnek is, amely haladási útvonalat biztosít a migráló sejteknek.

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmánya során igazolta, hogy a DC-ek aktivációja és migrációja során a sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának fokozódása figyelhető meg, ami közvetlenül szabályozza a sejt életciklusát. A Ca^{2+} ionok az extracelluláris térből az intracelluláris térbe történő diffúzióját a sejtek membránjában található feszültség függő nátrium csatornák (VGSC) befolyásolják. A VGSC-k működésének gátlása gyulladást csökkentő hatású, autoimmun encephalomyelitis és sklerózis multiplex kezelésére is alkalmazzák. A nyugvó DC-ek membránjában magas a Nav1.7 csatorna kifejeződése, a sejtaktiváció során azonban az expresszió folyamatosan csökken, növelve az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, ami lehetővé teszi a sejt aktiváltsági állapotának elérését. A DC-ek az antigén felvételét követően aktivációs szignálok hatására, megnövekedett Ca^{2+} koncentráció jelenlétében válnak képessé a nyirokcsomóba történő vándorlásra. A DC-ek a nyirokcsomóban a peptiddel feltöltött MHC II fehérjék közvetítésével mutatják be a feldolgozott antigént a naív T-limfociták számára. A CD86 és CD80 kostimulációs molekulák fokozott kifejeződése előfeltétele az adaptív immunválasz elindításának. Az antigén felismerést követően a T-limfociták citokint termelő effektor sejtekké differenciálódnak, amelyek szabályozó vagy gyulladásos irányba polarizálják a T-sejt választ. A végrehajtó funkcióval rendelkező T-sejtek és a DC-ek a környezeti hatásoktól függően segítő (Th) és regulatorikus (Treg) sejtekké differenciálódhatnak. Az aktivált DC-ek szintén számos citokin termeléséért felelősek, amelyek segítségével az immunválasz jellegét, azaz a T-sejt polarizáció irányultságát is képesek szabályozni. A DC-ek által szecernált IL-12 citokin fontos szerepet játszik a T-limfociták által közvetített celluláris immunválasz kiváltásában és a gyulladásos Th1 sejtek polarizációjában, ami az IFN- γ szekréció révén fejti ki hatását. A humorális immunválaszban szerepet játszó Th2 sejtek kialakulásához a DC-ek által szecernált IL-2 és IL-33 jelenléte szükséges, míg az IL-6 a Th17 irányú T-sejt

polarizációt segíti elő. Ennek eredményeként a DC-ek által kialakított citokin környezet fontos szerepet tölt be a T-limfociták által közvetített antigén specifikus, adaptív immunválasz kialakulásában.

1.2 A mátrix metalloproteinázok

Az emberi szervezetet felépítő fehérjék közel egyharmadát kollagének alkotják, amelyek jelentős szerepet játszanak a sejtek közötti állomány, az extracelluláris mátrix (ECM), valamint a sejtpopulációk elhatárolását biztosító alaphártya kialakításában. Az ECM folyamatos megújítását és átalakítását lebontó enzimek, a mátrix metalloproteinázok (MMP) végzik. Ezek a cink-függő endopeptidázok a normál szövetek átrendeződésekor részt vesznek az ECM lebontásában, az embrionális fejlődésben, a sebgyógyulásban és az angiogenezisben. Az MMP-ok szerepét a citokinek, kemokinek és számos fehérje hasításában bizonyították igazolva szerepüket a gyulladásos folyamatok és az immunrendszer folyamatainak szabályozásában. Az MMP-eket fiziológiás körülmények között számos sejttypus termeli és szecernálja, a folyamat szigorú szabályozás alatt áll. Az MMP-ok a fiziológiástól eltérő helyen, időben és mértékben történő termelődése, valamint a működésüket szabályozó folyamatok esetleges hibái súlyos szöveti károsodásokat okozhatnak. Az MMP-ek patológiás folyamatokban, mint a tumor és metasztázis képződés, ízületi gyulladások, gyomorfekély, csontfelszívódás, tüdőgyulladás kórfolyamataiban is részt vesznek.

Az MMP-ok szabályozása rendkívül fontos, mert ezeknek az enzimeknek a szubsztrát specificitása gyakran átfedő, így az eltérő biológiai funkcióikat elsősorban a megfelelő szabályozás biztosíthatja. Az aktív MMP-ok természetes és mesterséges gátlószerekkel, valamint internalizáció révén is gátolhatók, enzimatisuk aktivitásuk gátlását a szöveti környezetben a TIMP család tagjai biztosítják. A TIMP családnak jelenleg négy tagja ismert, amelyek 1:1 arányban gátolják az MMP-ok katalitikus doménhez való kötődését. A folyamat során a TIMP-ok 5 N-terminális aminosava az MMP-ok aktív centrumához kötődve akadályozza meg az enzim további szubsztrát kötését. Az inhibitorok részleges specificitásáért a TIMP-ok C-terminális doménje felelős. Mesterséges inhibitorai a tanomastat, prinomastat, tetraciklin, katekin, aszpirin és a GM6001. A GM6001 széles spektrumú szintetikus gátlószert, amely a fémiont igénylő enzimek hatékony inhibitora, a konzervatív fémionnal komplexet képezve fejti ki gátló hatását. Az MMP-ok katalitikus doménjében található Zn^{2+} ionnal komplexet alkotva megakadályozza, hogy a szubsztrát a katalitikus domén

közelébe kerüljön és így az enzim már nem képes proteolitikus funkcióját ellátni. A GM6001 klinikai felhasználása széleskörű, alkalmazzák bakteriális fertőzések kezelésére is, mivel a baktériumok által szecernált peptid a deformilázt is működésképtelenné teszi és megakadályozza a baktériumok invázióját. Hatékonyan alkalmazható intima hiperplázia és emlődaganat szövödményeként kialakuló csont metasztázis csökkentésére is. Munkánk során a GM6001 DC-ek fenotípusára és működésére kifejtett hatásának részletes vizsgálatára is kitértünk.

1.3 A dendritikus sejtek és a mátrix metalloproteinázok kapcsolata

A nyugvó és aktivált DC-ek egyaránt képesek a MMP-ok és természetes inhibitoraik, a TIMP-ok szekréciójára. Az MMP-ok és természetes szöveti inhibitoraik, a TIMP-ek egyensúlya meghatározó az immunrendszer működésének hatékonysága szempontjából. Az MMP – TIMP rendszer egyensúlyának felborulása számos kórképben kimutatható, mint gastritis és az áttét képződéssel járó malignus tumorok, ezért számos, ezt az egyensúlyt befolyásolni képes készítmény került forgalomba. Kísérleteinkben a monocitából differenciált DC-ek és alpopulációik MMP és TIMP kifejeződésének szisztematikus vizsgálatát végeztük el gén és fehérje szintű vizsgálatokkal, valamint a GM6001 szintetikus inhibitor hatását is tanulmányoztuk az MMP-ok és TIMP-ek kifejeződésére, a résztvevő enzimek funkcióira, és az MMP9 szekréciójára.

1.4 Az embrionális eredetű mesenchymális stroma sejtek (MSC) módosítják a monocitából differenciált DC-ek funkcióit

A MSC-ek az emberi szervezet szöveteiben elszórtan fordulnak elő, legnagyobb mennyiségben a csontvelőben találhatók, ahol legfontosabb feladatuk a hematopoetikus őssejtek (HSC) nem differenciált állapotának fenntartása. Az utóbbi években ezek a szöveti regenerációt, érképződést és immunszuppressziót egyaránt kiváltani képes sejtek a biotechnológiai és sejterápiás eljárások egyik legfontosabb célpontjaivá váltak. A klinikai gyakorlatban is felhasználható, jól jellemzett és stabil sejtvonalak alkalmazása azonban még várat magára, mivel a szervezetből izolálható MSC-ek heterogén sejtpopulációt képeznek. Az MSC-ek ismert tulajdonsága, hogy képesek a természetes és szerzett immunitás végrehajtó funkcióit egyaránt gátolni. Irodalmi adat, hogy a csontvelői eredetű mesenchymális sztróma sejtek (BM-MSC-ek) jelenlétében a CD4⁺ naiv T-limfociták anti-inflammatorikus *Th2* irányú differenciációja

következik be, ami arra enged következtetni, hogy az MSC-ek hatékonyan használhatóak olyan kórképek kezelésére, amelyekben a szövethárosodást az immunrendszer sejtjeinek túlműködése okozza, mint pl. csontvelő-átültetés, allergia, autoimmun megbetegedések. Az MSC-ek a DC-ek differenciációját, aktivációját, antigént bemutató képességét és migrációját is gátolják, amelynek következtében a DC-ek T-sejt polarizációt kiváltó képessége is megváltozik.

Előzetes eredményeink szerint a HUES9d embrionális őssejtekből megfelelő körülmények között *in vitro* MSC-szerű (MSCI) sejtek differenciálthatók, amelyek a BM-MS-SC-hez hasonló fenotípus sajátosságokkal, morfológiával és differenciációs képességgel rendelkeznek. Ezen tulajdonságai 5-15 passzálsig stabilan kimutathatók.

Hipotézisünk szerint a DC-ek az MSCI sejtek jelenlétében a BM-MS-SC-k által kifejtett hatáshoz hasonlóan, a sejtaktiváció ellenére is nyugvó állapotban maradnak. Jelen munkánk során az MSCI sejtek DC-ek fenotípus sajátosságaira és funkcióira kifejtett hatását vizsgáltuk kiemelt figyelmet fordítva DC-ek migrációs képességére, aminek során először a DC-ek felszínén kifejeződő CCR7 receptor kifejeződésének feltételeit határoztuk meg. A DC-ek migrációját számos tényező befolyásolja és korábbi munkánk során igazoltuk, hogy a feszültség függő Nav1.7 csatorna expressziójának csökkenése elengedhetetlen a DC-ek hatékony migrációjához, és a csatornák eltűnésével párhuzamosan fokozódik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció. Az aktivált CCR7^{high}Nav1.7^{low} DC-ek a szövetek közötti hatékony haladás érdekében MMP-eket szecernálnak, amelyeket egészséges szervezetben a TIMP-ek szabályoznak.

