

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Bacskai Ildikó

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN 2015

Rövidítések jegyzéke

APC	antigen presenting cell
BSA	bovine serum albumin
CCR	chemokine (C-C motif) receptor
cDNS	komplementer deoxiribonukleinsav
CXCR	CXC chemokine receptor
DC	dendritic cell
dNTP	dezinukleotid-trifoszfát
ECM	extracelluláris mátrix
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony stimulating factor
GVHD	graft versus host disease
IL	interleukin
LPS	lipopolisaccharde
MDA-5	melanoma differentiation-associated protein 5
MHC	major hisztoncompatibility complex
MMP	matrix methalloproteinase
MSC	mesenchymal stromal cell
MSCI	mesenchymal stromal cell like cell
NLR	NOD like receptors
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered salin
PGE ₂	prostaglandin E2
PRR	pattern recognition receptors
RECK	reversion inducing cystein rich with kazal motif
RIG-I	retinoic acid-inducible gene 1
RLR	RIG-I like receptors
RNS	ribonucleicacid
ROS	reactive oxygen species
RT	reverse transcriptase
RT-QPCR	real-time kvantitatív polimeráz láncreakció
SDS	sodium dodecyl sulphate
SP	signal peptide
TGFb	transforming growth factor beta
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VGSC	voltage-gated sodium channel

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	5.
2. Irodalmi áttekintés	6.
2.1 A dendritikus sejtek	6.
2.2 A mátrix metalloproteázok	9.
2.2.1 A mátrix metalloproteázok szabályozása	12.
2.2.2 A GM6001 szintetikus MMP inhibitor	14.
2.2.3 A dendritikus sejtek és a mátrix metalloproteinázok kapcsolata	15.
2.3 A mesenchymális stroma sejtek módosítják a monocitából differenciáltatott dendritikus sejtek funkcióit	15.
3. Célkitűzés	19.
4. Anyagok és módszerek	21.
4.1. Etikai nyilatkozat	21.
4.2. Monocita szeparálás humán vérből	21.
4.3. Mesenchymális stróma szerű sejtek izolálása és tenyésztése	21.
4.4. Kevert sejt kultúra készítése	22.
4.5. A sejtek aktiválása, GM6001 kezelés	22.
4.6. A sejt felszíni molekulák kifejeződésének vizsgálata	23.
4.7. A dendritikus sejt alpopulációk szeparálása a CD1a molekula jelenléte alapján	23.
4.8. RNS izolálás, cDNS szintézis, kvantitatív PCR	23.
4.9. Enzim-kötött immunsorbens esszé.	24.
4.10. ELISPOT esszé	24.
4.11. Sejt migrációs esszé	24.
4.12. Zselatináz aktivitás mérés	25.
4.13. Statisztikai analízis	25.
5. Eredmények	26.
5.1. A monocitából differenciáltatott nyugvó és aktivált DC-ek MMP és TIMP vizsgálata	26.
5.1.1. Az MMP-ok és TIMP-ek expressziójának vizsgálata a monocita-DC differenciáció során	26.
5.1.2. A monocita – DC differenciációban szerepet játszó citokinek hatásának vizsgálata az MMP-k és TIMP-ek expressziójára	28.

5.1.3.	Az IL-4 és a GM-CSF direkt hatásának vizsgálata az MMP-k és TIMP-ek expressziójára	29.
5.1.4	A gyulladásos citokin koktél összetevőinek hatása az MMP-k és TIMP-ek expresszióra	30.
5.1.5.	A gyulladásos citokin koktél direkt hatásának vizsgálata az MMP-k és TIMP-ek expressziójára	31.
5.1.6.	A gyulladásos citokin koktél és lipopoliszacharid MMP-k és TIMP-ek génexpresszióra kifejtett hatásának összehasonlító vizsgálata	33.
5.1.7.	A monocitából differenciáltatott éretlen és érett DC-ek CD1a – és CD1a+ alpopulációinak MMP-k és TIMP-ek expressziója	34.
5.1.8.	A monocitából differenciáltatott éretlen és érett DC-ek CD1a - és CD1a+ alpopulációinak zselatináz aktivitásának mérése	36.
5.1.9.	A GM6001 széles spektrumú szintetikus inhibitor hatásainak vizsgálata a dendritikus sejtek MMP-k és TIMP-ektermelésére	37.
5.1.10.	A GM6001 szintetikus inhibitor hatásainak vizsgálata a dendritikus sejtek migrációjára	39.
5.2.	A mesenchymális sztróma szerű sejtek szabályozzák a monocita eredetű DC-ek működését	40.
5.2.1.	Az MSC1 sejtek gátolják a monocita eredetű DC-ek differenciációját és aktivációját	40.
5.2.2.	Az MSC1 sejtek befolyásolják az aktivált DC-ek citokin és kemokin szekrécióját	42.
5.2.3.	Az MSC1 sejtek befolyásolják a DC-ek által kiváltott T- limfocita aktivációt és polarizációt	44.
5.2.4.	Az MSC1 sejtek gátolják a DC-ek migrációját	46.
5.2.5.	Az MSC1 sejtek gátolják a RIG-like receptorcsalád tagjainak expresszióját	48.
6.	Diszkusszió	50.
7.	Összefoglalás	56.
8.	Tárgyszavak	58.
9.	Irodalomjegyzék	59.
10.	Függelék	67.
	Köszönetnyilvánítás	69.

1. Bevezetés

A veleszületett és szerzett immunitás működésének összehangolásában a dendritikus sejtek (DC) kiemelt szerepet töltenek be. A DC-ek két funkcionálisan eltérő típusa a plazmacitoid DC-ek (pDC) és a konvencionális DC-ek (cDC) sorolhatóak. A konvencionális DC-ek (továbbiakban DC) az egészséges szervezetben olyan hálózatrendszert 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 az immunszuppresszív 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.

2. Irodalmi áttekintés

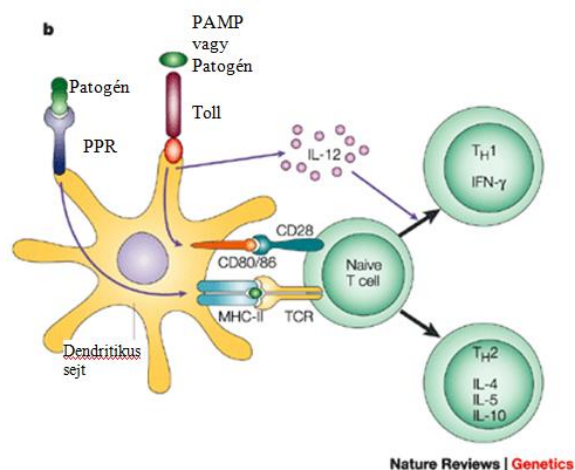
2.1 A dendritikus sejtek (DC)

Az emberi szervezetben kis számban jelenlévő dendritikus sejtek (DC) alapvető szerepet játszanak az immunrendszer mozgósításában, a természetes és szerzett védelmi rendszerek összehangolt működésének irányításában (1). A konvencionális DC-ek csontvelői progenitor sejtekből képződő CD11⁺ mieloid előalakból fejlődnek, gyulladásos folyamatok során azonban monocitákból is differenciálódhatnak (2-4). 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 (5). 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 citoszolikus 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 (6).

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 (7, 8). A DC-ek egyedülálló módon képesek a naív segítő T-sejtek aktiválására a nyirokcsomókban. A DC-ek közvetlenül befolyásolják az immunválasz immunogén vagy tolerogén jellegét, ezért szerepük a veleszületett és szerzett immunitás összehangolásában is kiemelt jelentőségű (1, 9). **(1. ábra)**

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 (10). 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 sajátságai *in vivo* körülmények között is eltérően befolyásolják az immunrendszer működését.

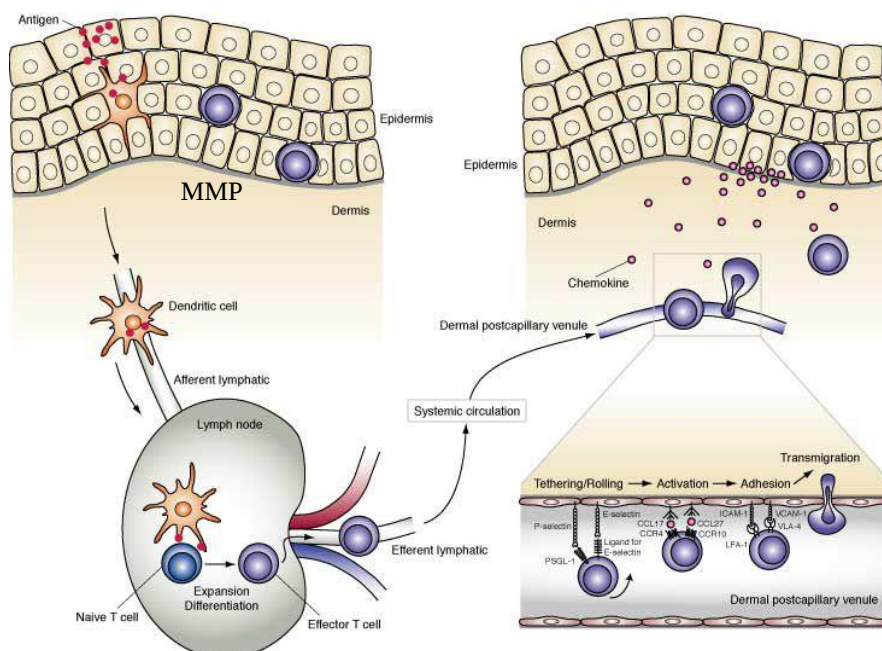


1. Ábra: A DC-ek a mintázatfelismerő receptorok (PPR) segítségével számos különböző eredetű antigén felismerésére képesek. A feldolgozott antigéneket MHC molekulák közvetítésével mutatják be a nyirokcsomóban található naiv T- limfocitáknak, amely folyamat következtében a T-limfociták Th1 vagy Th2 irányú polarizációja következtében végrehajtó (effektor) sejtekké alakulnak (Rogge et al. Nat Genet, 2000)

A DC-ek aktivációját a sejtfelszíni kemokin receptorok megjelenése, az MHC I és II fehérjék, kostimulációs és adhézis molekulák, valamint a CD83 aktivációs marker kifejeződésének fokozódása jellemzi, ezzel párhuzamosan a sejtek fagocitáló képessége csökken (5). 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. (12, 13). 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 (13), 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 sejttypusban az aktin-vezérelt sejt megnyúlásával kezdődnek (I), amit a

célszövetben kifejeződő integrinokkal kialakított kölcsönhatások követnek (II). A szövetek közti extracelluláris mátrix (ECM) elbontása érdekében a sejtek különböző típusú proteázokat szecernálnak (III), majd az aktin-miozin-mediált összehúzódást követően (IV.) a sejt az elbontott mátrixhoz húzódik, (V.), és aktin-vezérelt megnyúlással halad tovább (11). 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) szabályozzák (14). A VGSC-k működésének gátlása gyulladást csökkentő hatású, autoimmun encephalomyelitis és sklerózis multiplex kezelésére is alkalmazzák (15). A nyugvó DC-ek membránjában magas a Nav1.7 csatorna kifejeződése, a sejtaktiváció során azonban az expresszió folyamatosan csökken, ami lehetővé teszi a sejt aktiváltsági állapotának elérését (14). A DC-ek az antigén felvételét követően aktivációs szignálok hatására, megnövekedett Ca^{2+} koncentráció jelenlétében válnak képessé a nyirokcsomóba történő vándorlásra. **(2. ábra)**



2. Ábra: A DC-ek állandó őrjáratot folytatnak a szövetek között, az idegenként azonosított antigéneket hatékonyan fagocitálják, aktiválódnak majd ezt követően az ECM-en keresztül a

nyirokerek keringésébe belépve a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol aktiválják a T-limfocitákat. A T-limfociták a nyirokcsomókból a kórokozó bejutásának helyére vándorolnak. (Hirata et al. CRC Press, 2005)

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. (16, 17). 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, (18) ami az IFN- γ szekréció révén fejti ki hatását. (19, 20) A humorális immunválaszban szerepet játszó *Th2* sejtek kialakulásához a DC-ek által szecernált IL-2 és IL-33 jelenléte szükséges (20), míg az IL-6 a *Th17* irányú T-sejt polarizációt segíti elő (21). Ennek eredményeként a DC-ek által kialakított citokin környezet fontos szerepet tölt be a T-limfociták által közvetített antigén specifikus, adaptív immunválasz kialakulásában.

2.2 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. (22, 23). Az MMP-ok szerepét a citokinek, kemokinek és számos fehérje hasításában bizonyították, igazolva szerepüket a gyulladásos folyamatok, és az immunrendszer egyéb folyamatainak szabályozásában. (24) Az MMP-ket fiziológiás körülmények között számos sejtípus 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 (25, 26).

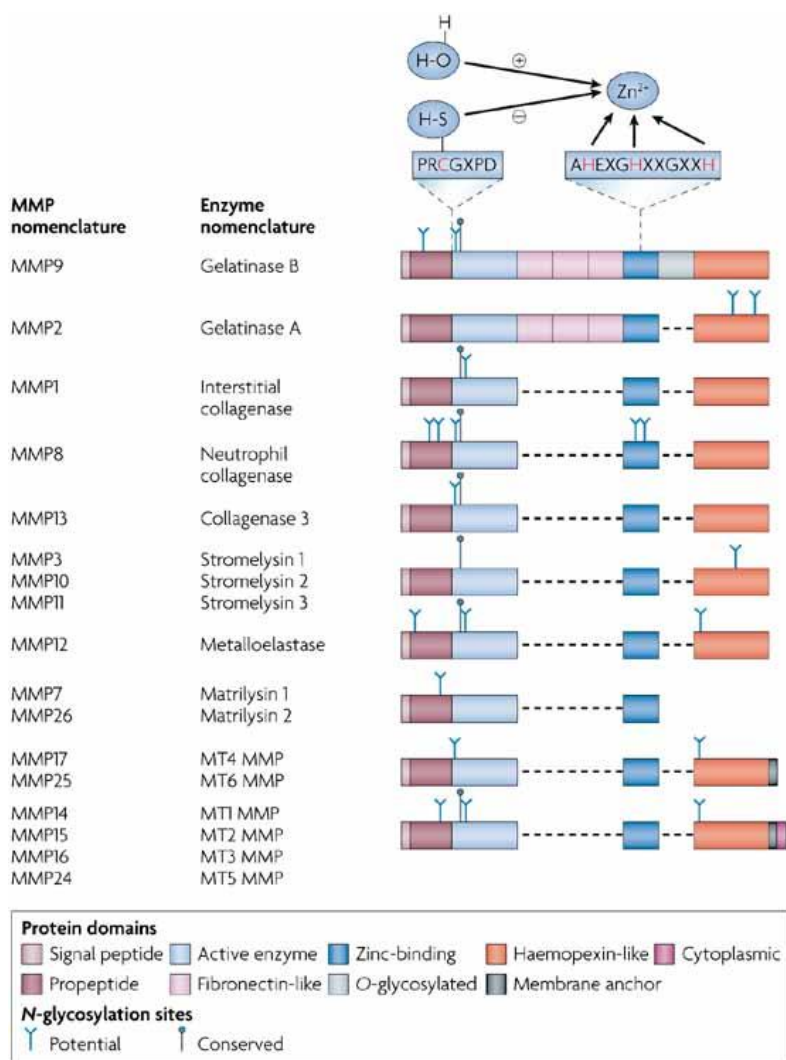
Gross és Lapiere 1962-ben végzett kísérlet sorozatát követően, amelyben bizonyították, hogy a natív fibrilláris kollagén gél enzimekkel emészthető (27) egy egész enzim családot írtak le hasonló funkcionális tulajdonságokkal. Az enzimcsalád neve egyrészt az enzim katalitikus működéséhez nélkülözhetetlen fémionra (metallo), másrészt ECM-et bontó képességükre (mátrix-, proteináz) utal. Tagjai vagy szecernált, vagy membránhoz kötött formában jelennek meg. Ezek az enzimek számos gyulladásos és sebgyógyulási folyamat során nélkülözhetetlen funkciókat látnak el, jelenlétük az immunrendszer evolúciójának már korai szakaszában kimutathatók. (28). Gerincesekben 25 MMP enzimet azonosítottak, amelyekből 22 rokonságot mutat az emberi kollagént bontó enzimekkel (28, 29). A különböző doménszerkezetű MMP-ok az ECM összes komponensét képesek bontani. A gerinces MMP-ok legfontosabb jellemzőit **1. táblázat** foglalja össze (Parks nyomán (24)). Az MMP-ok szerkezeti felépítésükben, funkcióikban, szöveti lokalizációjukban, szubsztrát specificitásukban és szabályozó funkcióikban is különböznek egymástól.

Az MMP-ok szerkezetét vizsgálva a fehérje szabad N-terminálisa felől a karboxilcsoport felé haladva a következő doméneket különítették el: a szignál peptid (SP), ami a sejten belül lehasad majd szecernálódik, a propeptid (PRO) domén, ami fenntartja az enzim inaktív állapotát mindaddig, amíg az le nem hasad az enzimről vagy térbeli elrendeződése meg nem változik, és a konzervatív cink-kötő régiót tartalmazó katalitikus domén. Az MMP7, MMP23 és az MMP26 kivételével mindegyik fehérje tartalmaz hemopexin-szerű domént, ami a csukló régió keresztül kapcsolódik a katalitikus doménhez. A hemopexin domén a szöveti enzim inhibitor (TIMP) és a szubsztrát kötését, aktiválódását és proteolitikus aktivitását is képes befolyásolni (30, 31). A különböző MMP-ok a csukló régió hosszában és összetételében is különböznek egymástól, ami szintén befolyásolhatja a szubsztrát specificitását (32).

Az MMP2 és MMP9 (zselatináz A és B) enzimeket a háromszor ismétlődő, ciszteinben gazdag és a fibronectin kollagén-kötő régiójához hasonló, katalitikus doménen belül található szakasz jellemzi, ami biztosítja a kollagén és az elasztin enzimátikus hasítását t (33, 34). Az MMP9 a csukló régióban egy V. típusú kollagénszerű szekvenciát is tartalmaz, aminek szerepe nem ismert. A membrán kötött MMP-ek rendelkeznek egy transzmembrán doménnel (TM) és egy rövid citoplazmatikus résszel (MMP14, 15, 16, 24) vagy egy hidrofób régióval, amit egy glikofoszfatidil inozitol (GPI) szakasz köt az enzimhez (MMP17, 25) (35, 36). A GPI doménnek fontos szerepe van a sejt felszíni folyamatok rögzítésében. Az MMP-ok szerkezetét a **3. ábra** szemlélteti (37).

MMP	Egyéb név	Szubsztátok	Lokáció
MMP1	Kollagenáz-1	I és II típusú fibrilláris kollagének	szecernált
MMP2	Zselatináz A	CCL7, CXCL12 kemokinek	szecernált
MMP3	Stromelizin-1	E-kadherin, laminin, IV-es típusú kollagén, látens TGFβ1	szecernált
MMP7	Matrilizin	FasL, látens TNF, E-kadherin, szindekán-1, elasztin,	szecernált
MMP8	Kollagenáz-2	egér CXCL5	szecernált
MMP9	Zselatináz B	fibrin, látens TGFβ1, látens VEGF, NG2 proteoglikán	szecernált
MMP10	Stromelizin-2	-	szecernált
MMP11	Stromelizin-3	-	szecernált
MMP12	Makrofág metalloelasztáz	látens TNF	szecernált
MMP13	Kollagenáz-3	I és II típusú fibrilláris kollagének (?)	szecernált
MMP14	MT1-MMP	pro-MMP2, fibrin, szindekán-1, fibrilláris kollagének,	membránhoz kötött
MMP15	MT2-MMP	fibrin	membránhoz kötött
MMP16	MT-3 MMP	fibrin, szindekán-1	membránhoz kötött
MMP17	MT4-MMP	-	membránhoz kötött
MMP18	Kollagenáz-4	-	-
MMP19	RASI-1	-	-
MMP20	Enamelizin	amelogenin	szecernált
MMP21	XMMP	-	szecernált
MMP22	CMMP	-	membránhoz kötött
MMP23	-	-	membránhoz kötött
MMP24	MT5-MMP	-	membránhoz kötött
MMP25	MT-6 MMP	-	membránhoz kötött
MMP26	Endomeáz, Matrilizin-2	-	-
MMP27	-	-	-
MMP28	Epilizin	-	szekretált

1. Táblázat Gerinces mátrix metalloproteinázok, szubsztátjaik, lokalizációjuk



Nature Reviews | Drug Discovery

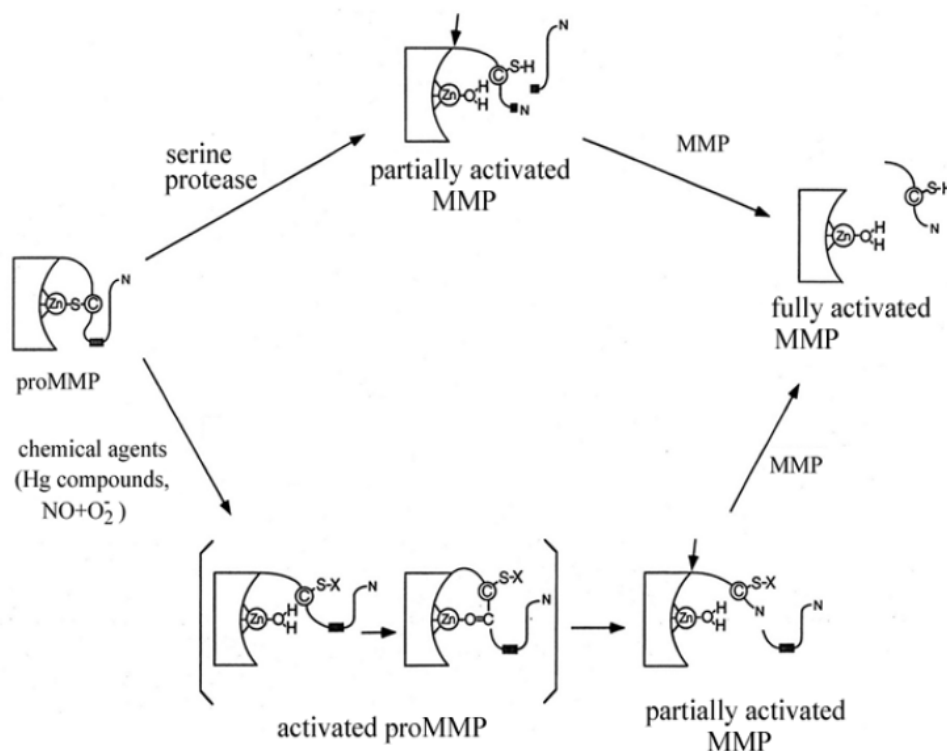
2. *Ábra* A mátrix-metalloproteinázok szerkezeti felépítése (Jialiang Hu et al. Nature Reviews Drug Discovery ,2007)

2.2.1 A mátrix metalloproteinázok szabályozása

Az MMP-ok szabályozása azért fontos, mert ezeknek az enzimeknek a szubsztrát specificitása gyakran átfedő, így az eltérő biológiai funkcióikat elsősorban a megfelelő szabályozás biztosíthatja (**1. Táblázat**). Egészséges szövetben általában nem, vagy csak nagyon alacsony mennyiségben fejeződnek ki, azonban nagy mennyiségben jelennek meg a szöveti szerkezet helyreállításakor, fertőzött, károsodott vagy gyulladt szövetekben, valamint *in vitro* sejt kultúrában nevelt sejtekben. Az MMP-ok termeléséhez a sejtek általában aktivált állapotba kell kerülnie, ennek szabályozása több szinten (transzkripció, kompartmentalizáció, pro-enzim és enzim aktiváció) valósul meg, amit aktivátorok és inhibitorok szabályoznak, amit a

szubsztrátok elérhetősége és affinitása is befolyásol. Az MMP gének transzkripcióját jelátvivő útvonalakon keresztül ellentétes hatású faktorok is szabályozzák (forbol észterek, integrinek, ECM fehérjék, citokinek, növekedési faktorok). Mindezek a stimulusok az MMP gének promóter régiójában fejtik ki hatásukat.

Az MMP-ok proenzim formájában képződnek és katalitikusan inaktív formában vannak jelen, amit a fehérjelánc amino terminális végén található prodomén cisztein maradékának tiol csoportja (SH) és a katalitikus hely cink ionja (Zn^{2+}) közötti kölcsönhatás biztosít. Az aktív proteinázokká való alakulásuk során ez a kapcsolat a prodomén proteolitikus eltávolítása, vagy a cisztein SH-csoport módosításá révén megszűnik (38, 39). A pro-MMP-ok aktiválásának mechanizmusát a **4. ábra** szemlélteti.

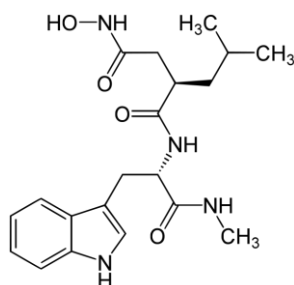


4. Ábra: Az MMP-ok pro-peptid doménjának egy Cys oldallánca kötődik az aktív centrumban lévő Zn ionhoz, aminek eredményeként a fehérje inaktív állapotban marad a kapcsolat megszűnéséig. A DC aktiváció során konformációváltozás, vagy a szerin–proteáz általi hasítás következtében a Cys-Zn kölcsönhatás megszűnik, majd a propeptid rész proteolitikusan lehasad, ami szintén az MMP hasítás eredménye, aminek eredményként az enzim aktív állapotba kerül. (Bauer et al. Mol Cell Biochem, 2003)

Az aktív MMP-ok természetes és mesterséges gátlószerekkel, valamint internalizáció révén is gátolhatók, enzimatis aktivitásuk gátlását a szöveti környezetben a TIMP család tagjai a szintén membránhoz kötődő RECK (reversion-inducing cystein-rich protein with kazal motifs) biztosítja, míg a véráramban az $\alpha 2$ -makroglobulin végzi. A vérben keringő $\alpha 2$ -makroglobulinok a MMP-kkal komplexet képezve inaktíválják az enzimet, az így kialakuló komplexeket a makrofágok receptor közvetített endocitózissal veszik fel. A TIMP családnak jelenleg négy tagja ismert, amelyek 1:1 arányban gátolják az MMP-ok katalitikus doménhez való kötődését (40). A folyamat során a TIMP-ok 5 N-terminális aminosava az MMP-ok aktív centrumához kötődve akadályozzák 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.

2.2.2. A GM6001 szintetikus MMP inhibitor

A GM6001 széles spektrumú szintetikus gátlószer, amely a fémiont igénylő enzimek hatékony inhibitora, a konzervatív fémionnal komplexet képezve fejt 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 szövődményeként kialakuló csont metasztázis csökkentésére is. A GM6001 szerkezeti képletét az **5. ábra** mutatja be. Munkánk során a GM6001 DC-ek fenotípusára és működésére kifejtett hatásának részletes vizsgálatára is kitértünk.



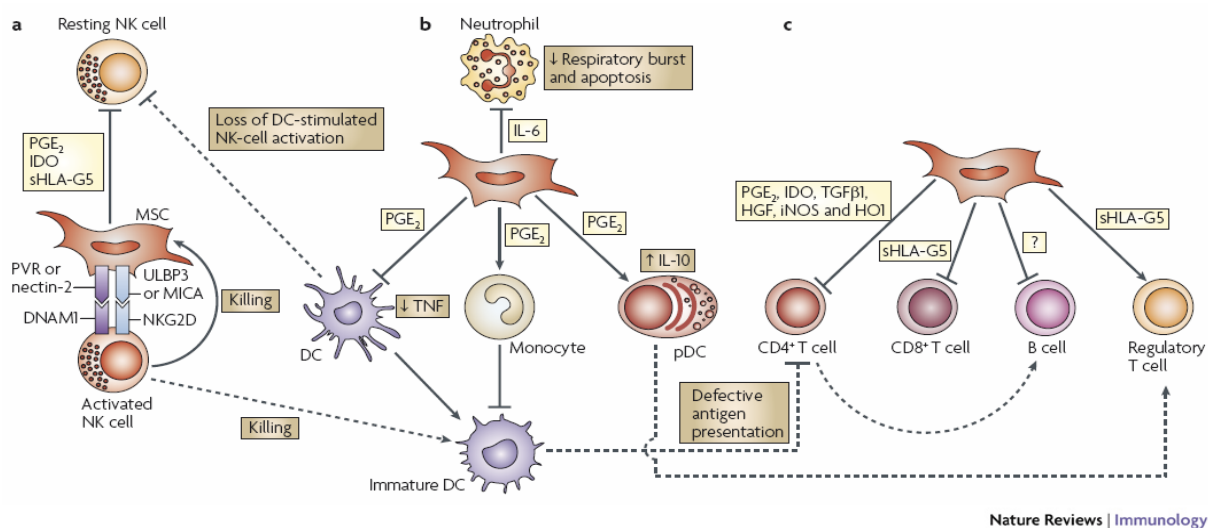
5. Ábra: GM6001 szerkezeti képlete

2.2.3. 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. Irodalmi adatok alapján a DC-ek funkcionálisan aktív MMP-1, 2, 3, és 9, valamint TIMP-1 és 2 fehérjét termelnek (41). A MMP-ok olyan cinkfüggő endopeptidázok, amelyek elsősorban kollagénban gazdag szövetek, elsősorban az ECM megújításában és átalakításában játszanak szerepet, de kiemelt funkciójuk a különböző eredetű sejtek migrációjának szabályozása is. Ismert irodalmi adat, hogy a MMP-ok az immunválasz során felszabaduló számos citokin, kemokin, növekedési faktor és ezek receptorainak proteolitikus hasításáért felelősek, így az MMP-ok közvetlenül képesek szabályozni a jelátviteli folyamatokat (42). 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-ok kifejeződésére, a résztvevő enzimek funkcióira, és az MMP9 szekréciójára.

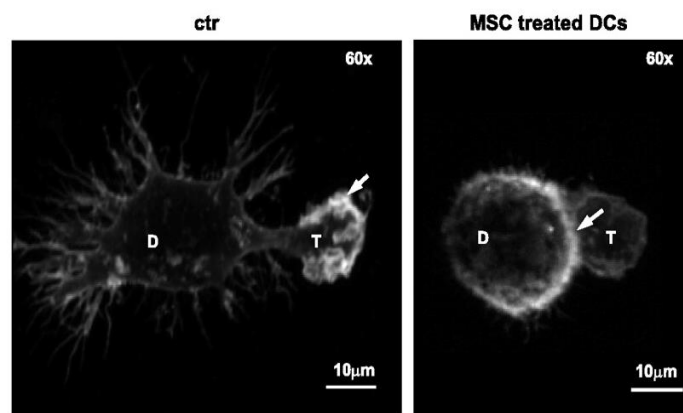
2.3 Az embrionális eredetű mesenchymális stroma sejtek (MSCI) módosítják a monocitából differenciált DC-ek funkcióit

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 (43, 44). Az utóbbi években ezek a szöveti regenerációt, érképződést és immunszuppressziót egyaránt kiváltani képes sejtek a biotechnológiai és sejterápiás eljárások egyik legfontosabb célpontjaivá váltak (45). A klinikai gyakorlatban is felhasználható, jól jellemzett és stabil sejtvonalak alkalmazása azonban még várat magára, mivel a szervezetről izolálható MSC-ek heterogén sejtpopulációt képeznek (46). Az MSC-ek ismert tulajdonsága, hogy képesek a természetes és szerzett immunitás végrehajtó funkcióit egyaránt gátolni.(47).**(6. ábra)**



6. ábra: A mesenchymális stroma sejtek az immunrendszer számos sejtípusának működését befolyásolják (Uccelli et al. Nat Rev Immunol, 2008)

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 (48), ami arra enged következtetni, hogy az MSC-ek hatékonyan használhatóak olyan kórképek kezelésére, amelyekben a szövetszűrés 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 (49), amelynek következtében a DC-ek T-sejt polarizációt kiváltó képessége is megváltozik. (7. ábra).



7. Ábra: A mesenchymális stroma sejtek gátolják a dendritikus sejtek differenciációját, aktivációját és T-sejt polarizációt kiváltó képességét (Aldinucci et al. JI, 2010)

Előzetes eredményeink szerint a HUES9d embrionális őssejtekből megfelelő körülmények között *in vitro* MSC-szerű (MSCI) sejtek differenciálthatók, amelyek a BM-*MSC*-hez hasonló fenotípus sajátosságokkal, morfológiával és differenciációs képességgel rendelkeznek. Ezen tulajdonságaik 5-15 passzálsig stabilan kimutathatók (50).

Hipotézisünk szerint a DC-ek az MSCI sejtek jelenlétében a BM-*MSC*-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. A vizsgálatsorozat keretében áramlási citometria segítségével mértük a DC-ek felszínén kifejeződő CD1a glikolipid prezentáló receptor és a CD83 aktivációs marker, valamint a CD80 és CD86 kostimulációs molekulák kifejeződését, mivel korábbi eredményeink a TNF- α által kiváltott aktiváció ellenére a BM-*MSC* sejtek jelenlétében jelentős gátló hatást mutattak. (51).

Irodalmi adatok alapján az egér embrionális fibroblaszt sejtekből származó *MSC*-ek a DC-ekben a SOCS3 aktivációján keresztül az anti-inflammatorikus hatású IL-10 citokin szekrécióját váltják ki, míg a BM-*MSC*-ek az LPS által aktivált DC-ekben az angionegezisben szerepet játszó IL-6 és CXCL8 szekrécióját fokozzák (53, 54). Ezzel ellentétben az *MSC*-ek gátolják a gyulladásos IL-12, TNF- α , IFN- γ és az I. típusú interferonok által indukált CXCL10 szekrécióját. (55) A fenti eredmények alapján elemeztük a DC-ek által szecernált citokinek és kemokinek koncentrációjának változását MSCI sejtek jelenlétében.

Kutatásaink következő szakaszában a DC-ek migrációját is vizsgáltuk, aminek során először a DC-ek felszínén kifejeződő CCR7 receptor kifejeződésének feltételeit határoztuk meg és azt találtuk, hogy a CCR7 kemokin receptor kifejeződése a DC-ek aktivációja során jelentősen fokozódik, majd a nyirokszövetek által szecernált CCL19 kemokin segítségével az antigénnel feltöltött DC-eket a nyirokcsomók felé irányítja (56). 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 Ca²⁺ koncentráció (14). Az aktivált CCR7^{high}Nav1.7^{low} DC-ek a szövetek közötti hatékony haladás érdekében MMP-ket szecernálnak, amelyeket egészséges szervezetben a TIMP-ek szabályoznak.