A különböző alpopulációkba sorolható DC-ek különböző mértékű MMP és TIMP szekrécióra képesek. Munkánk során azt is igazoltuk, hogy az MSCI sejtekkel közös tenyészetben nevelt DC-ek MMP-9,-12 és TIMP-1,-2 expressziója és szekréciója is változik. Amennyiben az aktivált és antigént hordozó DC-ek vándorlása elindul, és a sejtek elérik a nyirokcsomót, ahol a DC-ek találkozhatnak a T-limfocitákkal, az MHCI és -II molekulák a naív T-sejtek segítségével bemutatják a feldolgozott fehérje antigéneket. Korábbi kutatási eredmények igazolták, hogy a MSC-ek gátolják a DC-ek sejt felszíni MHC molekuláinak kifejeződését, így a T-sejtek IFN γ szekréciója is csökken a kontroll mintákéhoz képest. Munkánk során az MSCI sejtek jelenlétében nevelt DC-ek által kiváltott T-sejtek aktivációjának és polarizációjának változásait mutattuk ki ELISPOT módszer segítségével. Korábbi kísérletekben a DC-ek RLR receptorainak expresszióját, valamint az MSC illetve MSCI sejtek által kifejtett gátló hatást még nem tanulmányozták, így e receptorok génszintű kifejeződését is ellenőriztük.

2. Célkitűzések

Ismert irodalmi adat, hogy a monocitából differenciáltott DC-ek CD1a negatív (CD1a⁻) és CD1a pozitív (CD1a⁺) alpopulációi eltérő funkcionális sajátosságainak miatt különböző módon vesznek részt az immunválasz kiváltásában, így a két sejtpopuláció migrációs sajátosságai is eltérőek lehetnek. Kísérleteink során ezért részletesen vizsgáltuk a DC-ek vándorlásának jellegzetességeit. Munkánkat a következő szakaszokra osztottuk:

- Az MMP-9 és MMP12, valamint a TIMP-1 és TIMP-2 kifejeződésének és az MMP-9 szekréciójának vizsgálata gyulladásos citokinekkel általi aktivációt követően
- A nyugvó és a gyulladásos citokinekkel által aktivált DC-ek CD1⁺ és CD1a⁻ alpopulációiban mérhető MMP-9 és MMP12, valamint TIMP-1 és TIMP-2 expressziójának és az MMP-9 szekréciójának jellegzetességei
- A nyugvó és a gyulladásos citokinekkel által aktivált DC CD1⁺ és CD1a⁻ DC-ek által szecernált MMP-9 enzim aktivitásának mérése
- A gyulladásos citokinekkel és az LPS által aktivált DC-ek MMP-9 és MMP-12, valamint a TIMP-1 és TIMP-2 expressziójának és az MMP-9 szekréciójának összehasonlító analízise
- A GM6001 szintetikus inhibitor hatásának vizsgálata a DC-ek fenotípusára
- A GM6001 inhibitor hatásának vizsgálata a nyugvó és a gyulladásos citokinekkel által aktivált DC-ek által kifejezett MMP-9 és MMP-12, valamint a TIMP-1, TIMP-2 és a CCR7 kemokin kifejeződésére és az MMP-9 szekréciójára
- A GM6001 hatásának vizsgálata a nyugvó és gyulladásos citokinekkel által aktivált DC-ek CD1⁺ és CD1a⁻ alpopulációinak kemokint indukált migrációjára

A tervezett vizsgálatok lehetőséget adnak a két DC altípus migrációs sajátágaiban megmutatkozó különbségek azonosítására és a GM6001 gátló molekula alkalmazási lehetőségeinek és esetleges korlátainak meghatározására.

Korábbi kutatási eredmények igazolták, hogy az MSC-ek befolyásolják az immunválasz kialakításában résztvevő sejtek működését, beleértve a DC-ek funkcióit is. Egy korábbi kollaborációs munka során kimutattuk, hogy a HUES9d embrionális őssejtekből MSC-szerű (MSCI) sejtek differenciálthatók, amelyek hatékonyan gátolják a DC-ek migrációját. Munkahipotézisünk szerint az MSCI sejtek a DC-ek migrációját és egyéb funkcióit is befolyásolják, így kísérleteinket e folyamat vizsgálatára is kiterjesztettük. Tanulmányoztuk:

- A nyugvó és gyulladásos citokinkoktól, a poly(I:C) és az 5'ppp RNA által aktivált DC-ek fenotípusos tulajdonságait MSC1 sejtekkel közös tenyésztést követően
- A kevert kultúrában nevelt, poly(I:C) és 5'ppp RNS által általaktivált DC-ek gyulladásos citokin termelésének mértékét ELISA módszerrel a sejtek felülűszó mintáiban
- A kezelt és nem kezelt DC-ek által aktivált autológ és allogén T-sejtek IFN- γ termelésének mérése enzim kötött immunoszorbens módszerrel
- Az MSC1 sejtek jelenlétében differenciáltatott DC-ek spontán és kemokin-indukált migrációjának vizsgálata transwell rendszerben, poly(I:C) és 5'ppp szintetikus RNS aktiválást követően
- A DC-ek migrációban szerepet játszó gének (CCR7, Nav1.7, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2) kifejeződésének vizsgálata RT-PCR módszerrel az MSC1 sejtek által gátolt DC-ekben.
- Szecernált MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 mennyiségének mérése a kevert sejt kultúra felülűszó mintáiból
- A RIG-I, MDA-5, LGP-2 receptorokat kódoló gének expressziójának vizsgálata az MSC1 sejtek által gátolt DC-ekben

3. Anyagok és módszerek

3.1. Etikai nyilatkozat

A humán eredetű vérkészítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ) debreceni Regionális Vérellátó Központjából igényeltük. A vérminták begyűjtése és tárolása, az Országos Világszövetség által kiadott Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveit követve, a donorok előzetes írásos beleegyezésével történt. A humán vérmintákkal történő munkát az OVSZ igazgatója és a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte.

3.2. Monocita szeparálás humán vérből

A monocita szeparáláshoz a Debreceni Regionális Vérellátó Központból kapott egészséges donorokból származó úgynevezett „buffy coat”-okat használtuk fel. A monocitákat az alábbi módszer szerint – steril körülmények között - szeparáltuk:

A vért fiziológiás sóoldattal kétszeresére hígítjuk majd óvatosan Ficoll oldatra (GE Healthcare) rétegezzük, majd sűrűség alapú gradiens centrifugálást követően a perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) elkülönülnek a vér további alkotóitól. A továbbiakban a PBMC-ből a CD14⁺ monocitákat mágneses sejtszeparálás segítségével választjuk el. A mágneshez konjugált CD14⁺ ellenanyagokat a jégen tárolt mintáinkhoz adjuk, majd az inkubációs idő elteltével, speciálisan e célra kifejlesztett mágneses oszlopokon juttatjuk keresztül a megjelölt mintákat (Miltényi Biotech). A mágneseknek köszönhetően a monociták elválasztásra kerülnek a PBMC-től. A minták tisztaságát áramlási citometriás módszerrel ellenőriztük. A monocitákat 2×10^6 sejt/ ml koncentrációban AIMV tápfolyadékban (Gibco, Paisley, Scotland) tartottuk fenn, vagy kokultúra készítése esetében azonnal a kevert tenyészetbe helyeztük. A monocitákat a 0. és a 2. napon 100 ng/ml IL-4-el és 75 ng/ml GM-CSF-el (Peprotech EC, London, UK) hozzáadásával differenciálttunk DC-é, az önálló és a kevert kultúrák esetében egyaránt.

3.3. Mesenchymális stróma szerű sejtek izolálása és tenyésztése

A MSC1 sejteket 0.05-0.02% Tripszin-EDTA (Hyclone, South Logan, Utah) segítségével gyűjtöttük össze a tenyésztőflaskából, majd ezt követően Dulbecco's PBS (Hyclone, South Logan, Utah)-ben mostuk el centrifugálás segítségével. Sejtszámolást követően, 4×10^5 sejtet, 2,5 ml/ well RPMI tápfolyadékba (Hyclone, South Logan, Utah) 10% FCS (Gibco, Paisley, Scotland) és 1% antibiotikum/ antimikotikum (Hyclone, South Logan,

Utah) hozzáadása mellett helyeztünk 6 lyukú platekbe (TPP, Trasadingen, Svájc). Miután az MSCl sejtek összefüggő sejréteget alkottak a műanyag felületen, a 2×10^6 frissen izolált monocitát helyeztük a tápfolyadékba. A kevert kultúrát 0. és a 2. napon 100 ng/ml IL-4-el és 75 ng/ml GM-CSF-el (PeproTech EC, London, UK) kezeltük.

A kevert kultúrából a 6. napon a DC-eket pozitív CD209/DC-SIGN alapú mágneses sejtseparálás segítségével (Miltenyi Biotech) elválasztottuk a MSCl sejtektől. A DC209/DC-SIGN a DC-ek $90\% \pm 5\%$ átlagban fordul elő, így a továbbiakban e sejteket tovább vizsgálhattuk az MSCl sejtektől függetlenül.