A különböző alpopulációkba sorolható DC-ek különböző mértékű MMP és TIMP szekrécióra képesek (57). 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 MHC I és -II molekulák a naív

T-sejtek segítségével bemutatják a feldolgozott fehérje antigéneket (56). Korábbi kutatási eredmények igazolták, hogy a MSC-ek gátolják a DC-ek sejtfelszíni MHC molekuláinak kifejeződését, így a T-sejtek IFN γ szekréciója is csökken a kontroll mintákéhoz képest (58). Munkánk során az MSC1 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 MSC1 sejtek által kifejtett gátló hatást még nem tanulmányozták, így e receptorok génszintű kifejeződését is ellenőriztük.

2. Célkitűzések

Ismert irodalmi adat, hogy a monocitából differenciált 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 MMP-12, valamint a TIMP-1 és TIMP-2 kifejeződésének és az MMP-9 szekréciójának vizsgálata gyulladásos citokínoktól általi aktivációt követően
- A nyugvó és a gyulladásos citokínoktól által aktivált DC-ek CD1⁺ és CD1a⁻ alpopulációiban mérhető MMP-9 és MMP-12, valamint a TIMP-1 és TIMP-2 expressziójának és az MMP-9 szekréciójának jellegzetességei
- A nyugvó és a gyulladásos citokínoktól által aktivált DC CD1⁺ és CD1a⁻ DC-ek által szecernált MMP-9 enzim aktivitásának mérése
- A gyulladásos citokínoktól 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 citokínoktól 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 citokínoktól által aktivált DC-ek CD1⁺ és CD1a⁻ alpopulációinak kemokint indukált migrációjára

A tervezett vizsgálatok lehetőséget adnak a két DC altípus migrációs sajátosságaiban 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 citokinekkel, a poly(I:C) és az 5'ppp RNA által aktivált DC-ek fenotípusos tulajdonságait MSCI 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 felülúszó mintáiban
- A kezelt és nem kezelt DC-ek által aktivált autológ és allogén T-sejtek IFN- γ termelésének mérése enzim kötött immunoszorbens módszerrel
- Az MSCI sejtek jelenlétében differenciáltott 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 MSCI sejtek által gátolt DC-ekben.
- Szecernált MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 mennyiségének mérése a kevert sejt kultúra felülúszó mintáiból
- A RIG-I, MDA-5, LGP-2 receptorokat kódoló gének expressziójának vizsgálata az MSCI sejtek által gátolt DC-ekben

4. Anyagok és módszerek

4.1. 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 Kutatás etikai Bizottsága endegélyezte.

4.2. 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 differenciáltattuk DC-é, az önálló és a kevert kultúrák esetében egyaránt.

4.3. Mesenchymális stróma szerű sejtek izolálása és tenyésztése

A mesenchymális stróma szerű sejtvonalat(MSCI) eredetileg HUES9 pluripotens humán embrionális sejtvonalból differenciáltatták (Douglas Melton, Harvard Medical School), egy korábbi kollaborációs munkánk során Sarkadi Balázs munkacsoportjával (Magyar Tudományos Akadémia, Membránbiológiai Kutatócsoport, Semmelweis Tudomány Egyetem illetve Vérellátó Központ, Budapest) közösen végeztük el e sejtvonal részletes karakterizálását. (Apati et al 2008). A fagyasztott MSCI sejtvonalat opto-mechanikai felületkezelt flaskákban

(TPP, Trasadingen, Svájc) tenyésztettük és passzáltuk, alacsony glükóz tartalmú DMEM tápfolyadékban (Hyclone, South Logan, Utah) L- glutamin, 10% FCS és 1% antibiotikum/ antimikotikum (Hyclone, South Logan, Utah) hozzáadása mellett. Az MSC1 sejteket kísérleteinkhez a 10. passzáznál használtuk fel.

4.4. Kevert kultúra készítése

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 MSC1 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 sejtszeparálás segítségével (Miltenyi Biotech) elválasztottuk a MSC1 sejtektől. A DC209/DC-SIGN a DC-ek $90\% \pm 5\%$ án fordul elő, így a továbbiakban e sejteket tovább vizsgálhattuk az MSC1 sejtektől függetlenül. A kevert kultúrában nevelt sejtek életképességét minden egyes donornál 7AAD festéssel, flow citometriás mérés segítségével ellenőriztük, mert el szeretnénk volna kerülni 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.

4.5. A sejtek aktiválása, GM6001 kezelés

A DC-ek in vitro differenciáltatásának 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 , 5ng/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 μ g/ml poly (I:C)-vel vagy 1 μ g/ml 5'ppp-dsRNA szintetikus liganddal (Invivogen, San Diego, CA, USA) kezeltük.

Az MMP inhibíciós kísérletekben a GM6001 szintetikus MMP inhibitor (Calbiochem) 25 μ M koncentrációban alkalmaztuk. A kontrollokhoz a GM6001 oldószerét, a DMSO-t adtuk. Az 5

napos DC-ket 24 órán keresztül kezeltük, az DC sejt kultúrákhoz az inhibítort az aktivációs kezelés előtt egy órával adtuk hozzá.

4.6. 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 föl vesszük és hozzáadjuk egér anti-humán CD1a-FITC (Beckton Dickinson – BD - Pharmingen) illetve a CD83-PE, CD80-FICT 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.

4.7. 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 ismertett jelölési eljárást követően szeparáltuk. Egyes kísérletekben a steril körülmények között szeparált alpopulációkat tovább tenyésztettük és aktiváltuk a fentebb leírt módon.

4.8. 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-eket (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 aStepOne Software v2.1 (Applied Biosystems) szoftverrel értékeltük ki és ah36B4 háztartási gén génexpressziós értékeihez normalizáltuk.

4.9. 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.

4.10. ELISPOT esszé

Az önállóan illetve MSC1 sejtek jelenlétében nevelt, majd izolált DC-eket szérummentes RPMI tápfolyadékba helyeztük sejttenyésztő 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.

4.11. Sejt migrációs assay

Az önállóan nevelt illetve MSC1 sejtekkel közös kultúrából izolált DC-k migrációját 6.5 mm átmérőű 5 μ m pórus átmérőjű Transwell rendszer segítségével vizsgáltuk (Corning Inc., Glendale, Arizona, USA). A Transwell felső csatornába 2,5x10⁵ DC-et helyeztük RPMI médiumban amely 0,05% BSA (Hyclone, South Logan, Utah) tartalmazott, míg az alsó csatornába a tápfolyadékon kívül amennyiben indukált migrációt kívántunk tesztelni, abban az esetben 200 ng/ml CCL19 kemokint oldottunk. 24 h 37°-on inkubációt követően az alsó csatornába migrált sejteket összegyűjtöttük, és poliszitirén gyöngyöket adunk az egyes

mintákhoz (50 µl) és áramlási citofluoriméterrel meghatározzuk a migrált sejtek számát (Fluka St. Gallen, Switzerland).

4.12. 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.

4.13. 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).

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

5. Eredmények

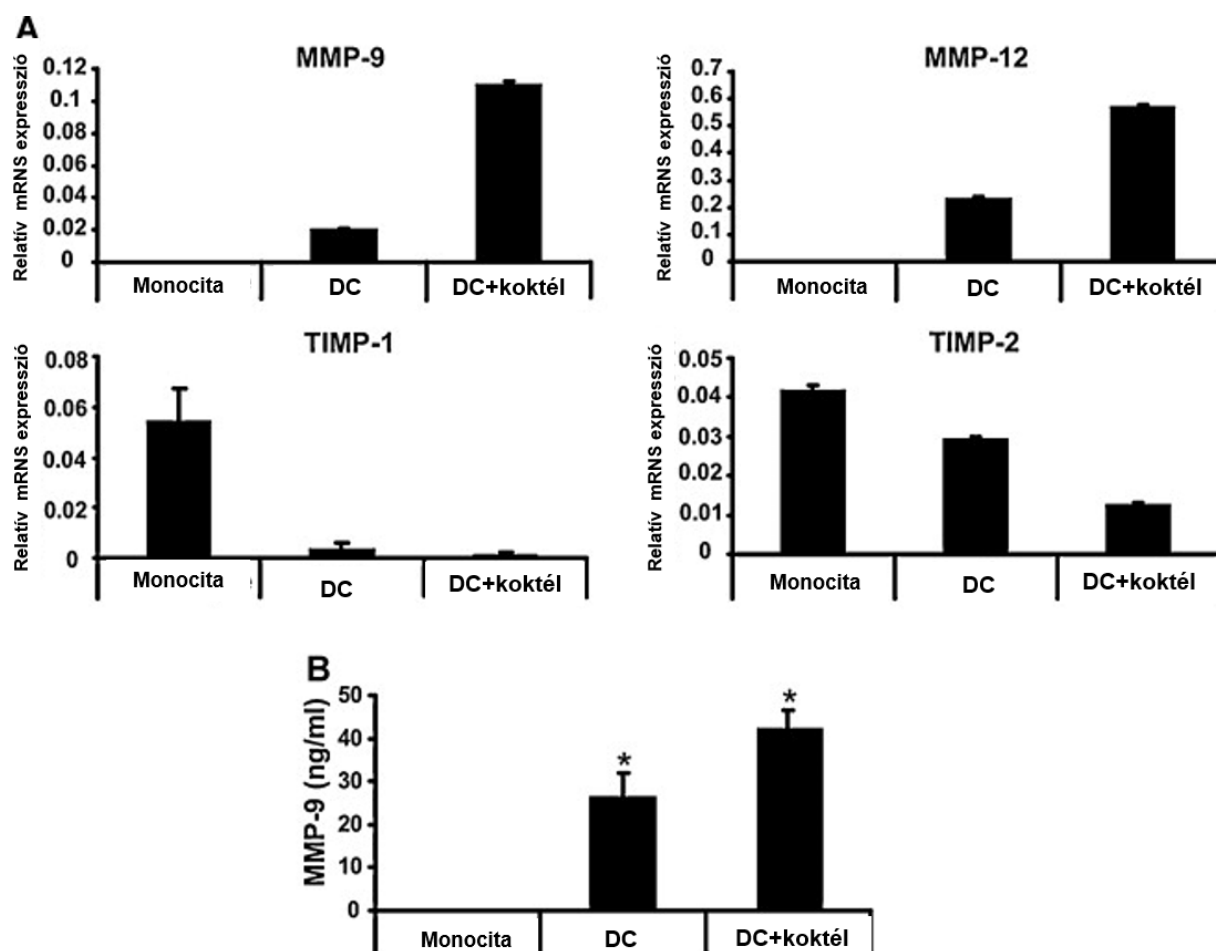
5.1. A mátrix metalloproteináz enzim és inhibitor szerepe monocitákból differenciáltatott nyugvó és aktivált dendritikus sejtek funkcionális sajátosságaira

5.1.1. 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, aminek eredményeként irányított vándorlásra képes sejtekké fejlődnek, miközben helyüket is változtatják. A monocita eredetű DC-ek olyan migrációra képes 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 és 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 (59). 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. A génszintű vizsgálatokat RT-qPCR módszerrel, az MMP-9 fehérjeszintű vizsgálatát ELISA kit segítségével végeztük.

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 (**5.1. A. ábra**). 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 koktéllal aktivált DC-ekben tovább növekedett (5.1. B. ábra).

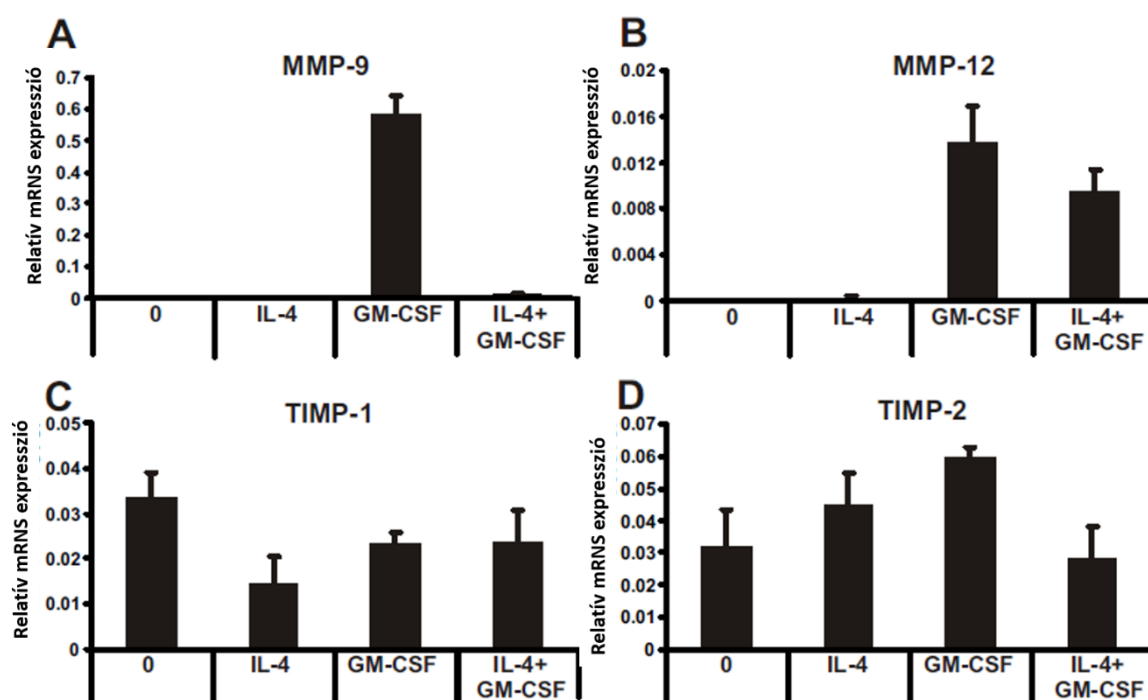


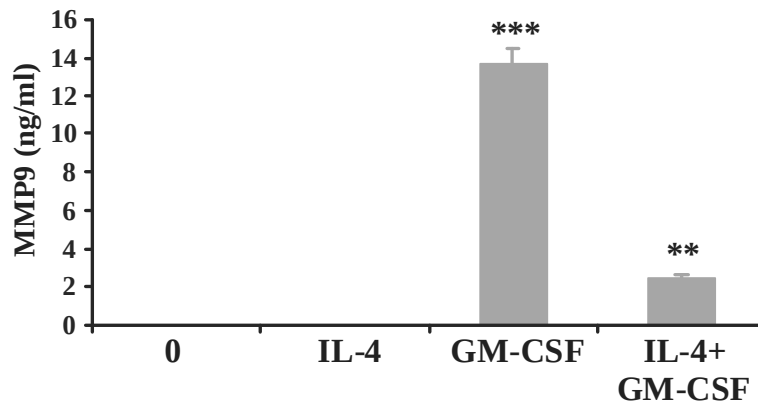
5.1. ábra A: Az MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2 génexpressziójának vizsgálata monocitákban, monocitákból differenciáltatott nyugvó DC-ben és gyulladásos citokinkoktéllal aktivált DC-ben. Egy - egy tipikus qPCR kísérlet bemutatása 3 donor vizsgálata alapján amelyek szignifikanciája: $p \leq 0,05$ Student T próba, SEM

B: Az MMP-9 fehérje szekréciójának vizsgálata ELISA módszerrel: $n=3$, Student T próba, SEM

5.1.2. 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 proteínázokat 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 e gének kifejeződésének elindításáért vagy gátlásáért. Ebből a célból a monocitákat 24 órán át citokin mentes 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 (5.2.A.ábra). A génexpressziós kísérletek eredményeit alátámasztva az MMP9 fehérjeszintű megjelenését a GM-CSF nagymértékben fokozta, míg az IL-4 gátolta (5.2. B. ábra).

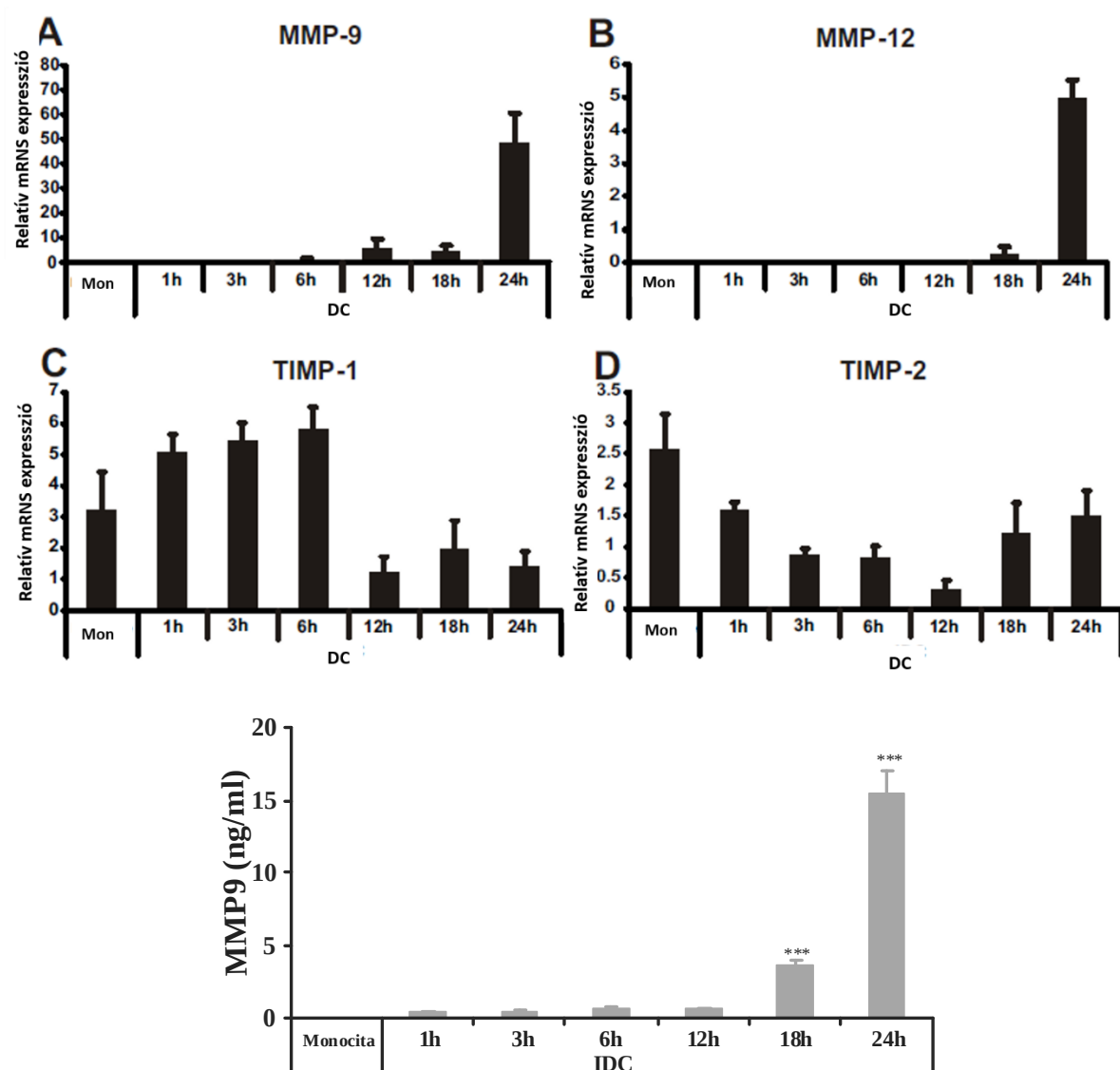




5.2. ábra A: Az interleukin-4 és a GM-CSF hatása a mátrix metalloproteinázok és a szöveti mátrix metalloproteináz inhibitor gének expressziójára. Egy - egy tipikus qPCR kísérlet bemutatása 3 donor vizsgálata alapján amelyek szignifikanciája: $p \leq 0,05$ Student T próba, SEM **B:** Az IL-4 és GM-CSF hatása az MMP-9 fehérje kifejeződésének vizsgálata ELISA módszerrel: $n=3$, Student T próba, SEM

5.1.3. 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 (**5.3.A ábra**), míg az MMP-12 a nyugvó DC-kben a kezelést követő 18 óra után mutatható ki (**5.3. B ábra**). 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 (**5.3.C ábra**), míg a TIMP-2 gén folyamatos csökkenését követően 18 órával kismértékben újra emelkedett, de mértéke nem érte el a monocitákban tapasztalt értéket (**5.3. D ábra**). Összhangban a génexpressziós mérésekkel, az MMP9 fehérje szekrécija a citokin kezelés után 18 órával jelentősen nőtt (**5.3. E ábra**).

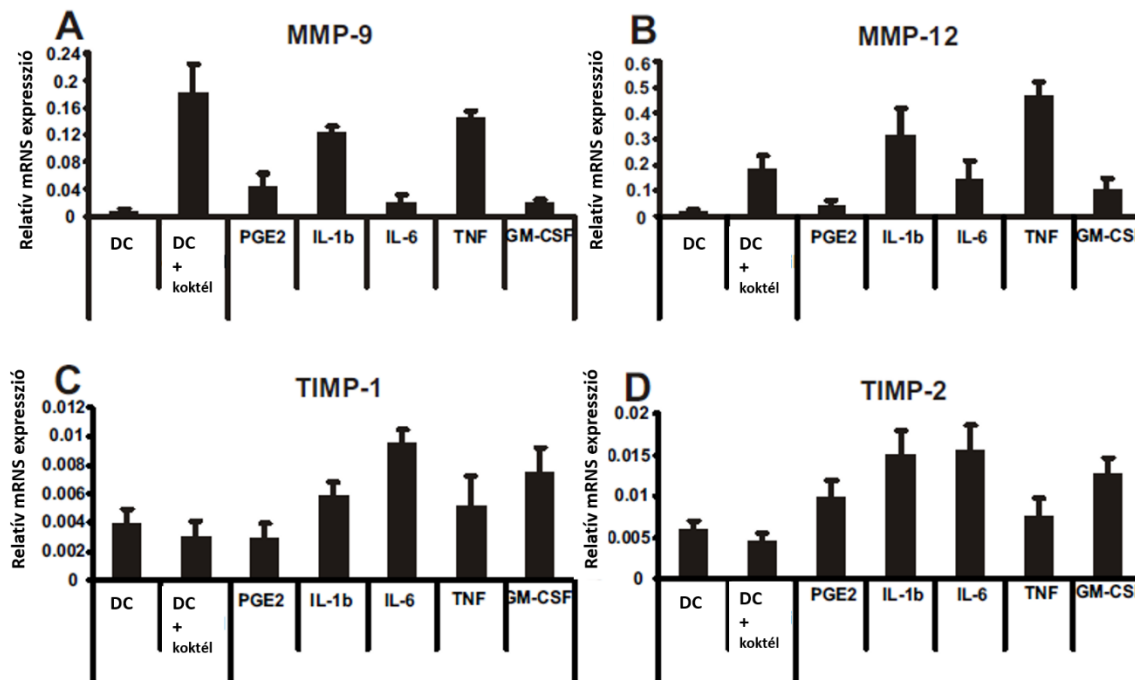


5.3. ábra: A mátrix metalloproteinázok és a TIMP inhibitor gének expressziójának időbeli változása IL-4 és GMCSF hatására. **A:** MMP9, **B:** MMP12, **C:** TIMP1, **D:** TIMP2. Egy - egy tipikus qPCR kísérlet bemutatása 3 donor vizsgálata alapján amelyek szignifikanciája: $p \leq 0,05$ Student T próba, SEM **E:** Az MMP9 fehérje szekréciónak időbeli változása IL-4 és GM-CSF hatására. $n=3$, Student T próba, SEM

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

A nyugvó DC-ekhez viszonyítva a gyulladásokeltető 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 gyulladásokeltető 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 (5.4. ábra).

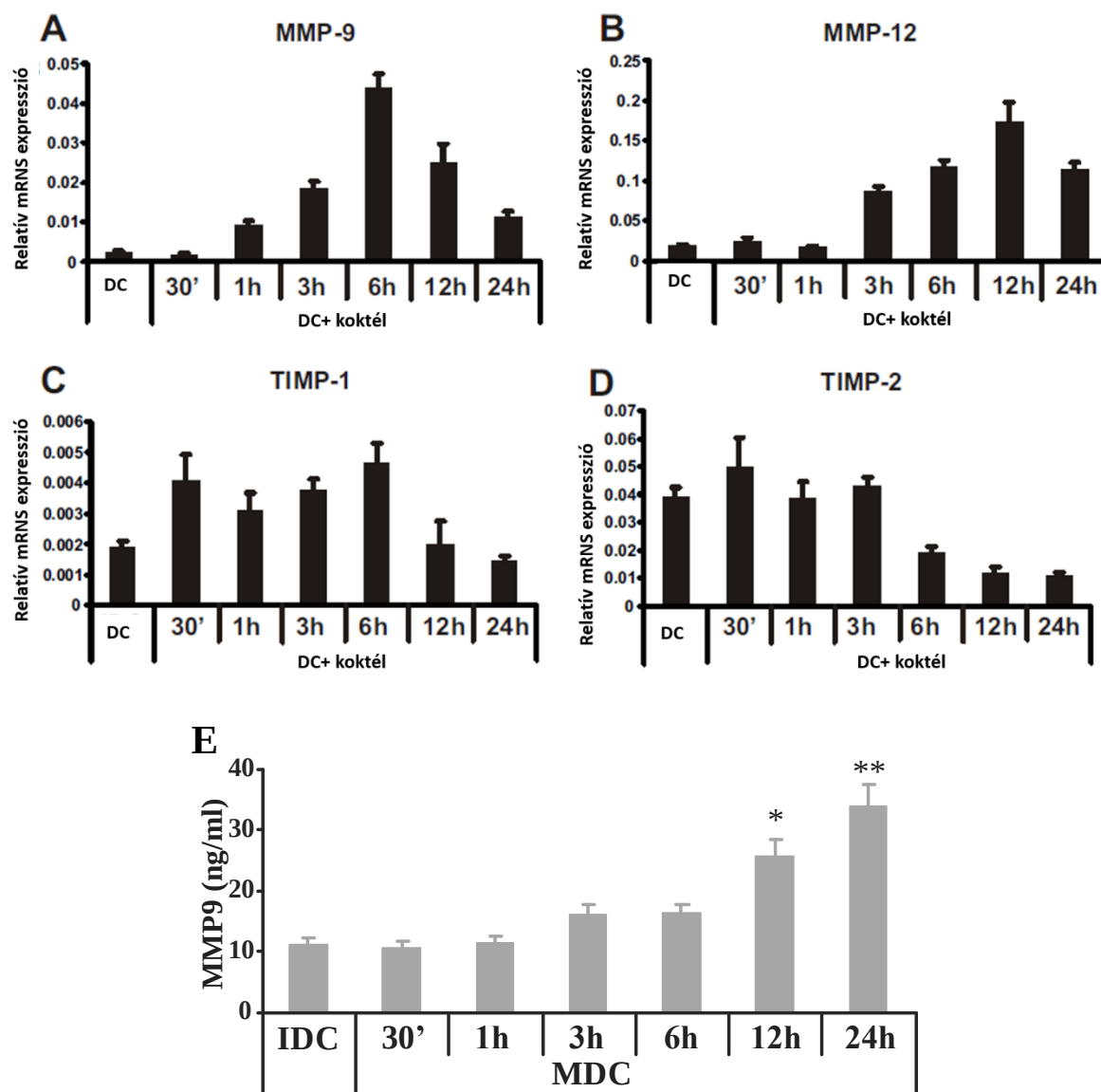


5.4. ábra: A mátrix metalloproteinázok és a szöveti mátrix metalloproteináz inhibitorok expressziójának változásai a citokinkoktél összetevői és a teljes gyulladásos koktél hozzáadását követően 24 órával A: MMP9, B: MMP12, C: TIMP1, D: TIMP2. Q-PCR: Egy-egy tipikus qPCR kísérlet bemutatása 3 donor vizsgálata alapján amelyek szignifikanciája: $p \leq 0,05$ Student T próba, SEM

5.1.5. 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-ket 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 eredményeket az 5.5. ábra mutatja be, aminek 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. (5.5 E Ábra)

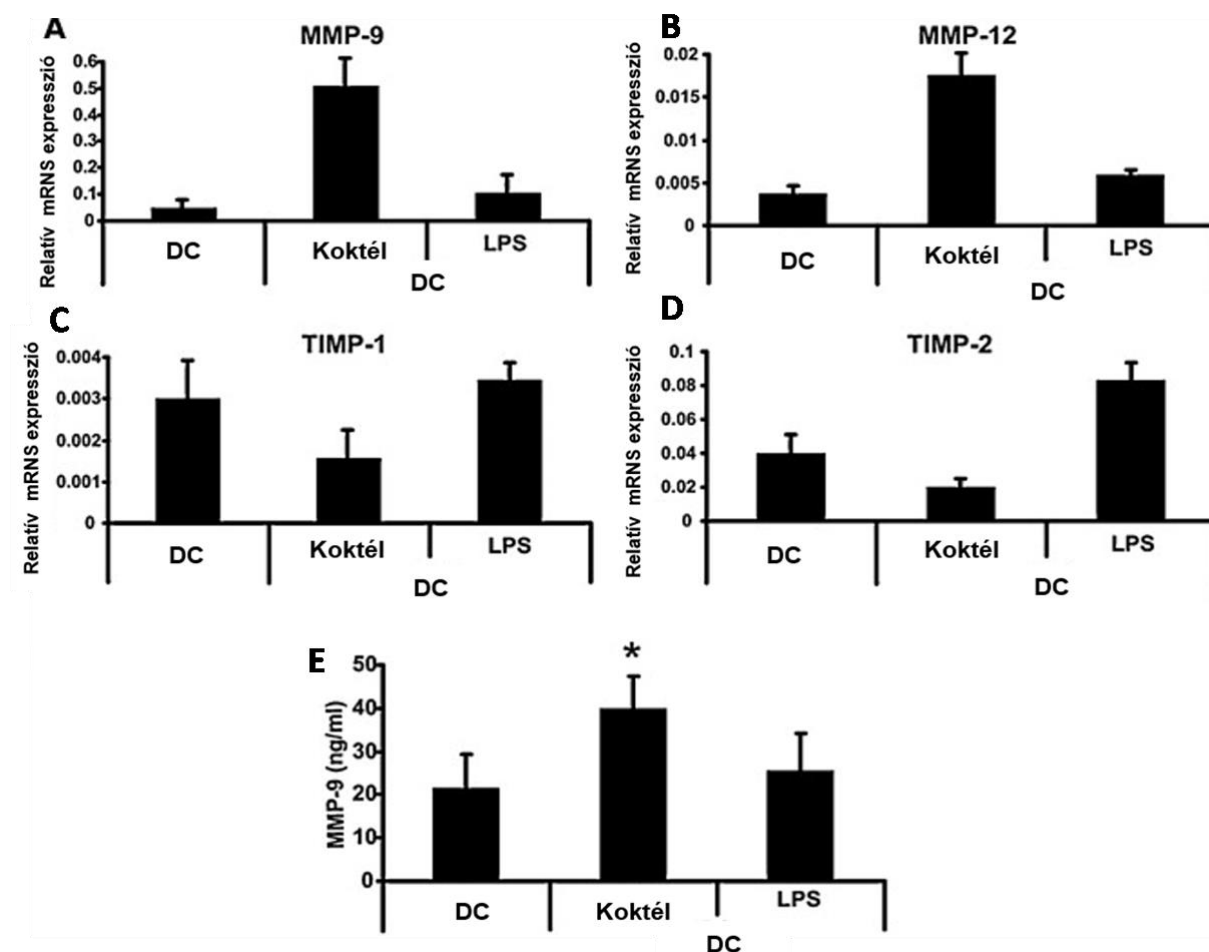


5.5. ábra: A mátrix metalloproteinázok és a szöveti mátrix metalloproteináz inhibitorok génexpressziójának időbeli változása gyulladásos citokin koktél hatására. **A:** MMP9, **B:** MMP12, **C:** TIMP1, **D:** TIMP2, Egy - egy tipikus qPCR kísérlet bemutatása 3 donor vizsgálata alapján amelyek szignifikanciája: $p \leq 0,05$ Student T próba, SEM **E:** Az MMP9 fehérje szekréciónak időbeli változása gyulladásos koktél hatására. $n=3$, Student T próba, SEM

5.1.6. 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 MMP-9 és az MMP-12 gének expresszióját, mint a gyulladásos citokin koktél. A TIMP-1 és a TIMP-2 gének kifejeződését az LPS a koktéllal ellentétes módon befolyásolta, az DC-hez képest tovább növelve e gének expresszióját (5.6.A, B, C, D ábra).