3.4. Keveret kultúra készítése

A MSCl sejteket 0.05-0.02% Tripszin-EDTA (Hyclone, South Logan, Utah) segítségével gyűjtöttük össze a tenyésztőflaskából, majd ezt követően Dulbecco's PBS (Hyclone, South Logan, Utah)-ben mostuk el centrifugálás segítségével. Sejtszámolást követően, 4×10^5 sejtet, 2,5 ml/ well RPMI tápfolyadékba (Hyclone, South Logan, Utah) 10% FCS (Gibco, Paisley, Scotland) és 1% antibiotikum/ antimikotikum (Hyclone, South Logan, Utah) hozzáadása mellett helyeztünk 6 lyukú platekbe (TPP, Trasadingen, Svájc). Miután az MSCl sejtek összefüggő sejréteget alkottak a műanyag felületen, a 2×10^6 frissen izolált monocitát helyeztük a tápfolyadékba. A kevert kultúrát 0. és a 2. napon 100 ng/ml IL-4-el és 75 ng/ml GM-CSF-el (PeproTech EC, London, UK) kezeltük. A kevert kultúrából a 6. napon a DC-eket pozitív CD209/DC-SIGN alapú mágneses sejtseparálás segítségével (Miltenyi Biotech) elválasztottuk a MSCl sejtektől. A DC209/DC-SIGN a DC-ek $90\% \pm 5\%$ átlagban fordul elő, így a továbbiakban e sejteket tovább vizsgálhattuk az MSCl sejtektől függetlenül. A kevert kultúrában nevelt sejtek életképességét minden egyes donornál 7AAD festéssel, flow citometriás mérés segítségével ellenőriztük, mert el szeretnénk vizsgálni a tenyészetben lévő apoptotikus sejtek által tapasztalható szuppresszív hatást. Csak azokat a donorokat használtuk fel munkánk során amelyek legalább $92 \pm 5\%$ -a életképes volt.

3.5. A sejtek aktiválása, GM6001 kezelés

A DC-ek in vitro differenciáltságának 5. napján, a sejteket (a különálló sejt kultúrákban és kevert kultúrákban egyaránt) különböző aktivációs stimulusokkal kezeltük. Munkánk során a sejteket 500 ng/ml lipopoliszacchariddal (LPS, Sigma) vagy gyulladásos citokin koktéllal 10 ng/ml TNF- α , 5 ng/ml IL-1 β , 75 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-6 and 1 μ g/ml PGE₂, (PeproTech EC,

London, UK) vagy 25 µg/ml poly (I:C)-vel vagy 1 µg/ml 5'ppp-dsRNA szintetikus liganddal (Invivogen, San Diego, CA, USA) kezeltük.

Az MMP inhibíciós kísérletekben a GM6001 szintetikus MMP inhibitor (Calbiochem) 25 µM koncentrációban alkalmaztuk. A kontrollokhoz a GM6001 oldószerét, a DMSO-t adtuk. Az 5 napos DC-ket 24 órán keresztül kezeltük, az DC sejtkultúrákhoz az inhibitor az aktivációs kezelés előtt egy órával adtuk hozzá.

3.6. A sejtfelszíni molekulák kifejeződésének vizsgálata áramlási citofluorimetriával

Sejtszámolást követően a kezelt DC-ből minimum $2 \cdot 10^5$ sejtet centrifugálunk 1.1 ml-es FACS csőben (4000 RPM) 4293 g gyorsulással 5 percig, majd FACS pufferben (0,5% BSA, 0,05% nátrium-azid PBS-ben) felvesszük, és újra centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, a sejteket 100 µl FACS pufferben fölvevesszük és hozzáadjuk egér anti-humán CD1a-FITC (Beckton Dickinson – BD - Pharmingen) illetve a CD83-PE, CD80-FITC és CD86-PE ellenanyagot (1 µg/ml) (BD Pharmingen) így direkt jelöléssel látjuk el a sejteket. A cső tartalmát vortex segítségével összekeverjük. A sejteket az antitesttel 20 percig 4 °C-on inkubáljuk. Ezután a nem kötődött antitesteket FACS pufferben történő mosással és centrifugálással eltávolítjuk (4000 RPM/ 4293 g, 5 perc). A sejteket 300 µl 4% paraformaldehid oldattal fixáljuk. A sejtfelszíni expressziójával arányos fluoreszcens jelet áramlási citofluoriméterrel detektáljuk (BD FACS Calibur, FITC: green emission detector, szűrő : 530/30, PE: Red orange emission detector, szűrő: 585/42), a mért értékeket FlowJoe szoftver (Tree Star, Ashland, OR, USA) segítségével elemezzük tovább.

3.7. A dendritikus sejt alpopulációk szeparálása a CD1a sejtfelszíni molekula jelenléte alapján

A CD1a- és CD1a+ sejteket Diva (BD Digital Vantage) készülék segítségével, az áramlási citométeres vizsgálatoknál ismertetett jelölési eljárást követően szeparáltuk. Egyes kísérletekben a steril körülmények között szeparált alpopulációkat tovább tenyésztettük és aktiváltuk a fentebb leírt módon.

3.8. RNS izolálás, cDNS szintézis, kvantitatív PCR

A sejtekből Trizol reagent segítségével izoláltunk RNS-t (MRC, Cincinnati, OH USA).

Az izolált teljes RNS mennyiségből 2 µg-t High Capacity cDNA Archive Kit segítségével (Applied Biosystems, Foster City, CA) oligo-(dT) primer hozzáadásával (Promega, Madison, WI, USA) 37°C-on, 120 perc alatt reverz transzkripció során komplementer DNS-é (cDNS) írtuk át. A kvantitatív real-time PCR során génspecifikus TaqMan assay-ket (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és DreamTaq DNA polimerázt (Fermentas St. Leon-Rot, Germany) használtunk. A gén expressziókat ABI StepOnePlus real-time PCR készülékkel (Applied Biosystems) detektáltuk. A kapott értékeket a StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems) szoftverrel értékeltük ki és a h36B4 háztartási gén génexpressziós értékeihez normalizáltuk.

3.9. Enzim-kötött immunszorbens esszé

Az enzim-kötött immunszorbens esszé (ELISA) segítségével a vizsgálandó molekulák fehérjeszinten tanulmányozhatóak. A sejtek által a tápfolyadékba kibocsátott fehérje mennyiségét egy standard sorhoz hasonlítva annak pontos koncentrációja meghatározható.

Kísérleteink során a gyártói protokollnak megfelelően a következő citokinek és kemokinek, enzimek és inhibitoraik koncentrációját mértük a sejtek felülúszójából: IL-1 β , TNF- α , IL-6, CXCL8, CXCL10, IL-12, IL-10, IFN γ , MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 (R&D Systems, BD Biosciences, USA). A minták fehérje tartalmával arányos színintenzitásokat spektrofotométerrel, 450 nm hullámhosszon detektáltuk microplate reader (Biotek, Winooski, VT, USA) segítségével. A kapott abszorbancia értékek és a standard sor koncentrációinak ismeretében Excell program segítségével kiszámítottuk az ismeretlen minták fehérje tartalmát, figyelembe véve a minta hígításokat.

3.10. ELISPOT esszé

Az önállóan illetve MSC1 sejtek jelenlétében nevelt, majd izolált DC-eket szérummentes RPMI tápfolyadékba helyeztük sejtenyészítő platekbe (TPP, Trasadingen, Svájc). A megszámlált DC-ekhez allogén T- limfocitákat helyeztünk, majd 3 napon keresztül 37°-on inkubáltuk a sejteket. Ezt követően a sejteket speciális ELISPOT platekre vittük át amelyek képesek a T- limfociták által szekretált IFN- γ megkötésére, így avidin-HRP (NatuTec, GmbH, Germany) jelölés és ImmunoScan plate Reader (CTL, Shaker Heights OH, USA) segítségével detektáljuk az IFN- γ termelő sejtek mennyiségét.

3.11. Sejt migrációs assay

Az önállóan nevelt illetve MSC1 sejtekkel közös kultúrából izolált DC-k migrációját 6.5 mm átmérőű Transwell rendszer segítségével vizsgáltuk (Corning Inc., Glendale, Arizona, USA). A Transwell felső csatornába $2,5 \times 10^5$ DC-et helyeztük RPMI médiumban amely 0,05% BSA (Hyclone, South Logan, Utah) tartalmazott, míg az alsó csatornába a tápfolyadékot kivül amennyiben indukált migrációt kívántunk tesztelni, abban az esetben 200ng/ml CCL19 kemokint oldottunk. 24 h 37°-on inkubációt követően az alsó csatornába migrált sejteket összegyűjtöttük, és polisztirol gyöngyöket adunk az egyes mintákhoz (50 μ l) és áramlási citofluoriméterrel meghatározzuk a migrált sejtek számát (Fluka St. Gallen, Switzerland).

3.12. Zselatináz aktivitás mérés

Az MMP-9 enzim aktivitását InnoZyme™ Gelatinase Activity Assay Kit (Merck) segítségével határoztuk meg, követve a gyártó utasításait. A sejtek felülszóját 1:4 arányban hígítottuk a kitben található aktiváló pufferrel, majd ezt követően a zselatináz szubsztrátot adtuk az aktivált MMP-9-et tartalmazó mintákhoz és így 37 °C-on 3h keresztül inkubáltuk a teszt platet. Az inkubációt követően a fluoreszcencia változás mértékét microplate reader (Biotek, Winooski, VT, USA) segítségével detektáltuk.

3.13. Statisztikai analízis

A bemutatott eredmények mindegyike 3-5 különböző donor vizsgálatából kapott adatokon alapul.

Az MMP-9 és -12, illetve TIMP-1 és -2 esetében a génexpressziós grafikonok egy-egy karakterisztikus donor eredményeit, míg a fehérjevizsgálatok a donorok átlagértékeit mutatják. A szignifikancia érték meghatározását Excel program segítségével és Student T próba felhasználásával végeztük. Az összehasonlításokat a monocitában vagy az DC-ben mért értékekhez viszonyítottuk.