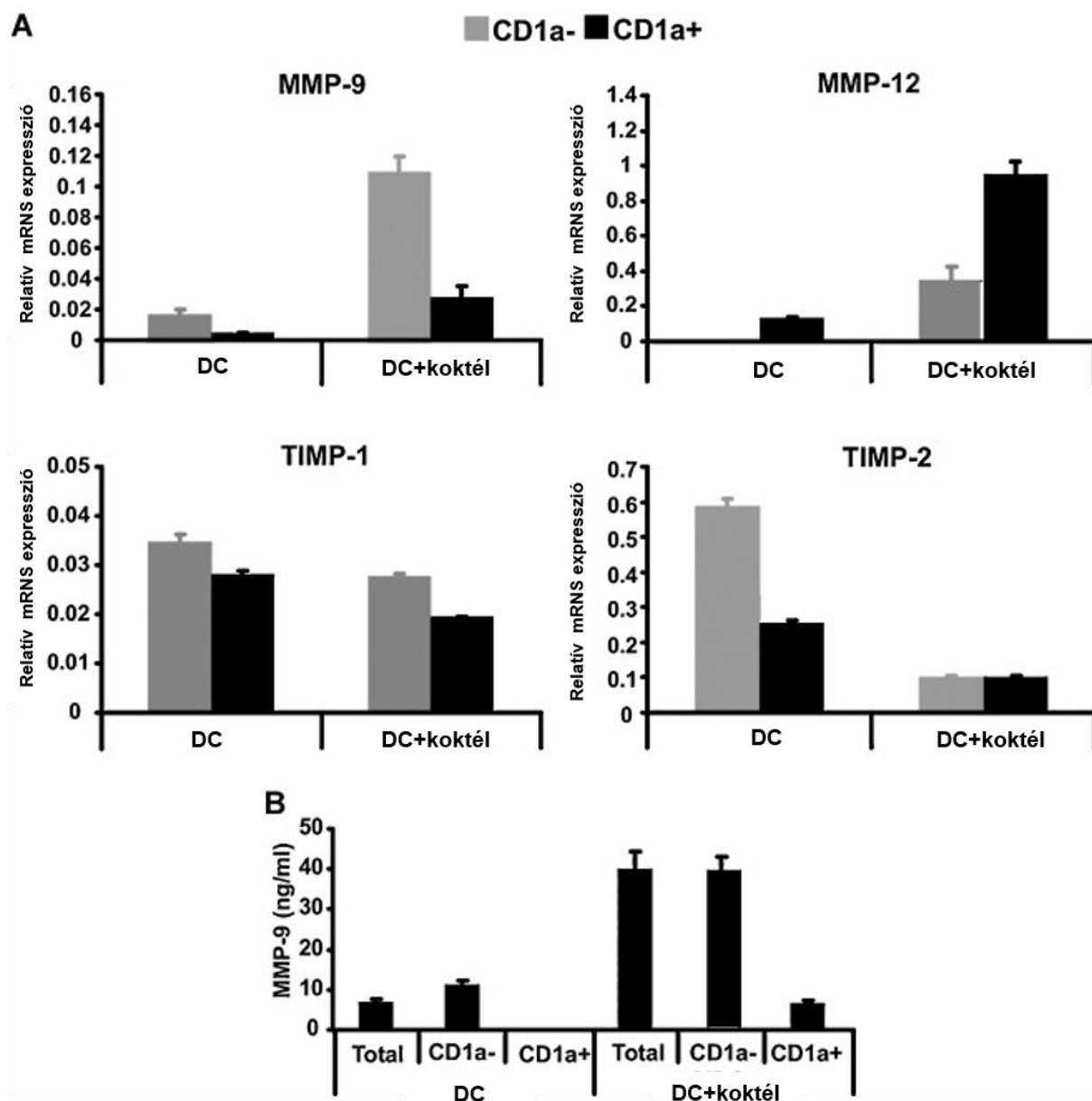
A gyulladásos koktél és az LPS MMP-9 fehérje szekrécióra kifejtett hatását is megvizsgáltuk, az eredményeket az 5.6. E ábrán összegeztük. A fehérjeszintű vizsgálatok alátámasztották a génexpressziós mérések eredményeit, amennyiben az LPS kisebb mértékben emelte az MMP-9 expressziót, mint a gyulladásos koktél.



5.6. Ábra: A gyulladásos citokin koktél és az LPS hatása a mátrix metalloproteinázok és a szöveti mátrix metalloproteináz inhibitorok kifejeződésére mRNS szinten **A:** MMP9, **B:** MMP12, **C:** TIMP1, **D:** TIMP2. Egy - egy tipikus qPCR kísérlet bemutatása 3 donor vizsgálata alapján amelyek szignifikanciája: $p \leq 0,05$ Student T próba, SEM **E-** A gyulladásos citokin koktél és az LPS hatása a mátrix metalloproteináz-9 szekréciójára. ELISA: 3 donor átlagértéke $n=3$, Student T próba, SEM ábrázolása

5.1.7. 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 felülűszókat ELISA és Innozyme módszerek segítségével analizáltuk. Az **5.6. ábrán** bemutatott eredmények alapján 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 kifejezetten, de elsősorban a CD1a⁻ alpopulációban voltak jelen (**5.7. Ábra**). Az MMP9 fehérje kiválasztását a CD1a⁻ és CD1a⁺ DC alpopulációk felülűszó mintáiban ELISA módszerrel is meghatároztuk (**5.7. B. ábra**). 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.

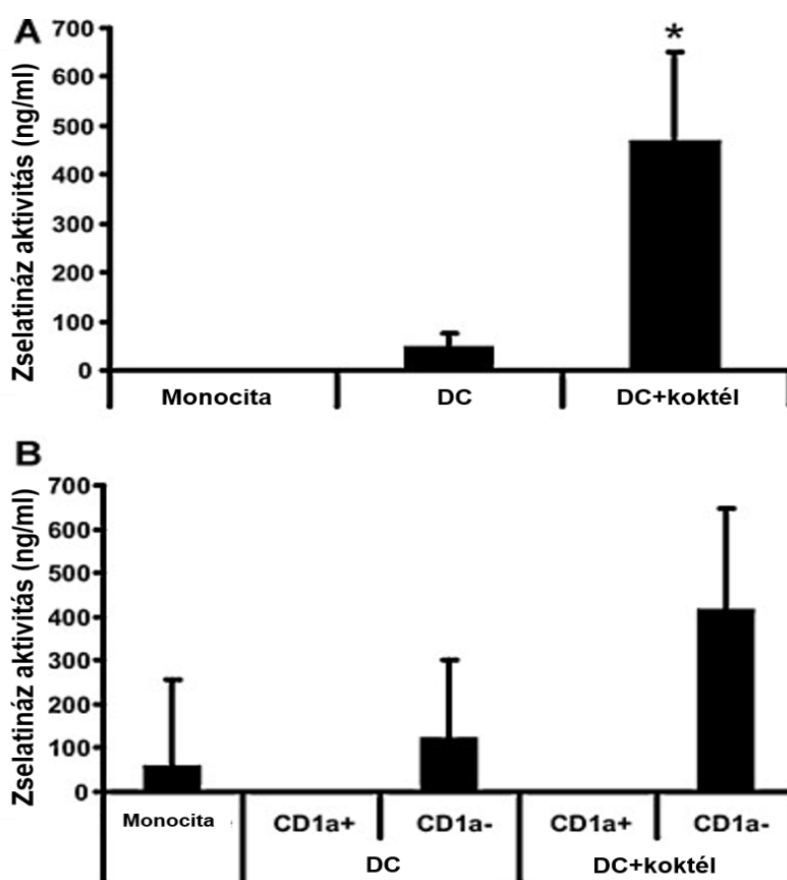


5.7. ábra A: A monocitákból differenciáltatott éretlen és érett dendritikus sejtek CD1a⁻ és CD1a⁺ alpopulációinak mátrix metalloproteináz és inhibitorainak génexpressziós mintázata. Egy - egy tipikus qPCR kísérlet bemutatása 3 donor vizsgálata alapján amelyek szignifikanciája: $p \leq 0,05$ Student T próba, SEM

B: A monocitákból differenciáltatott nyugvó és aktivált dendritikus sejtek CD1a és CD1a⁺ alpopulációinak mátrix metalloproteináz 9 termelése. Q-PCR: egy tipikus kísérlet ábrázolása $n=3$, ELISA: 3 donor átlagértéke $n=3$ Student T próba, SEM

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

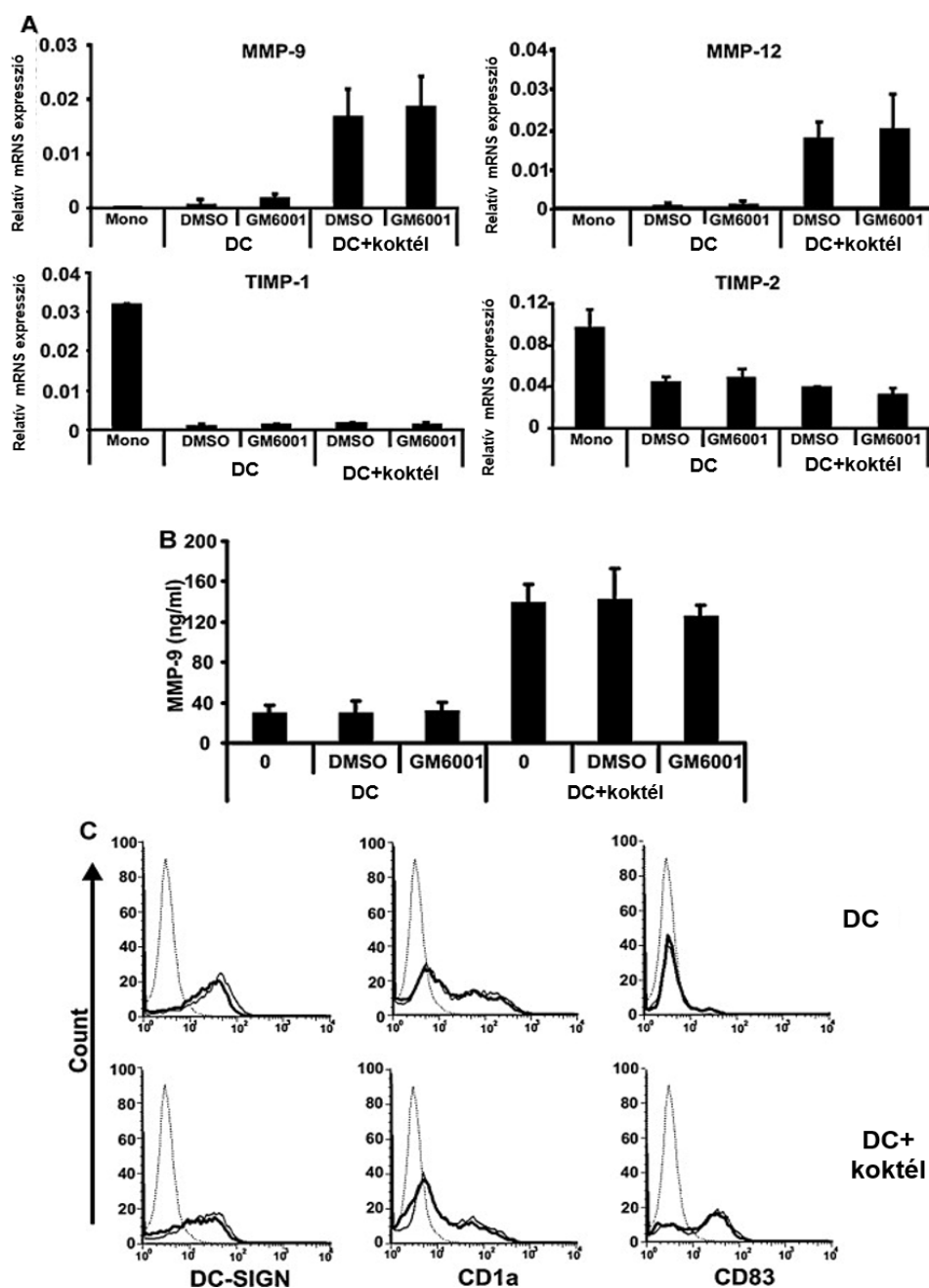
Eredményeinket a sejtek felülűszójából mért zselatináz aktivitás méréseivel is alátámasztottuk. Ebből a célból az Innozyme Kit leírásának megfelelően specifikusan aktiváltuk az MMP-9 enzimet, majd a szubsztrát bontásából keletkező színváltozást detektálva kimutattuk, hogy az DC-ek felülűszójában mérhető enzimaktivitás magasabb, mint a monociták vagy DC-ek felülűszójában mért értékek (5.8. A. ábra). A szétválasztott sejtek felülűszójából mért MMP9 enzimaktivitás a CD1a⁻ nyugvó és az aktivált DC-kben egyaránt magasabbnak bizonyult (5.8. B. ábra).



5.8. ábra A: A sejtek felülűszójából kimutatható zselatináz (MMP-9) enzimaktivitás változása a monocita – nyugvó DC – aktivált DC differenciáció során. **B:** A nyugvó és az aktivált CD1a⁺ és CD1a⁻ DC-ek zselatináz aktivitása. Enzimaktivitás mérés: 3 donor átlagértéke, n=5 Student T próba, SEM

5.1.9. 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-eket 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. Eredményeinket az **5.9. C. ábrán** mutatjuk be. Az eredmények azt mutatták, hogy a GM6001 kezelés nem befolyásolta a DC-ek sejtfelszíni fehérjeinek expresszióját és gén szintű vizsgálatokkal is alátámasztottuk azt az eredményt, hogy a GM6001 inhibitor hozzáadása nem befolyásolta az MMP-ok és TIMP-ek expresszióját (**5.9. A. ábra**). A sejtek felülúszójából mért MMP9 fehérje koncentrációk értékei megerősítették a fenti eredményeket (**5.7. B. ábra**).

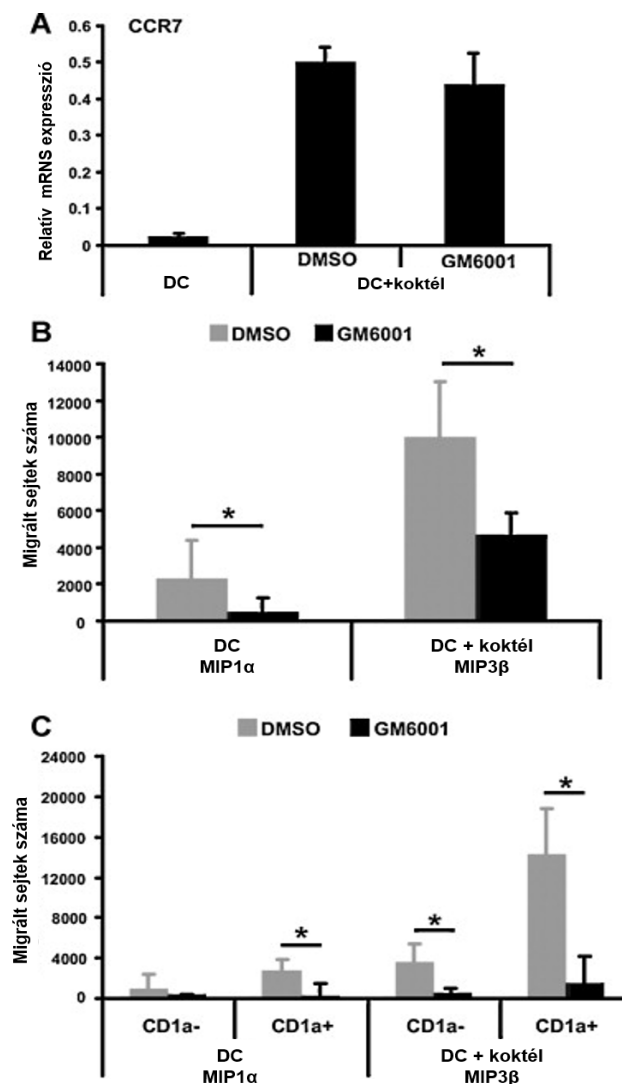


5.7. ábra A: A monocitákból differenciáltatott dendritikus sejtek MMP9, MMP12, TIMP1, és TIMP2 génexpressziós mintázata DMSO és GM6001 inhibitor kezelés hatására, és a monocitákból differenciáltatott dendritikus sejtek mátrix metalloproteináz 9 termelése (**B**).

C: CD209/DC-SIGN, CD1a és CD83 sejtfelszíni fehérjék kifejeződése. Q-PCR: Egy - egy tipikus qPCR kísérlet bemutatása 3 donor vizsgálata alapján amelyek szignifikanciája: $p \leq 0,05$ Student T próba, SEM ELISA: 3 donor átlagértéke, $n=3$ áramlási citometria: egy tipikus kísérlet $n=3$ **B:** A monocitából differenciáltatott nyugvó és aktivált dendritikus sejtek CD1a és CD1a⁺ alpopulációinak MMP- 9 termelése. ELISA: 3 donor átlagértéke $n=3$ Student T próba, SEM

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

A DC-ek jellemző sajátossága a migrációs képesség, amiben az MMP-knek és TIMP-knek fontos szerepe 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 (**5.10.A ábra**). A sejtek migrációját Transwell rendszerben is vizsgáltuk, az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtak szerint. Eredményeink alapján a GM6001 hatékonyan csökkenti a nyugvó és aktivált DC-ek kemokin indukálta vándorlását (**5.10.B ábra**), ami a CD1a⁻ és a CD1a⁺ DC alpopulációk esetében egyaránt érvényesül (**5.10.C ábra**).

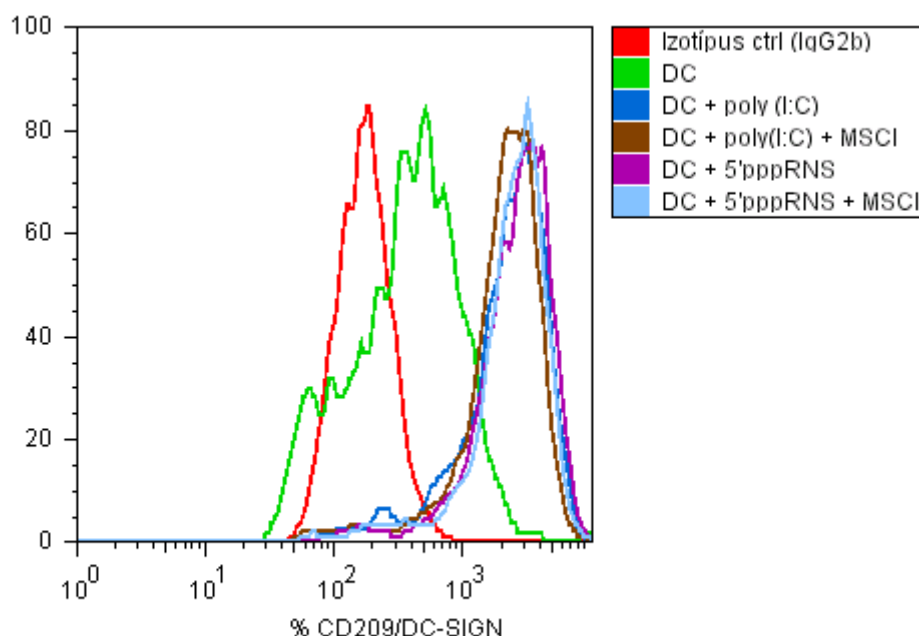


5.10. ábra: **A:** Az aktivált DC-ek CCR7 expressziója DMSO és GM6001 kezelést követően
B: A nyugvó és az aktivált DC-ek kemokin indukált migrációja DMSO és GM6001 szintetikus inhibitor jelenlétében. **C:** A nyugvó és az aktivált DC-ek CD1a⁻ és CD1a⁺ alpopulációinak kemokin indukált migrációja DMSO és GM6001 szintetikus inhibitor jelenlétében. **A:** Q-PCR: egy tipikus kísérlet ábrázolása n=3, B-C: Transwell: egy tipikus kísérlet ábrázolása n=3
 Student T próba, SEM

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

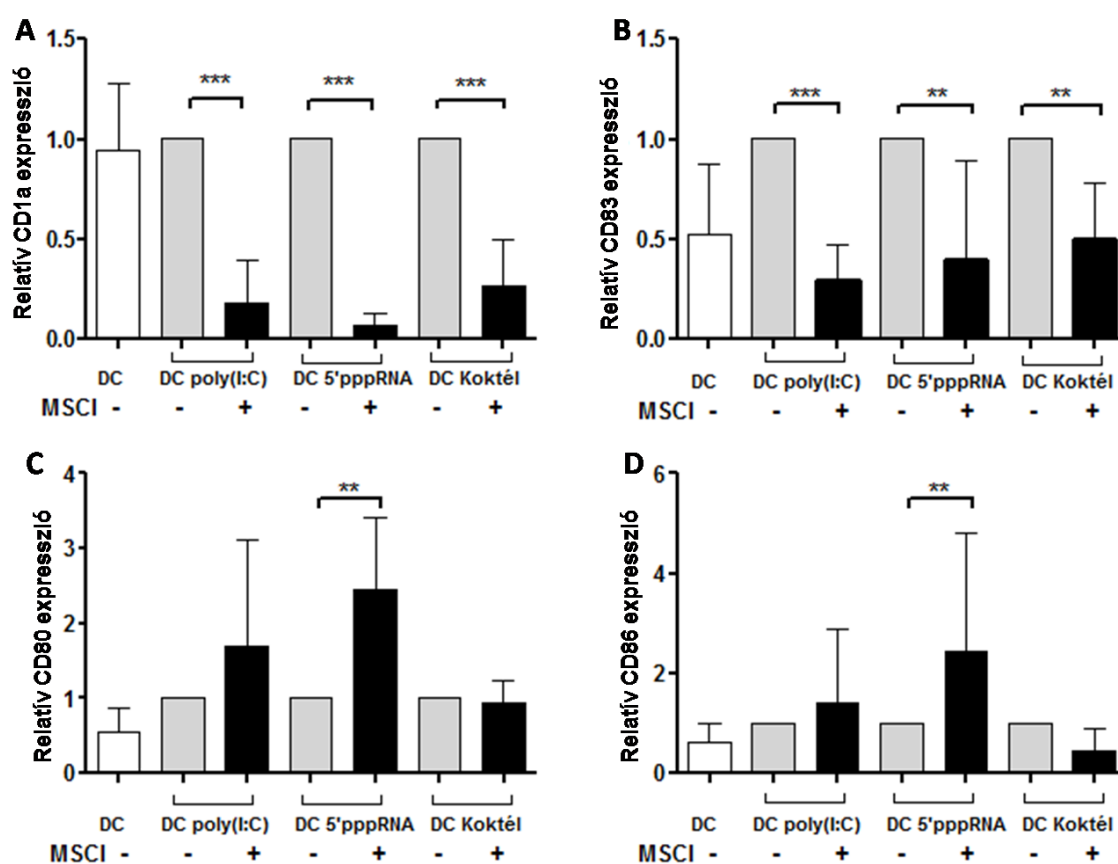
5.2.1. Az MSCl sejtek gátolják a monocita eredetű DC-ek differenciációját és aktivációját

A frissen izolált CD14⁺ monocitákat 5 napon keresztül IL-4 és GM-CSF hozzáadása mellett (kontroll), illetve MSCl sejtek jelenlétében (DC : MSCl = 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 MSCl sejtek jelenlétében a monociták in vitro DC-ekké differenciálódtak (**5.11. ábra**).



5.11. ábra Az önállóan és MSC1 sejtek jelenlétében nevelt DC-ek CD209/DC-SIGN kifejeződése. Egy reprezentatív donor ábrázolása.

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 (5.12. A ábra) és a CD83 aktivációs marker (5.12. B ábra) 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 (5.12. C ábra) és a CD80 (5.12. D ábra) 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.

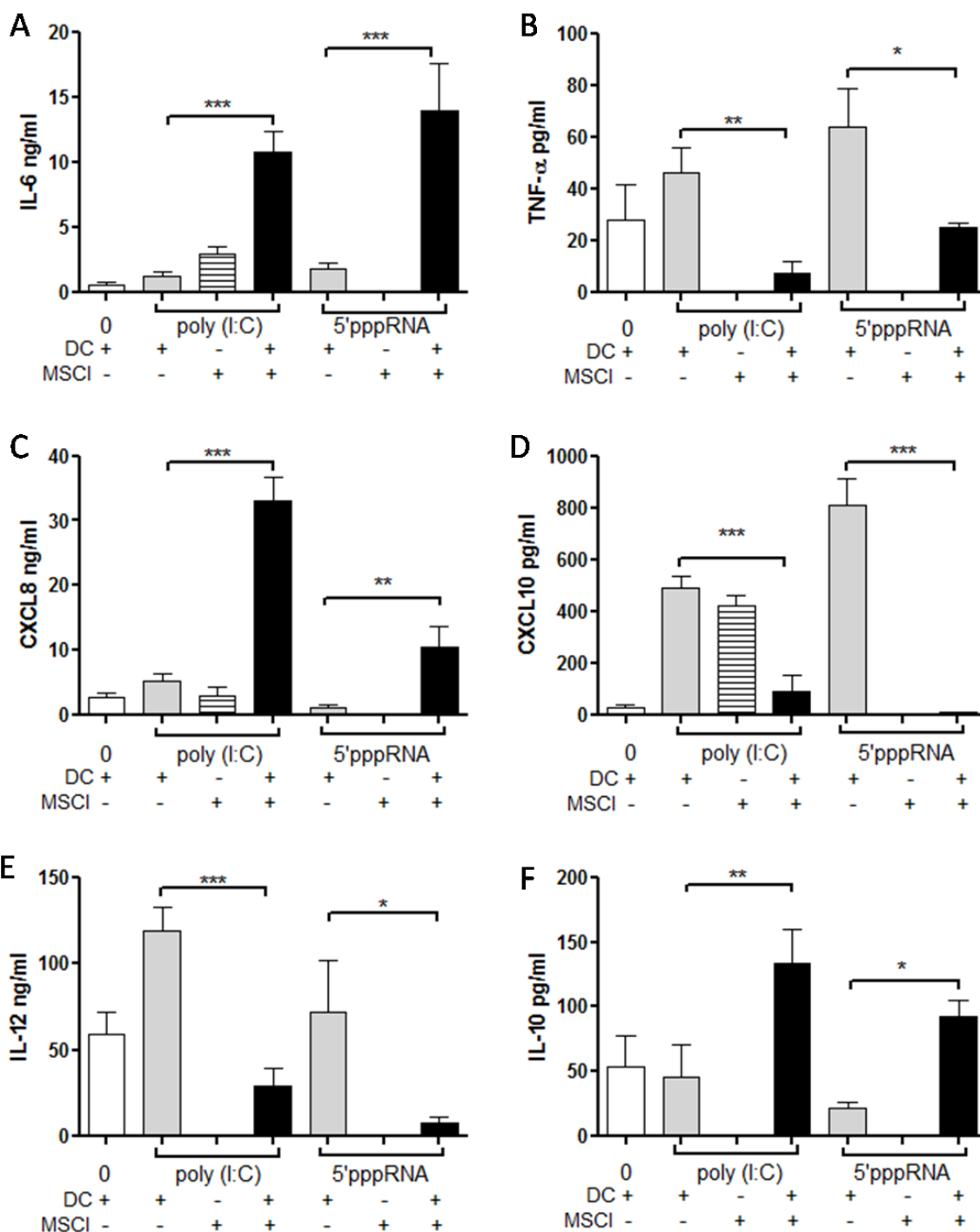


5.12. Ábra A CD1a (A), CD83 (B), CD80 (C), CD86 (D) relatív expressziójának átlaga nyugvó (fehér oszlop), aktivált (szürke oszlop) és MSC1 sejtek jelenlétében tenyésztett (fekete oszlop) DC-ekben. Az ábrán a sejtfelszíni expresszió változásának mértékét ábrázoltuk az aktivált DC-

ekben mért értékek átlagához viszonyítva, amit 1-nek vettünk (n=4). ANOVA/ Bonferroni post-hoc teszt, az ábráinkon SD+ értéket ábrázoltunk.

5.2.2. Az MSCl sejtek befolyásolják az aktivált DC-ek citokin és kemokin szekrécióját

A DC-ek és az MSCl sejtek együttműködésének további tanulmányozása érdekében az együtt tenyésztett sejteket poly (I:C) és 5'pppRNS segítségével aktiváltuk és a felülúszó 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 (**5.13. A ábra**), a CXCL8 (**5.13. C ábra**) és az IL-10 (**5.13. E ábra**) 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 MSCl sejtek nem termeltek IL-10-et (**5.13. E ábra**). A DC-MSCl sejtek együttműködéséből származó emelkedett mennyiségű anti-inflammatorikus IL-10 gátolja a proinflammatorikus citokinek szekrécióját, ami az MSCl sejtek által kifejtett hatás egyik fontos mozzanata. A fenti eredménnyel összhangban a gyulladásos TNF- α citokin (**5.13. B ábra**), a CXCL10 kemokin (**5.13. D ábra**) és a T-sejt polarizáció kiváltásáért felelős IL-12 citokin (**5.10. F ábra**) szekréciója az MSCl sejtek jelenlétében csökkent. A DC-ek által termelt IL-12 a gyulladás során nemcsak az IFN- γ termelő CD4⁺ T- limfociták klonális expansziójának illetve differenciációjának kiváltásáért felelős, hanem a DC-ek TNF- α , IFN- γ és interferon indukálta CXCL10 szekréciójának fokozásáért is. Kísérleti rendszerünkben az MSCl 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 (**5.13. A ábra**) és a CXCL8 (**5.13. C ábra**) 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 MSCl sejtek gyulladáscsökkentő hatásuk mellett a szöveti megújulásában és a sebgyógyulásban is szerepet játszhatnak.

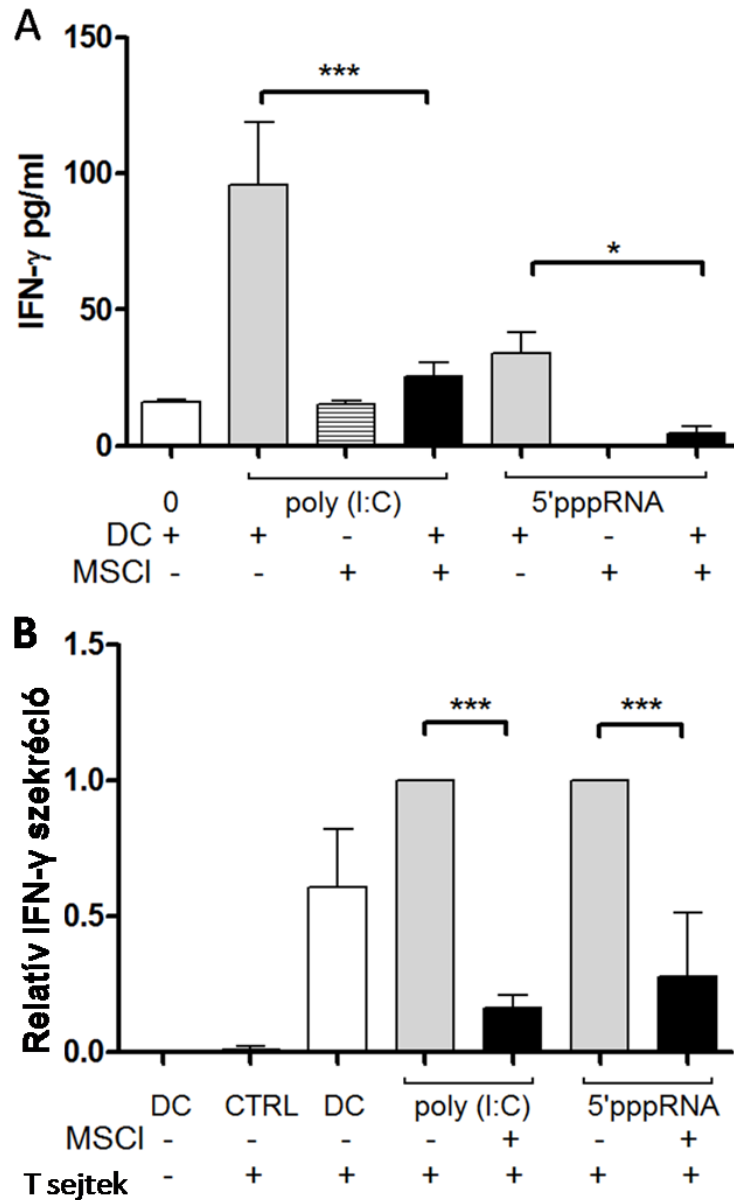


5.13. ábra A nyugvó, aktivált és kevert kultúrában tenyésztett DC-ek citokin és kemokin szekréciója. Az önálló és a kevert kultúrában 24 órán át tartó sejtenyésztést követően a poly(I:C) és 5'pppRNS aktiválást követő 6. napon a citokinek és kemokinek szekréciója a nyugvó (fehér oszlop), az aktivált (szürke oszlop) DC-ek, a poly(I:C) vagy 5'pppRNS kezelt MSCI sejtek (csíkos oszlop), valamint a kevert kultúrából származó sejtek (fekete oszlop) esetében is változott, amit a felülészóban ELISA módszer segítségével 5 donor mintáiban a

citokin koncentrációk átlaga alapján detektáltunk: IL-6 (A), TNF- α (B), CXCL8 (C), CXCL10 (D), IL-12 (E), IL-10 (F). ANOVA/ Bonferroni post-hoc teszt, az ábráinkon SD+ értéket ábrázoltunk.

5.2.3. 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 (**5.14. A ábra**). 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 differenciáltatott DC-ek szignifikánsan kisebb mértékű indukcióra voltak képesek (**5.14. B ábra**). Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a DC-ek az MSC1 sejtek jelenlétében anti-inflammatorikus szöveti környezetet képesek kialakítani.