A kevert kultúras tesztek során a statisztikai analízist ANOVA Bonferroni post-hoc testtel végeztük el GraphPad Prism v.6 szoftver segítségével végeztük el. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4. Eredmények

4.1. A mátrix metalloproteináz enzim és inhibitor szerepe monocitákból differenciáltatott nyugvó és aktivált dendritikus sejtek funkcionális sajátosságaira

4.1.1. Az MMP-ok és TIMP-ok expressziójának vizsgálata a monocita-dendritikus sejt differenciáció során

A monociták az emberi vér, sejtjes elemeinek olyan típusát képviselik, amelyek megfelelő veszély jelek hatására a vérkeringésből kilépve a szöveti környezet ingereitől függően makrofággá vagy DC-ké differenciálódnak. A monocita eredetű DC-ek olyan migrációra képesek sejtek, amelyek a szöveti környezet állapotától függően változtatják helyüket. Korábbi munkánk során affymetrix array segítségével kimutattuk, hogy az IL-4 és a GM-CSF hatására differenciálódó nyugvó DC-ek MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-14, MMP-19, TIMP-2 és TIMP-3 aktiváció indukálta fokozódását, míg a TIMP-1 kifejeződése csökkent. Jelen kísérleteink első lépéseként azt vizsgáltuk, hogy a monocitákból *in vitro* differenciáltatott nyugvó, valamint a gyulladásos citokinkoktállal aktivált DC populációk MMP-2, MMP-9 és MMP-12 valamint TIMP-1 és TIMP-2 expressziós mintázata hogyan változik a tenyésztés során.

Eredményeink azt mutatták, hogy a monocitákból történő DC fejlődés során emelkedik az MMP-9 és MMP-12 kifejeződése, és ezzel párhuzamosan csökken a TIMP-1 és TIMP-2 gének expressziója. MMP-2 génexpressziót sem monocitákban, sem DC-kben nem tudtunk kimutatni. Míg monocitákban az általunk használt módszerrel sem MMP-9 sem MMP-12 kifejeződés nem volt detektálható, addig DC-ekben nagy mennyiségben mutattuk ki a gátló hatású TIMP-1 és TIMP-2 gének jelenlétét. A DC differenciáció során megjelenő MMP gének a gyulladásos citokin koktállal aktivált DC-kben a nyugvó sejtekben mért értékeknél magasabb expressziós szintet igazoltunk. Ezzel a génexpressziós mintázattal ellentétben a TIMP gének kifejeződése a monocita – nyugvó – aktivált DC fejlődés során fokozatosan csökkent. Eredményeink azt mutatták, hogy a differenciáció eredményeként az MMP-9 és MMP-12 gének kifejeződése fokozódott, míg a TIMP-1 és TIMP-2 expressziója csökkent. Összhangban a génexpressziós eredményekkel, a monociták nem termeltek MMP9 fehérjét. A nyugvó DC-ek ezzel ellentétben detektálható mennyiségű MMP9 enzimet szecernáltak, amelynek mennyisége a gyulladásos citokin koktállal aktivált DC-ekben tovább növekedett

4.1.2. A monocita – dendritikus sejt differenciációban szerepet játszó citokinek hatásának vizsgálata az MMP-ok és TIMP-ok kifejeződésére

A monociták előzetes eredményeink szerint sem MMP9, sem MMP12 proteinázokat nem termelnek, de a TIMP-1 és TIMP-2 gátló fehérjét sokkal nagyobb mennyiségben szecernálják, mint a monocitából differenciáltatott DC-ek. Ennek kapcsán merült fel a kérdés, hogy a DC differenciáció kiváltását elősegítő citokinek (IL-4 és GM-CSF) közül melyik felelős a gének kifejeződésének elindításáért vagy gátlásáért. Ebből a célból a monocitákat 24 órán át citokinmentes AIMV médiumban tartottuk, 100 ng/ml IL-4, 80 ng/ml GM-CSF vagy mindkét citokin együttes jelenlétében. Az MMP9 és MMP12 gének expresszióját a GM-CSF nagymértékben fokozta, míg az IL-4 önmagában nem okozott változást. IL-4 és GM-CSF együttes alkalmazásakor az IL-4 gátolta a GM-CSF által kiváltott MMP expresszió növekedését. A TIMP1 és TIMP2 esetében nem találtunk egyértelmű összefüggést az egyes citokinek és a génexpresszió változásai között. A génexpressziós kísérletek eredményeit alátámasztva az MMP9 fehérjeszintű megjelenését a GM-CSF nagymértékben fokozta, míg az IL-4 gátolta.

4.1.3. Az IL-4 és a GM-CSF hatásának vizsgálata az MMP-ok és TIMP-ok kifejeződésére

Figyelembe véve, hogy a monociták nem fejeznek ki MMP-9 és MMP-12 géneket, a DC-ek azonban igen, valamint előző kísérleteink alapján az MMP génexpresszió fokozásáért elsősorban a GM-CSF citokin a felelős, ezért a következőkben megvizsgáltuk, hogy ez a hatás közvetlenül érvényesül-e, vagy esetleg más gének hatásán keresztül. A monocitákat ebben a kísérletben is IL-4 és GM-CSF citokinek jelenlétében tenyésztettük, majd a kezelést követő 1, 3, 6, 12, 18 és 24 órát követően a sejtekből mRNS-t izoláltunk. Eredményeink szerint az MMP-9 kifejeződés az IL-4 és GM-CSF kezelést követő 6. órában jelenik meg kimutatható mennyiségben, míg az MMP-12 a nyugvó DC-kben a kezelést követő 18 óra utánmutatható ki. Jelentős változást a kezelt minták génexpressziós szintjében azonban csak 24 órát követően igazoltunk. A TIMP-1 gén kifejeződése a kezelést követő 12. órától kezdve jelentősen csökkent, míg a TIMP-2 gén folyamatos csökkenését követően 18 órával kismértékben újra emelkedett, de mértéke nem érte el a monocitákban tapasztalt értéket. Összhangban a génexpressziós mérésekkel, az MMP9 fehérje szekréciója a citokin kezelés után 18 órával jelentősen nőtt

4.1.4 A gyulladásos citokin koktél összetevőinek hatása az MMP-ok és TIMP-ok kifejeződésére

A nyugvó DC-ekhez viszonyítva a gyulladásástkeltő koktéllal aktivált DC-ek magasabb szinten fejezték ki az MMP9 és az MMP12, és alacsonyabb szinten a TIMP1 és TIMP2 géneket. Ezért megvizsgáltuk, hogy a gyulladásástkeltő koktél egyes összetevői (PGE2, IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF) hogyan befolyásolják a szabályozásban résztvevő gének expresszióját. A MMP-ok expresszióját legnagyobb mértékben az IL-1 β és TNF- α citokinek fokozták, míg a TIMP gének kifejeződését az egyedileg hozzáadott IL-1 β , IL-6 és GM-CSF emelték, míg a koktél összetevőinek együttes hozzáadása következtében a TIMP-ok expressziója a nyugvó DC-hez képest gátlódott.

4.1.5. A gyulladásos koktél hatásának vizsgálata az MMP-ok és a TIMP-ok kifejeződésére

Annak megállapítására, hogy a koktél képes-e közvetlenül befolyásolni az MMP és TIMP gének expresszióját, az 5 napos DC-eket gyulladásos koktéllal kezeltünk és a kezelést követően 30 perccel, 1, 3, 6, 12 és 24 óra elteltével a sejtmintákból RNS-at izoláltunk. Az RT-QPCR módszerrel kapott eredmények alapján az MMP9 és az MMP12 gének kifejeződése 1-3 órával a gyulladásos koktélkezelést követően jelentősen emelkedett az DC-kben mért értékekhez viszonyítva. A maximális génexpressziós értékeket MMP9 esetén a 6 órás mintákban, míg az MMP12 esetén a 12 órás mintákban tapasztaltuk. Érdekes módon a TIMP1 és TIMP2 gének expressziója a koktélkezelést követő néhány órában az DC-kben mért értékekhez képest emelkedik, majd 6-12 órát követően csökken. A TIMP1 24 órát követően, a TIMP2 6-12 óra után mutatható ki, a korábbi kísérletekben már tapasztalt, a DC-hez viszonyított csökkent génexpressziót. A gyulladásos koktél hatását az MMP9 esetén a szecernált fehérje mennyisége alapján is kimutattuk.

4.1.6. A gyulladásos koktél és a bakteriális lipopoliszaccharid MMP és TIMP gének kifejeződésére kifejtett hatásának összehasonlító vizsgálata

Kísérleteink következő szakaszában azt vizsgáltuk, hogy az általunk jellemzett MMP9 és MMP12, valamint a TIMP1 és TIMP2 gének kifejeződése hogyan változik, ha más aktivációs stimulust alkalmazunk a nyugvó DC-ek differenciációjának kiváltásához. Ezért az 5 napos DC tenyészeteket a koktél mellett 500 ng/ml LPS-dal kezeltünk és a mintákból 24 óra elteltével

RNS-t izoláltunk. Eredményeink azt mutatták, hogy az LPS kisebb mértékben emelte az MMP9 és az MMP12 gének expresszióját, mint a gyulladásos citokin koktél. A TIMP1 és a TIMP2 gének kifejeződését az LPS a koktéllal ellentétes módon befolyásolta, az DC-hez képest tovább növelve e gének expresszióját. A fehérjeszintű vizsgálatok alátámasztották a génexpressziós mérések eredményeit, amennyiben az LPS kisebb mértékben emelte az MMP9 expressziót, mint a gyulladásos koktél.

4.1.7. Az MMP és TIMP gének kifejeződésének vizsgálata monocitákból differenciáltatott nyugvó és aktivált dendritikus sejtek CD1a negatív és CD1a pozitív alpopulációiban

Kísérleteink következő szakaszában arra voltunk kíváncsiak, hogy a CD1a⁻ és CD1a⁺ DC alpopulációk MMP9 és MMP12, valamint a TIMP1 és TIMP2 génexpressziójában találunk-e különbségeket. A DC-eket a sejtenyésztés 2. napján sejtszorter segítségével CD1a⁺ és CD1a⁻ alpopulációkra választottuk szét és a sejteket a korábbi kísérletekhez hasonlóan gyulladásos koktéllal aktiváltuk. A sejtekből RNS-t izoláltunk, a sejtkultúra felülszókát ELISA és Innozyme módszerek segítségével analizáltuk. Az MMP9 gént a DC-kben kismértékben a CD1a⁻ alpopuláció fejezi ki, ezek a sejtek a gyulladásos koktéllal aktivált DC-ekben is az MMP9 elsődleges termelői. Ezzel ellentétben az MMP12 termelésért a nyugvó DC-kben kizárólag, aktivált DC-kben pedig túlnyomórészt a CD1a⁺ populáció a felelős. A TIMP1 és TIMP2 gének kevésbé kifejezettek, de elsősorban a CD1a⁻ alpopulációban voltak jelen. Az MMP9 fehérje kiválasztását a CD1a⁻ és CD1a⁺ DC alpopulációk felülszó mintáiban ELISA módszerrel is meghatároztuk. A fehérjeszinten mért eredményeket a génszintű mérések is alátámasztották, amennyiben az MMP9 enzimet a CD1a⁻ alpopuláció termeli, míg a gyulladásos koktéllal kezelt DC-ek által termelt enzim jelentős mennyiségben a CD1a⁻ alpopulációból származik.