5.14. ábra A: Az aktivált DC-ek és a DC-ek által indukált T-limfociták IFN- γ szekréciója

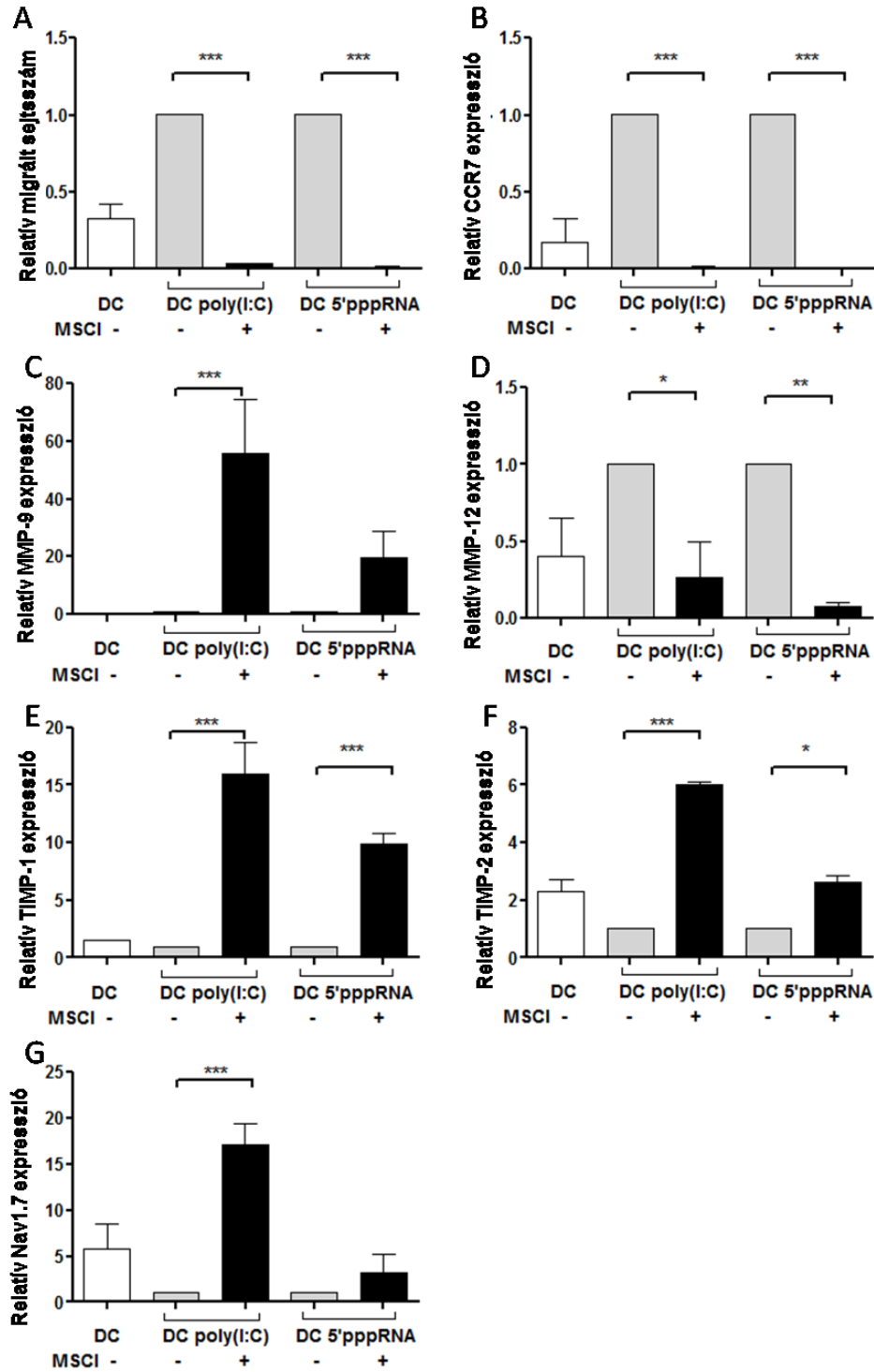
Az aktivált DC-ek IFN- γ szekréciója MSCI sejtek jelenlétében és azok hiányában. Az ábra tematikája azonos az 5.10. ábráéval. **B:** Az önállóan vagy 5 napon át MSCI sejtekkel együtttenyésztett majd izolált DC-eket 3 napig allogén T-limfocitákkal neveltük tovább. A grafikon a nyugvó DC-ek + T-limfociták (fehér oszlop), a poly(I:C) és 5'pppRNS által aktivált + T-limfociták (szürke oszlop, illetve MSCI sejtek jelenlétében nevelt aktivált DC-ek + T-limfociták (fekete oszlop) IFN- γ szekrécióját mutatja. A grafikonon a sejtek IFN- γ szekréció változásainak mértékét ábrázoltuk az aktivált DC+ T-limfocita IFN- γ szekréciójának átlagához hasonlítva, amely értéket 1-nek vettünk (n=4) ANOVA/ Bonferroni post-hoc teszt, az ábráinkon SD $\pm$ értéket ábrázoltunk.

5.2.4. Az MSCl sejtek gátolják a DC-ek migrációját

Irodalmi adatokból ismert, hogy a sikeres antigén prezentáció előfeltétele a DC-ek irányított vándorlása a közeli nyirokcsomókba (28, 33, 34). 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 (32). Kísérleteink során transwell rendszerben vizsgáltuk az MSCl sejtek hatását a DC-ek vándorlására. A vizsgálatban a korábbiaknak megfelelően tenyésztettük, majd poly(I:C)-vel és gyulladásos koktéllal aktiváltuk a DC-eket az MSCl 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 csatornától, 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 gyulladásos koktéllal aktivált DC-ek migrációját a MSCl sejtekkel történő együttenyésztés szignifikánsan gátolta (**5.15.A ábra**). A fenti eredménnyel összhangban az MSCl sejtekkel együtt tenyésztett és aktivált DC-ek CCR7 kemokin receptor expressziójának csökkenését is kimutattuk (**5.15. B ábra**).

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 MSCl 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 (**5.15. C ábra**) fokozódik, míg az MMP-12 génexpressziója csökken (**5.15. D ábra**) igazolva korábbi eredményeinket.

MSCl sejtek jelenlétében a TIMP-1 (**5.15. E ábra**) és a TIMP-2 (**5.15. F ábra**) 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 gyulladásos koktél hozzáadását követően a Nav1.7 csatorna kifejeződése csökken, de azokon a sejteken, amelyeket korábban 5 napon keresztül MSCl sejtekkel tenyésztettük együtt, a Nav1.7 expressziója magas maradt (**5.15. G ábra**).

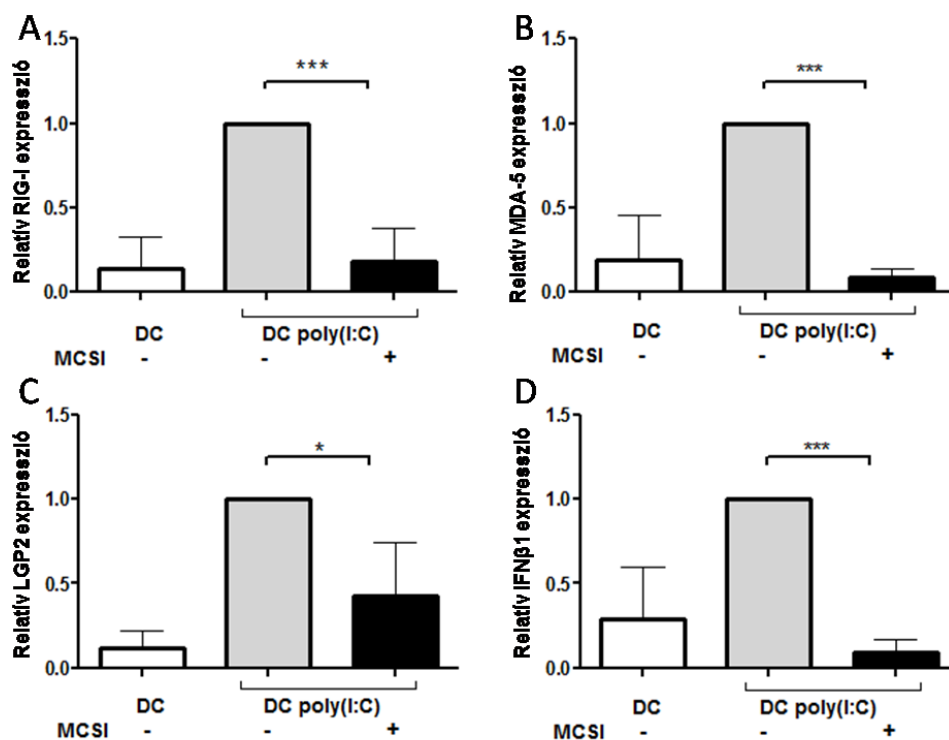


5.15. Ábra: Az önállóan vagy MSC1 sejtek jelenlétében differenciálódó DC-eket poly(I:C) és 5'pppRNS segítségével az 5. napon aktiváltuk, majd a DC-eket a CD209/DC-SIGN marker segítségével elválasztottuk az MSC1 sejtektől, ezt követően pedig $2,5 \times 10^5$ DC helyeztünk a transwell rendszerbe, majd CCL19/MIP-3 β jelenlétében váltottuk ki a sejt migrációt. A protokollnak megfelelően az alsó csatornába bevándorolt sejteket gyűjtöttük össze és

számukat az áramlási citometriás mérés során kontrollként alkalmazott polisztirén gyöngyökhöz viszonyítva határoztuk meg. Az ábrán a fehér oszlop a nyugvó DC-eket, a szürke oszlopok az aktivált, míg a fekete oszlopok az MSC1 sejtek jelenlétében differenciálódó aktivált sejtek migrációját jelenítik meg. A CCR7 (B), MMP9 (C), MMP12 (D), TIMP1 (E), TIMP2 (F), Nav1.7 (G) gének relatív expresszióját a fent részletezett kezelést követően Q-PCR módszerrel detektáltuk. Az ábrák a korábbi mérésekkel megegyező módon az expressziós változások mértékét az aktivált DC-ek kifejeződésének átlagához hasonlítottuk, amely értéket 1-nek vettünk (szürke oszlop) (n=4) ANOVA/ Bonferroni post-hoc teszt, az ábráinkon SD+__értéket ábrázoltunk.

5.2.5. 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 (24). Korábban e receptorok expressziójának változását MSC1 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 (5.16. A-C ábra) kifejeződése a külön nevelt DC-kben poly(I:C) és 5'pppRNS kezelés hatására emelkedett, aminek következtében az IFN- β expresszió is fokozódott (5.16. D ábra), 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.



5.16. Ábra Az MSC1 sejtek aktivált DC-ben módosítják a RIG-I receptorok és az IFN- β 1 expresszióját. A RIG-I (A), MDA5 (B), LGP2 (C) receptorok és az IFN- β 1 (D) citokin kifejeződését nyugvó (fehér oszlop), poly(I:C) aktivált (szürke oszlop) és az aktivált MSC1 sejtek jelenlétében differenciálódó DC-ben (fekete oszlop) a korábbiakhoz hasonlóan gén szinten vizsgáltuk. Az ábrázolás módja megegyezik a korábbi ábrák logikájával, így az aktivált DC-ben mért értékek átlagát 1-nek vettük és ehhez hasonlítottuk a többi minta kifejeződésének átlagát. $n=3$ ANOVA/ Bonferroni post-hoc teszt, az ábráinkon $SD \pm$ értéket ábrázoltunk.

6. Diszkusszió

A DC-k az emberi immunrendszer őrszemeiként a szöveti állományban folyamatosan „őrzőjáratot” folytatnak veszély jeleket és felvehető antigéneket kutatva. A DC-ek professzionális antigént prezentáló sejtek, amelyek a veleszületett és szerzett immunitás működését képesek összehangolni és szabályozni. Sokoldalú működésüknek köszönhetően a DC-ek az immunterápiás eljárások fejlesztésének egyik fontos és ígéretes célterületévé váltak. Számos nemzetközi munkacsoport dolgozik a tumor antigénekkal feltöltött/aktivált DC-ek által kiváltott immunválasz lehetőségeinek térképezésén, terápiás módszerek fejlesztésének érdekében.

Az aktivált DC-eket a bőrbe injektálva azt várták, hogy a sejtek a közeli nyirokcsomókba vándorolnak és hatékony tumor ellenes immunválaszt váltanak ki. Az eljárás megfelelő eredményességének kidolgozása még várat magára, mivel a legtöbb esetben a DC-ek az injektálás helyén maradtak (60-62). Egér modellben az injektált DC-ek nyirokcsomóba történő migrációját a TNF- α által indukált citokinek segítségével tudták fokozni (63) és az MMP-ok szekréciójának kiváltását is elősegítették. Feltételezik, hogy a megfelelő hatékonyságú immunválasz kiváltásához a gyulladásos citokinek jelenléte ezeknek a terápiás stratégiáknak a sikeréhez elengedhetetlen. 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-kben megjelenő MMP9 és MMP12 kifejeződésének elindításaért 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 GM-CSF szabályozó szerepét a szecernált MMP9 fehérje mennyiségének vizsgálatával is igazoltuk. 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, amelyek azt mutatták, hogy a CD1a⁺ sejtek nagyobb arányban jutottak át a transwell 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 (zseltináz B) aktivitásán kívül az MMP2 aktivitását (zselatináz A) is képes detektálni, amelynek kifejeződését korábbi vizsgálatokban monocita (41, 64) és bőr eredetű DC-ben is kimutatták (65). Saját vizsgálatainkban az MMP2 expresszióját az általunk vizsgált moDC-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 gátlószer 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 szabályozásának jobb megértéséhez. A DC-ek működésének szabályozása és a DC alapú sejterápiás módszerek fejlesztése új lehetőségeket nyit az alapkutatás 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 találhatók őssejtek, amelyek az azonnali sebgyógyuláshoz, a károsodott szövetek helyreállításához járulhatnak hozzá (66). 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 (47, 67), és számos klinikai kórképben vizsgálták gyulladást csökkentő hatásukat, köztük a bélben és a májban kialakuló súlyos akut GVHD betegségben (68), bőr graft kilökődése során (64), osteogenesis imperfecta (69), autoimmun encephalomyelitis (70), diabetes mellitus (71), és kollagén indukált ízületi gyulladás esetekben (72). Korábbi kutatási eredmények az igazolták, hogy a beültetett MSC-ek környezetében kialakuló gyulladást csökkentő citokin környezet hozzájárul a veseelégtelenséget vagy idegi és tüdőkárosodást követő szöveti regenerációhoz is (70, 73, 74). Ezek a kutatási eredmények arra utalnak, hogy az MSC-ek számos más 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 nélküli képesek az immunrendszer működésének modulálására (75). A MSC-ek terápiás felhasználásának nehézsége, hogy a szervezetből kinyerhető sejtek mennyisége korlátozott, és ezért számos kutatócsoport foglalkozik olyan sejtvonalak előállításával, amelyek az MSC-ekhez hasonló immunuszuppresszív tulajdonságokkal rendelkeznek (76).

Vizsgálatainkhoz 5 napos humán embrióból származó, blasztocisza eredetű, egy korábbi kollaborációs munka során sokoldalúan jellemzett sejtvonal (MSC1) humán monocita eredetű DC-ekre kifejtett hatását vizsgáltuk (77). Az MSC1 sejtek fenotípus sajátosságát, differenciációs és funkcionális képességeit csontvelő eredetű MSC, valamint humán foreskin fibrolaszt (HFF) sejtvonal tulajdonságaival hasonlítottuk össze (50). Mivel a korábbi eredmények arra utaltak, hogy az MSC1 sejtek morfológiája, fenotípusa és funkcionális aktivitása hasonló a terápiás eljárásokban is alkalmazott BM-MSC sejtekéhez, ezért azt feltételeztük, hogy az MSC1 sejtvonal is rendelkezik hasonló immunuszuppresszív képességekkel. Kísérleteink során az MSC1 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 MSC1 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 MSC1 sejtekkel tenyésztettük együtt őket. Hasonló jelenséget figyeltek meg LPS aktivált BM-MSC sejtek esetében is (78), valamint a TNF- α által aktivált köldökzsinórvér eredetű és BM-MSC sejtekkel (51) közös kultúrában tenyésztett DC-ekben. Ezzel szemben a CD80 és D86 kostimulációs molekulák sejtfelszíni expressziója a DC-ekben az MSC1 sejtek jelenlétében fokozódott, noha korábbi

vizsgálatokban a BM-MSc sejtek e molekulák kifejeződését egér és humán modellben egyaránt gátolták (55, 79). A DC-ek által szecernált citokinek koncentrációjának változásait különböző eredetű sejtvonalak jelenlétében szintén vizsgálták, de hatásmechanizmusra vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre.

Irodalmi adat, hogy az egér embrionális eredetű fibroblasztokból izolált MSC-ek képesek az IL-10 függő DC-ek kialakulását a SOCS3 aktiváción keresztül indukálni, ami nagy mennyiségű gyulladáscsökkentő IL-10 szekrécióját eredményezi.(52). Hasonló eredményt kaptak az LPS által aktivált MSC sejtek jelenlétében nevelt DC-ek esetében, ami nagy mennyiségű IL-6 citokin és a CXCL8 kemokin szekréció termelődését eredményezte. (53, 54). Ahogy korábbi adatokból ismert, az IL-6 és CXCL8 citokinek a szövetregeneráció és érképződés fontos közvetítői, így a sejtek a kiváltott immunszuppresszív környezet ellenére is serkenthetik a sebgyógyulás folyamatait és az új erek képződését. Jelen kísérleti rendszerünkben a poly(I:C) vagy 5'pppRNS által aktivált MSCI sejtek jelenlétében tenyésztett DC-ek felülcsúszójában szintén emelkedettségű IL-6, CXCL8 és IL-10 termelést tapasztaltunk, míg a gyulladáscsökkentő IL-12 és TNF- α koncentrációja szignifikánsan csökkent.

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 (56). 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 Ca²⁺ 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 sejtciklust befolyásoló intracelluláris Ca²⁺ koncentráció megfelelő mértéke esszenciális a DC-ek éréséhez (14). Azokban a DC-ben, amelyek MSCI sejtek jelenlétében differenciálódtak és ezt követően aktiváltuk a sejteket, magas Nav1.7 expressziót detektáltunk, aminek eredményeként a DC-ek Nav1.7⁺ CCR7⁻ sejtekké differenciálódtak. Kimutattuk, hogy a Nav1.7⁺ CCR7⁻ CD1a⁻ DC-ekben fokozódott az MMP9, TIMP1 és TIMP2 gének kifejeződése, míg migrációs képességük gátlódott. Irodalmi adatok alapján a CXCL8 kemokin trofoblaszt sejtekben indukálja az MMP2 és az MMP9 expresszióját (80). Az MMP-ok és TIMP-ok közötti kényes egyensúly az ECM bontásáért, az oldott citokinek, kemokinek és receptoraik

sejtfelszínről történő lehasadásáért is felelősek, így ezek egyensúlya közvetlenül befolyásolja az immunsejtek vándorlását, az egyensúly fenntartását, a sejtek túlélését és egyéb funkcióit. (42). 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 (57). Ezzel ellentétben jelen eredményeink azt mutatták, hogy az MSC1 sejtekkel együtt nevelt és gyulladásos koktéllal vagy poly(I:C)-vel aktivált DC-ek nagy mennyiségű TIMP szekréciójára képesek, és 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.

In vivo vizsgálatokban tanulmányozták az antigénpecifikus T-sejtek működésének gátlását egér allograft kilökődés (64), GVHD (81), autoimmun encephalomyelitis (70) és kollagén indukálta ízületi gyulladás (72) során. Egér kísérletekben azt is kimutatták ki, hogy az allogén MSC-ek jelenléte gátolja a DC-ek antigén prezentáló aktivitását, ami a CD8⁺ T-sejtek CD69 expressziójának csökkenését eredményezte és humán modellben azt is kimutatták, hogy a BM-MSc sejtek jelenléte gátolta T-sejtek IFN- γ szekrécióját (58). 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 MSC1 sejtek jelenlétében tartottunk fenn 5 napon keresztül. Eredményeink azt mutatták, hogy a sejtaktiváció ellenére az MSC1 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 MSC1 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 MSC1 sejtek jelenlétében nevelt DC-ek RIG-I, MDA-5, LGP-2, expressziója drasztikusan csökkent a kontroll mintákéhoz képest. Ezek az eredmények az MSC1 sejtek jelenlétében kialakuló, előzőleg már jellemzett immunszuppresszív tulajdonságokkal rendelkező tolerogén (82) 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.

7. Összefoglalás

A dendritikus sejtek (DC) immunrendszerünk „őrszemei”, 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-sejtekké 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 sajátosságokkal rendelkező altípusra oszthatók. A CD1a⁻ és CD1a⁺ DC-ek vizsgálta 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 sajátosságaira 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 nyernek 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 sejt vonal 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.

Summary

Dendritic cells (DCs) are constitutive sentinels of the immune system having the capacity to migrate across tissues. They are essential for linking innate and adaptive immune mechanisms through presenting antigenic peptides to naive T-lymphocytes. Based on this potential DCs are increasingly used in immunotherapeutic interventions, predominantly in oncology and autoimmune disorders. Previous studies revealed phenotypic and functional differences of CD1a⁺ and CD1a⁻ DC subpopulations associated with diverse functional activities in triggering inflammatory and/or regulatory type of immune responses, respectively. In the first part of our experimental work we have characterized the expression patterns of MMP enzymes and their TIMP inhibitors in monocytes and monocyte-derived DC subpopulations. MMP and TIMP have been identified as crucial players of preventing uncontrolled enzymatic degradation of the extracellular matrix known to be involved in the initiation of inflammation, autoimmune disorders and cancer metastasis via maintaining the balance of these opposing activities. As clinical trials aimed to prevent MMP enzyme activity were shown to decrease the spreading of cancer metastasis, we explored our studies by measuring the effects of GM6001, a wide spectrum MMP inhibitor without any influence on the phenotype of moDCs, on the migration of resting and activated DCs and on MMP and TIMP gene expression. In addition to the development of synthetic drugs and bioengineering, cell therapy approaches also became to the focus of interest.

In the past few years MSC were considered as clinically important cell types due to their regenerative potential that can be utilized in cell therapies aimed to treat inflammatory and autoimmune disorders or apply them for tissue engineering. This approach is supported by the unique capability of MSC to bypass MHC compatibility for inducing immunosuppression.

However, application of these cells for therapeutic interventions is limited due to the low number of MSC available. To overcome this restriction several groups also explored new strategies for identifying cell lines with immune suppressive properties.

In the second phase of our work we have characterized the suppressive effects of MSC-like cells (MSCl) on the differentiation, activation and migration of activated DCs. We determined for the first time that in the presence of MSCl cells the expression level of TIMPs was dramatically upregulated and resulted in inhibited DC migration via blocking ECM degradation. More importantly, these effects could also modify the regulatory capacity of MMP by the secretion and proteolytic cleavage of cytokines and chemokines. Based on these results we conclude that MSCl cells are able to modulate the expression of key molecules involved in DC migration. To clarify the possible involvement of the RLR family proteins we hypothesized that the functional changes induced by the RLR ligand poly(I:C) are the consequence of the decreased expression of RLR. Our results indeed demonstrated that in the presence of MSCl cells the expression of RIG-I, MDA-5 and LGP-2 in DCs is dramatically impaired. Referring to the previously described partially activated DCs with tolerogenic and immune suppressive properties, MSCl cells may assist the maintenance of DC in a „semi-mature” suppressive state. Our results obtained in a human in vitro system suggest that MSCl cells with unlimited proliferating capacity could be harnessed as a reliable model for inhibiting DC activation by MSCl cell-mediated immune suppression.

8. Tárgyszavak

Mesenchymális sztróma sejt, dendritikus sejt, immunszuppresszió, mátrix metalloproteináz

Keywords: mesenchymal stromal cell, dendritic cell, immunosuppression, matrix metalloproteinase

9. Irodalom jegyzék

1. Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cell development and maturation. *Adv Exp Med Biol.* 1997;417:1-6. PubMed PMID: 9286329.
2. Randolph GJ, Inaba K, Robbani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 1999 Dec;11(6):753-61. PubMed PMID: 10626897.
3. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology.* 2005 Dec;5(12):953-64. PubMed PMID: 16322748.
4. Coutant F, Agaoglu S, Perrin-Cocon L, Andre P, Lotteau V. Sensing environmental lipids by dendritic cell modulates its function. *Journal of immunology.* 2004 Jan 1;172(1):54-60. PubMed PMID: 14688309.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811. PubMed PMID: 10837075.
6. Szabo A, Bene K, Gogolak P, Rethi B, Lanyi A, Jankovich I, et al. RLR-mediated production of interferon-beta by a human dendritic cell subset and its role in virus-specific immunity. *J Leukoc Biol.* 2012 Jul;92(1):159-69. PubMed PMID: 22517920.
7. Shakhar G, Lindquist RL, Skokos D, Dudziak D, Huang JH, Nussenzweig MC, et al. Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol.* 2005 Jul;6(7):707-14. PubMed PMID: 15924144. Pubmed Central PMCID: 1560107.
8. Thery C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2001 Feb;13(1):45-51. PubMed PMID: 11154916.
9. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine.* 1994 Apr 1;179(4):1109-18. PubMed PMID: 8145033. Pubmed Central PMCID: 2191432.
10. Gogolak P, Rethi B, Szatmari I, Lanyi A, Dezso B, Nagy L, et al. Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma. *Blood.* 2007 Jan 15;109(2):643-52. PubMed PMID: 16968896.
11. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):129-35. PubMed PMID: 19153672.

12. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol.* 1999 Jul;66(1):1-9. PubMed PMID: 10410984.
13. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:593-620. PubMed PMID: 10837070.
14. Kis-Toth K, Hajdu P, Bacsikai I, Szilagyi O, Papp F, Szanto A, et al. 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. *Journal of immunology.* 2011 Aug 1;187(3):1273-80. PubMed PMID: 21715690.
15. Craner MJ, Damarjian TG, Liu S, Hains BC, Lo AC, Black JA, et al. Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia.* 2005 Jan 15;49(2):220-9. PubMed PMID: 15390090.
16. Feili-Hariri M, Falkner DH, Morel PA. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J Leukoc Biol.* 2005 Sep;78(3):656-64. PubMed PMID: 15961574.
17. Traidl-Hoffmann C, Jakob T, Behrendt H. Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Mar;123(3):558-66. PubMed PMID: 19152966.
18. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 2003 Nov;19(5):641-4. PubMed PMID: 14614851.
19. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy.* 1992 Oct;47(5):450-5. PubMed PMID: 1485646.
20. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 1996 Mar;4(3):313-9. PubMed PMID: 8624821.
21. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006 May 11;441(7090):235-8. PubMed PMID: 16648838.
22. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):207-14. PubMed PMID: 11994741.
23. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001 Nov;11(11):S37-43. PubMed PMID: 11684441.

24. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2004 Aug;4(8):617-29. PubMed PMID: 15286728.
25. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):327-36. PubMed PMID: 1703045.
26. Himelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ. Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis*. 1994;14(1-6):246-58. PubMed PMID: 7657517.
27. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962 Jun 15;48:1014-22. PubMed PMID: 13902219. Pubmed Central PMCID: 220898.
28. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4. PubMed PMID: 10419448.
29. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):10134-44. PubMed PMID: 11121398.
30. Murphy G, Allan JA, Willenbrock F, Cockett MI, O'Connell JP, Docherty AJ. The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem*. 1992 May 15;267(14):9612-8. PubMed PMID: 1315762.
31. Sanchez-Lopez R, Alexander CM, Behrendtsen O, Breathnach R, Werb Z. Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *J Biol Chem*. 1993 Apr 5;268(10):7238-47. PubMed PMID: 8463259.
32. Knauper V, Docherty AJ, Smith B, Tschesche H, Murphy G. Analysis of the contribution of the hinge region of human neutrophil collagenase (HNC, MMP-8) to stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. *FEBS Lett*. 1997 Mar 17;405(1):60-4. PubMed PMID: 9094424.
33. Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson SJ, Allan JA, Knight CG, et al. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem*. 1994 Mar 4;269(9):6632-6. PubMed PMID: 8120015.
34. Shipley JM, Doyle GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, et al. The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *J Biol Chem*. 1996 Feb 23;271(8):4335-41. PubMed PMID: 8626782.

35. Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori H, Okada A, Seiki M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem*. 1999 Nov 26;274(48):34260-6. PubMed PMID: 10567400.
36. Kojima S, Itoh Y, Matsumoto S, Masuho Y, Seiki M. Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett*. 2000 Sep 1;480(2-3):142-6. PubMed PMID: 11034316.
37. Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2007 Jun;6(6):480-98. PubMed PMID: 17541420.
38. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, et al. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem*. 1988 May 15;263(14):6579-87. PubMed PMID: 2834383.
39. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Wachter MP, Margulies IM, Liotta LA. The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J Biol Chem*. 1989 Jan 25;264(3):1353-6. PubMed PMID: 2536363.
40. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 1997 Oct;74(2):111-22. PubMed PMID: 9352216.
41. Kouwenhoven M, Ozenci V, Tjernlund A, Pashenkov M, Homman M, Press R, et al. Monocyte-derived dendritic cells express and secrete matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitors and are imbalanced in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2002 May;126(1-2):161-71. PubMed PMID: 12020967.
42. Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature reviews Immunology*. 2013 Sep;13(9):649-65. PubMed PMID: 23969736.
43. Silva FH, Nardi NB. From leading role to the backstage: mesenchymal stem cells as packaging cell lines for in situ production of viral vectors. *Medical hypotheses*. 2006;67(4):922-5. PubMed PMID: 16737782.
44. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974 Apr;17(4):331-40. PubMed PMID: 4150881.

45. English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013 May;3(5):a015560. PubMed PMID: 23637312.
46. Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C, de Boer J. Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2007 Aug;25(8):1029-41. PubMed PMID: 17469183.
47. Stagg J, Galipeau J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. *Current molecular medicine*. 2013 Jun;13(5):856-67. PubMed PMID: 23642066.
48. Jitschin R, Mougiakakos D, Von Bahr L, Volkl S, Moll G, Ringden O, et al. Alterations in the cellular immune compartment of patients treated with third-party mesenchymal stromal cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Stem cells*. 2013 Aug;31(8):1715-25. PubMed PMID: 23554294.
49. Jung YJ, Ju SY, Yoo ES, Cho S, Cho KA, Woo SY, et al. MSC-DC interactions: MSC inhibit maturation and migration of BM-derived DC. *Cytotherapy*. 2007;9(5):451-8. PubMed PMID: 17786606.
50. Varga N, Vereb Z, Rajnavolgyi E, Nemet K, Uher F, Sarkadi B, et al. Mesenchymal stem cell like (MSCl) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Oct 28;414(3):474-80. PubMed PMID: 21971558.
51. Saeidi M, Masoud A, Shakiba Y, Hadjati J, Mohyeddin Bonab M, Nicknam MH, et al. Immunomodulatory effects of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and endocytosis of monocyte-derived dendritic cells. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*. 2013 Mar;12(1):37-49. PubMed PMID: 23454777.
52. Liu X, Qu X, Chen Y, Liao L, Cheng K, Shao C, et al. Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation. *Journal of immunology*. 2012 Aug 1;189(3):1182-92. PubMed PMID: 22753940.
53. Lai HY, Yang MJ, Wen KC, Chao KC, Shih CC, Lee OK. Mesenchymal stem cells negatively regulate dendritic lineage commitment of umbilical-cord-blood-derived hematopoietic stem cells: an unappreciated mechanism as immunomodulators. *Tissue engineering Part A*. 2010 Sep;16(9):2987-97. PubMed PMID: 20545555.

54. van den Berk LC, Roelofs H, Huijs T, Siebers-Vermeulen KG, Raymakers RA, Kogler G, et al. Cord blood mesenchymal stem cells propel human dendritic cells to an intermediate maturation state and boost interleukin-12 production by mature dendritic cells. *Immunology*. 2009 Dec;128(4):564-72. PubMed PMID: 19930046. Pubmed Central PMCID: 2792140.
55. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem cells*. 2007 Aug;25(8):2025-32. PubMed PMID: 17510220.
56. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology today*. 1998 Dec;19(12):568-74. PubMed PMID: 9864948.
57. Kis-Toth K, Bacskai I, Gogolak P, Mazlo A, Szatmari I, Rajnavolgyi E. Monocyte-derived dendritic cell subpopulations use different types of matrix metalloproteinases inhibited by GM6001. *Immunobiology*. 2013 Nov;218(11):1361-9. PubMed PMID: 23870824.
58. Nazarov C, Lo Surdo J, Bauer SR, Wei CH. Assessment of immunosuppressive activity of human mesenchymal stem cells using murine antigen specific CD4 and CD8 T cells in vitro. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(5):128. PubMed PMID: 24406271. Pubmed Central PMCID: 3854780.
59. Szatmari I, Pap A, Ruhl R, Ma JX, Illarionov PA, Besra GS, et al. PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Oct 2;203(10):2351-62. PubMed PMID: 16982809. Pubmed Central PMCID: 2118109.
60. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lysterly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer research*. 1999 Jan 1;59(1):56-8. PubMed PMID: 9892184.
61. Lappin MB, Weiss JM, Delattre V, Mai B, Dittmar H, Maier C, et al. Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection. *Immunology*. 1999 Oct;98(2):181-8. PubMed PMID: 10540216. Pubmed Central PMCID: 2326926.
62. Eggert AA, Schreurs MW, Boerman OC, Oyen WJ, de Boer AJ, Punt CJ, et al. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer research*. 1999 Jul 15;59(14):3340-5. PubMed PMID: 10416590.
63. Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaya M, et al. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2000 Feb 7;191(3):495-502. PubMed PMID: 10662795. Pubmed Central PMCID: 2195824.

64. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*. 2002 Jan;30(1):42-8. PubMed PMID: 11823036.
65. Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, et al. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *Journal of immunology*. 2002 May 1;168(9):4361-71. PubMed PMID: 11970978.
66. Boda Z, Udvardy M, Farkas K, Toth J, Jambor L, Soltesz P, et al. [Autologous bone marrow-derived stem cell therapy in patients with severe peripheral arterial disorder]. *Orvosi hetilap*. 2008 Mar 23;149(12):531-40. PubMed PMID: 18343769. Autolog csontveloi eredetu ossejtterrapia eredmenye elorehaladott periferias arterias erbetegsegben.
67. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2008 Sep;8(9):726-36. PubMed PMID: 19172693.
68. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004 May 1;363(9419):1439-41. PubMed PMID: 15121408.
69. Le Blanc K, Gotherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. 2005 Jun 15;79(11):1607-14. PubMed PMID: 15940052.
70. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1755-61. PubMed PMID: 15905186.
71. Dong QY, Chen L, Gao GQ, Wang L, Song J, Chen B, et al. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 2008;31(6):E328-37. PubMed PMID: 19032902.
72. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2007 Apr;56(4):1175-86. PubMed PMID: 17393437.
73. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, et al. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Cell transplantation*. 2014;23(7):889-99. PubMed PMID: 23562186.

74. Zhao F, Zhang YF, Liu YG, Zhou JJ, Li ZK, Wu CG, et al. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. *Transplantation proceedings*. 2008 Jun;40(5):1700-5. PubMed PMID: 18589176.
75. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 2003 Jan;57(1):11-20. PubMed PMID: 12542793.
76. Sykova E, Forostyak S. Stem cells in regenerative medicine. *Laser therapy*. 2013;22(2):87-92. PubMed PMID: 24155553. Pubmed Central PMCID: 3806066.
77. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2005 Jun;23(6):699-708. PubMed PMID: 15940242.
78. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6576-83. PubMed PMID: 19398717.
79. Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):46-57. PubMed PMID: 18832657.
80. Jovanovic M, Stefanoska I, Radojcic L, Vicovac L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. *Reproduction*. 2010 Apr;139(4):789-98. PubMed PMID: 20133364.
81. Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *Journal of immunology*. 2006 Jun 15;176(12):7761-7. PubMed PMID: 16751424.
82. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology*. 2002 Sep;23(9):445-9. PubMed PMID: 12200066.

10. Függelék



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



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☐ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ☐ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ☐ Honlap: www.lib.unideb.hu



További Közlemények

3. Szabó, A., Osman, R.M., **Bacskai, 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., **Bacskai, 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., **Bacskai, 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 alapján 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.



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.