4.1.8. A monocitából differenciáltatott nyugvó és érett dendritikus sejtek CD1a⁻ és CD1a⁺ alpopulációk zselatináz aktivitásának mérése

Eredményeinket a sejtek felülszójából mért zselatináz aktivitás méréseivel is alátámasztottuk. Ebből a célból az Innozyme Kit leírásának megfelelően specifikusan aktiváltuk az MMP-9 enzimet, majd a szubsztrát bontásából keletkező színváltozást detektálva kimutattuk, hogy az DC-ek felülszójában mérhető enzimaktivitás magasabb, mint a monociták vagy DC-ek

felülúszójában mért értékek. A szétválasztott sejtek felülúszójából mért MMP9 enzimaktivitás a CD1a⁻ nyugvó és az aktivált DC-kben egyaránt magasabbnak bizonyult.

4.1.9. A széles spektrumú GM6001 szintetikus inhibitor hatásainak vizsgálata a dendritikus sejtek MMP és TIMP termelésére

A GM6001 szintetikus inhibitor hatását a DC-ek fenotípusos sajátosságaira és a sejtek által kifejezett MMP és TIMP gének expressziójára áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk. A DC-ket 24 órán keresztül GM6001 inhibitorral kezeltük, majd a DC-ek fenotípusos változásait áramlási citometria mérésével követtük, kontrollként DMSO oldószert alkalmaztunk. Kísérleteinkben nyugvó és aktivált DC-ekben hasonlítottuk össze a GM6001-el kezelt és a kontrol sejtek felszínén megjelenő DC-specifikus fehérjék kifejeződését. A CD209/DC-SIGN DC marker, a CD1a glikolipid receptor és a sejtek érése során kifejeződő CD83 aktivációs molekula sejtfelszíni kifejeződését detektáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy a GM6001 kezelés nem befolyásolta a DC-ek sejtfelszíni fehérjéinek expresszióját és gén szintű vizsgálatokkal is alátámasztottuk azt az eredményt, hogy a GM6001 inhibitor hozzáadása nem befolyásolta az MMP-ok és TIMP-ek expresszióját. A sejtek felülúszójából mért MMP9 fehérje koncentrációk értékei megerősítették a fenti eredményeket.

4.1.10. A GM6001 szintetikus inhibitor hatásainak vizsgálata a dendritikus sejtek migrációjára

A DC-ek jellemző sajátossága a migrációs képesség, amiben az MMP-oknak és a TIMP-oknak is fontos szerepük van. Ezért a következőkben a GM6001 inhibitor hatásait vizsgáltuk meg a DC-ek vándorlási képességére. Kísérleteink során először a DC-ek migrációját célzottan a nyirokcsomó felé terelő, a migráció elindulásáért felelős CCR7 receptor expresszióját vizsgáltuk meg. Eredményeink alapján a DMSO és a GM6001 sem befolyásolta a DC-ekben a CCR7 gén expresszióját. A sejtek migrációját Transwell rendszerben vizsgáltuk, az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtak szerint. Eredményeink alapján a GM6001 hatékonyan csökkenti a nyugvó és aktivált DC-ek kemokin indukálta vándorlását, ami a CD1a⁻ és a CD1a⁺ DC alpopulációk esetében egyaránt érvényesül.

4.2. A mesenchymális sztoma szerű sejtek szabályozzák a monocita eredetű dendritikus sejtek működését

4.2.1 Az MSC1 sejtek gátolják a monocita eredetű DC-ek differenciációját és aktivációját

A frissen izolált CD14⁺ monocitákat 5 napon keresztül IL-4 és GM-CSF hozzáadása mellett (kontroll), illetve MSC1 sejtek jelenlétében (DC: MSC1 = 5:1) tenyésztettük, és az 5. napon a DC-eket és a kevert kultúrát egyaránt poly (I:C)-vel, 5'pppRNS-el és gyulladásos koktéllal kezeltük 24 órán keresztül. Áramlási citometriás méréseink során bebizonyosodott, hogy a külön vagy kevert kultúrában nevelt DC-ek több mint 90±5%-ban fejezték ki felszínükön a CD209/DC-SIGN markert, ami azt igazolta, hogy az MSC1 sejtek jelenlétében a monociták in vitro DC-ekké differenciálódtak. A 6. napon a CD209/DC-SIGN fehérjét kifejező sejteket pozitív mágneses sejtszeparálási eljárással elválasztottuk az MSC1 sejtektől, és áramlási citometriás méréssel vizsgáltuk a sejtek sejtfelszíni markereinek kifejeződését. Megfigyeléseink szerint a CD1a glikolipid receptor és a CD83 aktivációs marker expresszióját az MSC1 sejtek jelenléte a poly(I:C), 5'pppRNS és a gyulladásos koktél által aktivált DC-eken csökkentette. Ezzel ellentétben az MSC1 sejtek fokozták a CD86 és a CD80 kostimulációs molekulák expresszióját az 5'pppRNS által aktivált DC-ekben, míg a poly(I:C) és gyulladásos koktél által aktivált DC-ekben szignifikáns változás nem volt kimutatható. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy az MSC1 sejtek a DC-ek közvetlen környezetében képesek befolyásolni a DC-ek fenotípusát és aktivációját.

4.2.2. Az MSC1 sejtek befolyásolják az aktivált DC-ek citokin és kemokin szekrécióját

A DC-ek és az MSC1 sejtek együttműködésének további tanulmányozása érdekében az együtt tenyésztett sejteket poly (I:C) és 5'pppRNS segítségével aktiváltuk és a felülűző mintákban mértük a TNF- α és az IL-6 gyulladásos citokinek, a CXCL8 és CXCL10 kemokinek és az IL-10 és IL-12 T-limfocita polarizációt kiváltó citokinek koncentrációját. Eredményeink alapján a RIG-I ligandumok fokozzák az IL-6, a CXCL8 és az IL-10 szekrécióját a kevert kultúrában, az önállóan nevelt DC-hez képest. A nyugvó és aktivált DC-ek egyaránt szecernálnak kis mennyiségű IL-10 citokint, míg az aktivált MSC1 sejtek nem termeltek IL-10-et. A DC-MSC1 sejtek együttműködéséből származó emelkedett mennyiségű anti-inflammatorikus IL-10 gátolja a proinflammatorikus citokinek szekrécióját, ami az MSC1 sejtek által kifejtett hatás egyik fontos mozzanata. A fenti eredménnyel összhangban a gyulladásos TNF- α citokin, a CXCL10 kemokin és a T-sejt polarizáció kiváltásáért felelős IL-12 citokin szekréciója az MSC1 sejtek jelenlétében csökkent. A DC-ek által termelt IL-12 a gyulladás során nemcsak az IFN- γ termelő

CD4⁺ T- limfociták klonális expanziójának illetve differenciációjának kiváltásáért felelős, hanem a DC-ek TNF- α , IFN- γ és interferon indukálta CXCL10 szekréciójának fokozásáért is. Kísérleti rendszerünkben az MSC1 sejtek az IL-10 anti-inflammatorikus citokin szekréciójának fokozásán kívül, az IL-12 gátlásán keresztül is jelentősen befolyásolhatja a gyulladásos citokinek szekrécióját. Az IL-6 és a CXCL8 szekréciója a sejtek együttműködésének köszönhetően jelentősen fokozódott, így ezek a citokinek a szöveti regeneráció és angiogenezis fontos elemei. A kapott eredmények azt sugallják, hogy az MSC1 sejtek gyulladáscsökkentő hatásuk mellett a szöveti megújulásában és a sebgyógyulásban is szerepet játszhatnak.

4.2.3. Az MSC1 sejtek befolyásolják a DC-ek által kiváltott T- limfocita aktivációt és polarizációt

A továbbiakban a DC-ek T-limfocita aktivációt és polarizációt kiváltó képességét MSC1 sejtek jelenlétében vizsgáltuk. A DC-ek a gyulladásos folyamatok során nagy mennyiségű IFN- γ szekrécióra képesek, ami közvetlenül ki tudja váltani a T-limfociták aktivációját. Eredményeink alapján a poly(I:C) és az 5'pppRNS általi aktiváció az önállóan nevelt DC-ekben fokozott IFN- γ szekréciót eredményezett, az MSC1 sejtek jelenlétében azonban gátlódott. Az MSC1 sejtekkel 5 napig együtt nevelt, poly(I:C) illetve 5'ppp RNS által aktivált, majd elválasztott DC-eket allogén T-limfocitákkal együtt helyeztük közös sejtenyészetbe, majd 3 nap után a sejteket olyan speciális felületű ELISPOT lemezekre helyeztük, amelyek képesek a sejtek által szecernált IFN- γ megkötésére, így a citokinek termelésére képes sejtpopulációk számszerű meghatározására. A mérés eredményeiből az derült ki, hogy a poly(I:C) és 5'pppRNS által aktivált DC-ek kiváltják az allogén limfociták IFN- γ szekrécióját, míg az előzőleg MSC1 sejtek jelenlétében differenciáltott DC-ek szignifikánsan kisebb mértékű indukcióra voltak képesek. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a DC-ek az MSC1 sejtek jelenlétében anti-inflammatorikus szöveti környezetet képesek kialakítani.

4.2.4. Az MSC1 sejtek gátolják a DC-ek migrációját

Irodalmi adatokból ismert, hogy a sikeres antigén prezentáció előfeltétele a DC-ek irányított vándorlása a közeli nyirokcsomókba. Korábbi munkánk során megállapítottuk, hogy a feszültség függő Nav1.7 ioncsatorna expressziójának csökkenése és a CCR7 kemokin receptor kifejeződésének növekedése közvetlenül szabályozza a DC-ek migrációját. Kísérleteink során transwell rendszerben vizsgáltuk az MSC1 sejtek hatását a DC-ek vándorlására. A vizsgálatban

a korábbiaknak megfelelően tenyésztettük, majd poly(I:C)-vel és gyulladáso kottéllal aktiváltuk a DC-eket az MSC1 sejtekkel együtt, majd a 6. napon a DC-eket szelektáltuk a kevert kultúrából. A transwell rendszer alsó csatornáiba 0,5% BSA-val kiegészített friss RPMI médiumot mértünk, majd a sejteket a CCR7 kemokin ligandumával, a CCL19/MIP-3 β kemokinnel aktiváltuk. A felső csatornába, amit 5 μ m membrán választ el az alsó, csak médiummal feltöltött csatornáktól, mértük a DC-eket. A 24 órás 37°C-on történő inkubálást követően az alsó csatornába vándorolt DC-ek mennyiségét áramlási citometriás módszerrel határoztuk meg. A vizsgálat kimutatta, hogy a poly (I:C)-vel és gyulladáso kottéllal aktivált DC-ek migrációját a MSC1 sejtekkel történő együttenyésztés szignifikánsan gátolta. A fenti eredménnyel összhangban az MSC1 sejtekkel együtt tenyésztett és aktivált DC-ek CCR7 kemokin receptor expressziójának csökkenését is kimutattuk. Korábbi kutatásainkban részletesen elemeztük a DC-ek MMP és TIMP expressziójának változásait a DC-ek differenciációja során, valamint összehasonlítottuk a CD1a⁺ és CD1a⁻ alpopulációkban mért expressziós mintázatot is. Mivel MSC1 sejtek jelenlétében a DC-ek többsége CD1a⁺ fenotípusú, feltételeztük, hogy az együtt tenyésztés következtében a sejtekben az MMP – TIMP egyensúly is változik. Méréseink alapján az MMP-9 gén kifejeződése fokozódik, míg az MMP-12 génextpressziója csökken igazolva korábbi eredményeinket.

MSC1 sejtek jelenlétében a TIMP-1 és a TIMP-2 szöveti inhibitorok is magasabb expressziós szintet mutattak. Ahogy azt korábban igazoltuk, a Nav1.7 ioncsatorna expressziójának csökkenése közvetlenül befolyásolja a DC-ek migrációját, ami a DC-ek aktiválódásának előfeltétele. Eredményeink alátámasztották, hogy a nyugvó DC-ek Nav1.7 expressziójához viszonyítva a poly(I:C) vagy gyulladáso kottél hozzáadását követően a Nav1.7 csatorna kifejeződése csökken, de azokon a sejteken, amelyeket korábban 5 napon keresztül MSC1 sejtekkel tenyésztettük együtt, a Nav1.7 expressziója magas maradt.

4.2.5. Az MSC1 sejtek gátolják a RIG-like receptorcsalád tagjainak kifejeződését

A RIG-I, MDA-5 és LGP2 receptorok a dsRNS, ssRNS, DNS vírusok felismeréséért felelősek. Korábban e receptorok expressziójának változását mesenchymális sejtek jelenlétében nem vizsgálták. Kísérleteinkben bebizonyosodott, hogy az MSC1 sejtek gátolják a RIG-like receptor család ligandumaival poly(I:C és 5'pppRNS) aktivált DC-ek számos funkcióját. Q-PCR eredményeink azt mutatták, hogy a RIG-I, MDA5 és LGP-2 kifejeződése a külön nevelt DC-kben poly(I:C) és 5'pppRNS kezelés hatására emelkedett, aminek következtében az IFN- β

expresszió is fokozódott, de az MSC1 sejtek jelenlétében nevelt DC-ekben a RIG-like receptorcsalád és az IFN- β expressziója is gátlás alá került. E mérési adatok alapján megállapítottuk, hogy az aktiválás céljából hozzáadott poly(I:C) és 5'pppRNS specifikus RIG-I ligandumok az MSC1 sejtek jelenlétében tenyésztett DC-ekben nem váltották ki a receptor expressziót.

5. Megbeszélés

A DC-k az emberi immunrendszer őrszemeiként a szöveti állományban folyamatosan „őrzőjáratot” folytatnak veszély jeleket és felvehető antigéneket kutatva. A DC-ek sokrétű funkciójának ellátásában a DC-ek migrációs képességének kulcsszerepe van. Az MMP-ok olyan proteolitikus enzimek, amelyek kiemelt szerepet játszanak az ECM megújításában és a sejtek migrációjának szabályozásában. A TIMP-ok az MMP-ok természetes inhibitoraiként szabályozzák ezeket a folyamatokat. Kísérleteinkben az MMP9 és MMP12, valamint a TIMP1 és TIMP2 expresszió változásainak szisztematikus karakterizálásával igazoltuk, hogy a monocitákból differenciáltatott DC-ek CD1a- és CD1a⁺ alpopulációiban ezek a gének illetve fehérjék eltérő módon fejeződnek ki.

A humán perifériás vérből nyert monocitákban sem az MMP9, sem az MMP12 expresszióját nem tudtunk kimutatni, ezzel ellentétben a TIMP1 és TIMP2 kifejeződése fokozódott. A DC fejlődés során a nyugvó DC-ekben az MMP gének kifejeződnek és mennyiségük az aktiváció hatására fokozódik. Ezzel párhuzamosan a TIMP gének expressziós szintje a differenciáció során fokozatosan csökken. Az MMP9 kifejeződését fehérjeszinten ELISA módszerrel is alátámasztottuk és kimutattuk, hogy a monocitákból differenciáltatott DC-ekben megjelenő MMP9 és MMP12 kifejeződésének elindításáért a GM-CSF citokin felelős, míg az IL-4 citokin e gének expressziójára gátló hatást fejt ki. Mivel az expresszió fokozódása a közvetlenül szabályozott génekéhez képest, amelyek esetében a változások 30 perc – 3 óra elteltével már detektálhatók, csak később volt kimutatható (6-18 órával a citokin kezelést követően). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az általunk vizsgált MMP gének kifejeződését az IL-4 és a GM-CSF nem közvetlenül, hanem más – jelenleg nem ismert – gének kifejeződésén keresztül szabályozzák. A TIMP gének expressziójának korábban megfigyelt csökkenését a DC-ben nem tudtuk egyértelműen az egyik vagy másik differenciációban szerepet játszó citokin hatásához kötni. A DC aktivációhoz általunk alkalmazott gyulladásos citokin koktél fokozta az MMP, miközben gátolta a TIMP fehérjék expresszióját. A gyulladásos citokin koktél hatását az idő függvényében vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az MMP9 génexpresszió fokozódása már 1 órával, az MMP12 esetében 3 órával a kezelést követően jelentősen emelkedett, így valószínűleg ezek a citokinek az MMP gének kifejeződését közvetlenül szabályozzák. Az MMP9 gén expressziója a citokin koktéllal történő kezelés után 6 órán át, míg az MMP12 esetében 12 órán át fokozódott, majd csökkent. Fehérjeszintű vizsgálataink adataira támaszkodva megállapítható, hogy az MMP9 mennyisége az aktivációt

követő 12. órától fokozatosan növekszik összhangban a génexpressziós mérésekkel. A TIMP-ek esetében az aktivációt követő első 3-6 órában a génexpresszió kismértékű fokozódását tapasztaltuk, ezt követően a gének kifejeződése csökkent.

Kimutattuk, hogy a gyulladásos citokin koktéllal aktivált DC-ek nagyobb mennyiségű MMP9 és MMP12 szekrécióra voltak képesek, mint az LPS által aktivált DC-ek. Ennek megfelelően a koktéllal aktivált DC-ek migrációja az LPS-el aktivált sejtekéhez viszonyítva fokozódott. Érdekes módon a TIMP1 és TIMP2 gének kifejeződése LPS hatására a nyugvó DC-kben mért értékekhez képest emelkedett, tehát a gének kifejeződését az LPS – a koktél hatásával ellentétesen – növelte.

A CD1a⁻ és CD1a⁺ DC alpopulációk vizsgálatakor kimutattuk, hogy az MMP9 gént kizárólag a CD1a⁻ populáció fejezi ki. Ezzel párhuzamosan, az MMP12 gént nyugvó DC-kben kizárólag, aktivált DC-ek esetén pedig nagyrészt a CD1a⁺ populáció fejezi ki. Az MMP9 fehérje kifejeződésének változásait fehérjeszinten is igazoltuk. A TIMP1 és TIMP2 gének esetén kisebb mértékű eltérést tapasztaltunk a két alpopuláció génexpressziós mintázatában, ami a CD1a⁻ populáció nagyobb mértékű részvételét igazolta. A génexpressziós vizsgálatok eredményeit a DC alpopulációk migrációs aktivitásának változásai is alátámasztották, aminek eredményeként a CD1a⁺ sejtek nagyobb arányban jutottak át a transzwell rendszer pórusain, mint a nagyobb mennyiségű TIMP szekréciójára képes CD1a⁻ sejtek. Az MMP9 DC migrációban betöltött szerepének igazolása céljából a zselatináz aktivitás mérésével is ellenőriztük a DC-ek felülúszójában mérhető enzim aktivitást. Az alkalmazott módszer segítségével az MMP9 (zselatináz B) aktivitásán kívül az MMP2 aktivitását (zselatináz A) is képes detektálni, amelynek kifejeződését korábbi vizsgálatokban monocita és bőr eredetű DC-ben is kimutatták. Saját vizsgálatainkban az MMP2 expresszióját az általunk vizsgált DC-kben nem tudtuk kimutatni. Így a CD1a⁻ DC-ken mért CD1a⁺ sejtekhez képest magasabb zselatináz aktivitását az MMP9 enzim emelkedett jelenlétének tulajdoníthatjuk.

Munkánk során elsőként vizsgáltuk a GM6001 szintetikus MMP gátló szer hatását a DC-ek fenotípusára és funkcióira. Mivel a GM6001 gátlásának célpontja az MMP enzimek katalitikus doménjában található Zn²⁺ kelát ion, ezért azt feltételeztük, hogy a GM6001 nem befolyásolja a DC-ek MMP és TIMP expresszióját és szekrécióját. Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a GM6001 az MMP enzimek inaktivációján keresztül hatékonyan gátolja a DC-ek migrációját. Az inhibitor hozzáadása nem változtatta meg a DC-ek fenotípusát, differenciációját és aktivációját és az MMP és TIMP gének expresszióját. Eredményeink azt mutatták, hogy a

GM6001 a CD1a⁺ és CD1a-DC alpopulációk migrációját egyaránt csökkentette, így vélhetően a GM6001 az MMP9 és MMP12 működését egyaránt gátolja. A GM6001 klinikai felhasználhatósága jelenleg még kérdéses, eredményeink alapján a GM6001 potenciális klinikai megoldást jelenthet olyan kórképek esetében, ahol a kóros sejtek migrációját a DC-ek funkcióinak befolyásolása nélkül szükséges csökkenteni. Ehhez azonban a molekula további részletes vizsgálata szükséges.

Mivel a DC-ek az immunrendszer szabályozásának központi szerplői és funkcióik betöltéséhez nélkülözhetetlen migrációs képességük fenntartása, ami az általuk termelt MMP-ok függvénye, ezért fontos megismerni ezeknek az enzimeknek a termelődési folyamatát, funkcióikat és a gátlás mechanizmusát. Ismert irodalmi adat, hogy amennyiben a finoman szabályozott MMP-TIMP rendszer működése zavart szenved, mint egyes malignus kórképekben, ami súlyos betegségek kialakulását eredményezheti. Klinikai vizsgálatok során figyelték meg, hogy az MMP-ok működésének gátlásával csökkenthető az áttétek kialakulásának esélye. Így eredményeink hozzájárulhatnak az MMP – TIMP szabályozó hálózat működési elvének megértéséhez. A DC-ek működésének szabályozása és a DC alapú sejterápiás módszerek fejlesztése új lehetőségeket nyit az alap kutatás és a terápiás alkalmazás fejlesztésében. A szintetikus alapú, de sejtműködést befolyásoló módszerek fejlesztése mellett egyre nagyobb teret nyernek a különböző eredetű őssejtek felhasználásán alapuló módszerek. Az egészséges emberi szervezet szerveiben/szöveteiben elszórtan található őssejtek, amelyek az azonnali sebgyógyuláshoz, a károsodott szövetek helyreállításához járulhatnak hozzá. A MSC-ek ismert tulajdonsága, hogy az immunrendszer végrehajtó funkcióit képesek gátolni. A különböző eredetű MSC-ek allogén csontvelő transzplantációt befolyásoló képességét egér és ember modellben egyaránt kimutatták, és számos klinikai kórképben vizsgálták gyulladás csökkentő hatásukat. Ezek a kutatási eredmények arra utalnak, hogy az MSC-ek számos gyulladással járó kórképben is potenciális megoldást jelenthetnek, ezért napjainkra kiemelt kutatási célponttá váltak a szövetregenerációs, autoimmun és sejterápiás módszereket fejlesztő munkacsoportok számára. Immunológiai szempontból fontos tényező, hogy a MSC-ek az MHC fehérjék közreműködése nélkül is képesek az immunrendszer működésének modulálására. A MSC-ek terápiás felhasználásának nehézsége, hogy a szervezetből kinyerhető sejtek mennyisége korlátozott, és ezért számos kutatócsoport foglalkozik olyan sejt vonalak előállításával, amelyek az MSC-ekhez hasonló immunszuppresszív tulajdonságokkal rendelkeznek.

Vizsgálatainkhoz 5 napos humán embrióból származó, blasztocisza eredetű, egy korábbi kollaborációs munka során sokoldalúan jellemzett sejtvonal (MSCI) humán monocita eredetű DC-ekre kifejtett hatását vizsgáltuk. Az MSCI sejtek fenotípus sajátosságát, differenciációs és funkcionális képességeit csontvelő eredetű MSC, valamint humán foreskin fibrolaszt (HFF) sejtvonal tulajdonságaival hasonlítottuk össze. Mivel a korábbi eredmények arra utaltak, hogy az MSCI sejtek morfológiája, fenotípusa és funkcionális aktivitása hasonló a terápiás eljárásokban is alkalmazott BM-MSC sejtekéhez, ezért azt feltételeztük, hogy az MSCI sejtvonal is rendelkezik hasonló immunuszuppresszív képességekkel. Kísérleteink során az MSCI sejtek monocitákból differenciáltatott DC-ekre kifejtett hatását tanulmányoztuk, különös figyelmet fordítva a DC-ek differenciációjának, aktivációjának és funkcióinak változásaira. Eredményeink szerint a DC-ek fenotípusos sajátosságai az MSCI sejtek jelenlétében jelentős változáson mennek keresztül, aminek következtében a glikolipid receptorként működő CD1a és a CD83 aktivációs marker kifejeződése csökken a gyulladásos citokin koktéllal vagy a specifikus RIG-I ligandumokkal aktivált DC-ekben, amennyiben MSCI sejtekkel tenyésztettük együtt őket. Ezzel szemben a CD80 és D86 kostimulációs molekulák sejtfelszíni expressziója a DC-ekben az MSCI sejtek jelenlétében fokozódott, noha korábbi vizsgálatokban a BM-MSC sejtek e molekulák kifejeződését eger és humán modellben egyaránt gátolták. A DC-ek által szecernált citokinek koncentrációjának változásait különböző eredetű sejtvonalak jelenlétében szintén vizsgálták, de hatásmechanizmusra vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre.

Jelen kísérleti rendszerünkben a poly(I:C) vagy 5'pppRNS által aktivált MSCI sejtek jelenlétében tenyésztett DC-ek felülúszójában szintén emelkedettszintű IL-6, CXCL8 és IL-10 termelést tapasztaltunk, míg a gyulladásos IL-12 és TNF- α koncentrációja szignifikánsan csökkent. Ahogy korábbi adatokból ismert, az IL-6 és CXCL8 citokinek a szövetregeneráció és érképződés fontos közvetítői, így a sejtek a kiváltott immunuszuppresszív környezet ellenére is serkenthetik a sebgyógyulás folyamatait és az új erek képződését.

Eredményeink arra utalnak, hogy a DC-MSCI sejtek kapcsolatának eredményeként lokálisan olyan szöveti környezet alakul ki, amelyben a sejtek gyulladást csökkentő képessége a sebgyógyulást is elősegíti. A CCL19 kemokint a tímusz és a nyirokszövetek is kiválasztják, aminek következtében a fertőzött szövetek környezetében a CCR7⁺ DC-ek a közeli nyirokcsomókba vándorolnak, ahol közvetlen kapcsolatba tudnak lépni a naív T-limfocitákkal. A kevert kultúrában tenyésztett aktivált DC-ek felszínén csökkent mennyiségű CCR7 receptort

detektáltunk, és ennek megfelelően a sejtek migrációja a kontroll DC-ekhez viszonyítva jelentősen gátlódott.

Az intracelluláris Ca^{2+} szint által szabályozott Nav1.7 csatorna működése közvetlenül befolyásolja a nyugvó DC-ek migrációs képességét, míg az aktivált DC-ek vándorlását a Nav1.7 csatornák expressziójának csökkenése kíséri. A Nav1.7 csatornák eltűnése a sejtmembránról és a sejtiklust befolyásoló intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megfelelő mértéke esszenciális a DC-ek éréséhez. Azokban a DC-ben, amelyek MSCl sejtek jelenlétében differenciálódtak és ezt követően aktiváltuk a sejteket, magas Nav1.7 expressziót detektáltunk, aminek eredményeként a DC-ek $\text{Nav1.7}^+ \text{CCR7}^-$ sejtekké differenciálódtak. Kimutattuk, hogy a $\text{Nav1.7}^+ \text{CCR7}^- \text{CD1a}^-$ DC-ekben fokozódott az MMP9, TIMP1 és TIMP2 gének kifejeződése, míg migrációs képességük gátlódott. Ahogy azt előző kutatásainkban kimutattuk, az MMP-ok és TIMP-ok szekréciója a DC-ek differenciációja során változik: az MMP-ok expressziója fokozódik, míg a TIMP-ok expressziója folyamatosan csökken, lehetővé téve a sejtek szövetek közötti hatékony migrációját. Ezzel ellentétben jelen eredményeink azt mutatták, hogy az MSCl sejtekkel együtt nevelt és gyulladásos koktéllal vagy poly(I:C)-vel aktivált DC-ek nagy mennyiségű TIMP szekréciójára képesek, ezáltal közvetlenül gátolják a DC-ek migrációját, megváltoztatva ezzel az MMP enzimek kemokin, citokin és receptort szolubizáló aktivitását szabályozva a DC funkciókat és az immunválasz további kimenetelét. Jelen kutatásunkban a T-sejtek által termelt IFN- γ csökkent szekrécióját ELISPOT módszer segítségével mutattuk ki. Kísérleti rendszerünkben a humán allogén T-sejteket poly(I:C) vagy 5'pppRNS segítségével aktiváltuk, majd a DC-eket önállóan, vagy MSCl sejtek jelenlétében tartottunk fenn 5 napon keresztül. Eredményeink azt mutatták, hogy a sejtaktiváció ellenére az MSCl sejtek mellett nevelt DC-ek nem voltak képesek kiváltani a T sejtek *Th1* irányú polarizációját.

In vitro kutatások sora igazolta, hogy az MSC sejtek jelentősen megváltoztatják a DC-ek számos funkcióját, amit saját kísérleteinkkel is alátámasztottunk. Bebizonyítottuk, hogy az MSCl sejtek a DC-ek gátlásán keresztül az antigén specifikus T-sejt válasz kialakulását is képesek megakadályozni. Ebben a kísérleti rendszerben a DC-ekben kifejeződő RIG-like receptorok expresszióját korábban még nem vizsgálták. Eredményeink szerint a RLR receptorok ligandummal történő aktiválása a DC funkciók gátlásához vezet, ami az RLR receptorok kifejeződésének csökkenése miatt is bekövetkezhet. Eredményeink azt mutatták, hogy az MSCl sejtek jelenlétében nevelt DC-ek RIG-I, MDA-5, LGP-2, expressziója drasztikusan csökkent a kontroll mintákéhoz képest. Ezek az eredmények az MSCl sejtek

jelenlétében kialakuló, előzőleg már jellemzett immunszuppresszív tulajdonságokkal rendelkező tolerogén. DC-ek kialakulására utalnak. Reményeink szerint a korlátlanul szaporodó MSC1 sejtek DC-re kifejtett hatásának vizsgálatával potenciálisan klinikai felhasználásra is alkalmas szuppresszív hatású DC-ek állíthatók elő.

6. Összefoglalás

A dendritikus sejtek (DC) immunrendszerünk „örszemei”, amelyek a szöveti állományban a veszély jelek és antigének felismerését követően a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol képesek a naiv T-limfociták különböző funkciókra szakosodott végrehajtó T-sejteké történő differenciációját kiváltani. Sokoldalú működésüknek köszönhetően a DC-ek az immunterápiás eljárások fejlesztésének egyik fontos és ígéretes célterületévé váltak. Előzetes kutatási eredményeink azt igazolták, hogy a CD1a sejtfelszíni molekula megjelenése alapján a DC-ek két, eltérő funkcionális sajátysággal rendelkező altípusra oszthatók. A CD1a⁻ és CD1a⁺ DC-ek vizsgáltval kimutattuk, hogy az MMP9 gént kizárólag a CD1a⁻ populáció fejezi ki, míg a MMP12 gént elsősorban a CD1a⁺ alpopuláció fejezi ki.

Munkánk során elsőként vizsgáltuk a GM6001 szintetikus MMP gátlószer hatását a DC-ek fenotípus sajátyságaira és funkcióira. Kísérleteink bebizonyították, hogy a GM6001 az MMP enzimek inaktivációja a DC-ek fenotípusának, differenciációjának és aktivációjának befolyásolása nélkül hatékonyan gátolja a DC-ek migrációját. Ismert irodalmi adat, hogy amennyiben a finoman szabályozott MMP –TIMP rendszer működése zavart szenved, mint pl. egyes malignus kórképekben, az súlyos betegségek kialakulását eredményezheti. Klinikai vizsgálatok során figyelték meg, hogy az MMP-ok működésének gátlásával csökkenthető az áttétek kialakulásának esélye. Így eredményeink hozzájárulhatnak az MMP – TIMP szabályozó hálózat működési elvének és együttműködésének jobb megértéséhez. A DC-ek sokrétű funkcióinak szabályozásával kapcsolatos kutatási eredmények és a DC alapú sejterápiás módszerek fejlesztése az alapkutatás és a terápiás alkalmazások fejlesztésében is új lehetőségeket nyithatnak.

A szintetikus alapú, de sejtműködést befolyásoló módszerek fejlesztése mellett egyre nagyobb teret nyerne a különböző eredetű őssejtek felhasználásán alapuló módszerek. Az egészséges emberi szervezet szerveiben/szöveteiben csupán elszórtan találhatók őssejtek, amelyek hozzájárulhatnak a sebgyógyuláshoz és a károsodott szövetek helyreállításához. *In vitro* kutatások azt is igazolták, hogy az MSC sejtek a DC-ek számos funkcióját képesek

módosítani, amit saját kísérleteinkkel is alátámasztottunk. Bebizonyítottuk, hogy az általunk korábban sokoldalúan jellemzett MSC1 sejtvonal befolyásolja a DC-ek differenciációját, aktivációját és migrációját. Elsőként mutattuk ki, hogy az MSC1 sejtek megváltoztatják a DC-ek által szecernált MMP-TIMP egyensúlyt és a DC-ek gátlásán keresztül az antigén specifikus T-sejt válasz kialakulását is képesek megakadályozni. A DC-ekben specifikus aktiváció hatására kifejeződő RIG-like receptorok szerepét korábban még nem vizsgálták. Eredményeink azt mutatták, hogy az MSC1 sejtek jelenlétében nevelt DC-ekben a RIG-I, MDA-5 és LGP-2 kifejeződése a nem aktivált sejtekéhez képest jelentősen csökken. Ezek az eredmények az MSC1 sejtek jelenlétében kialakuló, immunszuppresszív tulajdonságokkal rendelkező tolerogén DC-ek kialakulására utalnak. Így a korlátlanul szaporodó MSC1 sejtek DC-ekre kifejtett hatása potenciális lehetőséget kínál szuppresszív hatású DC-ek előállítására és klinikai felhasználására.

7. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/115/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bacskai Ildikó

Neptun kód: CX05CQ

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10036830

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bacskai, I.**, Mázló, A., Kis-Tóth, K., Szabó, A., Panyi, G., Sarkadi, B., Apáti, Á., Rajnavölgyi, É.:
Mesenchymal stromal cell-like cells set the balance of stimulatory and inhibitory signals in
monocyte-derived dendritic cells.
Stem Cells Dev. Epub ahead of print (2015)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2014.0509>
IF:4.202 (2013)

2. Kis-Tóth, K., **Bacskai, I.**, Gogolák, P., Mázló, A., Szatmári, I., Rajnavölgyi, É.: Monocyte-derived
dendritic cell subpopulations use different types of matrix metalloproteinases inhibited by
GM6001.
Immunobiology. 218 (11), 1361-1369, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.012>
IF:3.18





További Közlemények

3. Szabó, A., Osman, R.M., **Bacska**i, I., Kumar, B.V., Agod, Z., Lányi, Á., Gogolák, P., Rajnavölgyi, É.: Temporally designed treatment of melanoma cells by ATRA and polyI.
Melanoma Res. 22 (5), 351-361, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e328357076c>
IF:2.518
4. Altorjay, I., Veréb, Z., Serfőző, Z., **Bacska**i, I., Bátori, R., Erdődi, F., Udvardy, M., Sipka, S., Lányi, Á., Rajnavölgyi, É., Palatka, K.: Anti-TNF-alpha antibody (infliximab) therapy supports the recovery of eNOS and VEGFR2 protein expression in endothelial cells.
Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 24 (2), 323-335, 2011.
IF:2.991
5. Kis-Tóth, K., Hajdu, P., **Bacska**i, I., Szilágyi, O., Papp, F., Szántó, A., Posta, E., Gogolák, P., Panyi, G., Rajnavölgyi, É.: Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.7 Maintains the Membrane Potential and Regulates the Activation and Chemokine-Induced Migration of a Monocyte-Derived Dendritic Cell Subset.
J. Immunol. 187 (3), 1273-1280, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003345>
IF:5.788

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,679

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,382

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

Debrecen, 2015.05.29.



8. Válogatott prezentációk:

- 2009. X. 29 – 30 Magyar Immunológiai Társaság Ifjúsági Kongresszusa, Harkány, poszter
- 2010.VIII.31-XI. 4 Cross-Talk Konferencia Debrecen, poszter
- 2010.XII.1-3 BSRT PhD Symposium of Stem Cells, Berlin, előadó
- 2011.III. 10-11, 3rd Conference on "A focus on stem cells, poszter
- 2011. X.12-14, 40. Magyar Immunológiai Társaság Kongresszusa, poszter
- 2012.I. 04-07, Winter School, Galyatető előadó
- 2012.III. 22, 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged, poszter
- 2012.IX. 3-5, 26th ANNUAL EMDS Conference, Debrecen, poszter
- 2013.I.3-5, Winter School, Galyatető, előadó
- 2014.I.8, Winter School, Galyatető, előadó
- 2014.X. Magyar Immunológiai Társaság Kongresszusa, poszter
- 2014.V.29, „Kutatói hálózatok kapcsolatépítése - Debrecen az élettudományi kutatásokért konferencia, előadó

9. Tárgyszavak

Mesenchymális sztróma sejt, dendritikus sejt, immunszuppresszió, mátrix metalloproteázok

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok Dr. Rajnavölgyi Éva professzorasszonynak, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához.

Köszönök mindent Dr. Kis-Tóth Katalinnak, aki még a távolból is végig mellettem állt és számtalan magas színvonalú jótanáccsal látott el, illetve Mázló Anettnek, aki a laboratóriumban és a felmerülő problémák megoldásában is nagy segítségemre volt. Hálás vagyok Nagyné Kovács Erzsikének, aki önzetlen támogatásával alapvetően hozzájárult szakmai és gyakorlati fejlődésemhez és sikeres munkámhoz, illetve Miltner Noéminek a kísérleteben nyújtott segítségéért. Köszönettel tartozom Dr. Gogolák Péternek, Dr. Apáti Ágotának és Dr. Szabó Attilának a sok szakmai segítségért. Köszönetet mondok az Immunológia Intézetben dolgozó valamennyi munkatársnak a kísérleti munka során felvetődő gyakorlati problémák megoldásában nyújtott segítségükért, tanácsaikért, tapasztalataik megosztásáért. Köszönetet mondok Kiss Anikónak és Rácz Andreának, hogy segítettek formába önteni dolgozatomat és ezzel is hozzájárultak annak sikerességéhez.

Köszönöm szépen páromnak a rengeteg türelmet, és családomnak az intenzív drukkolást.