

ZÁRÓJELENTÉS

Rajnavölgyi Éva: *A dendritikus sejtek szerepe az immunológiai szinapszis kialakításában, a T-limfociták homeosztázisának és aktiválásának szabályozásában* című OTKA pályázat keretében 2003 – 2006 között végzett kutatómunkáról

A dendritikus sejtek (DS) a természetes immunitáshoz tartozó heterogén, multifunkcionális, kevés sejtből álló sejtpopulációt képviselnek. A csontvelői őssejtekből képződő, mieloid eredetű DS-ek a véráramból kilépve szöveti szenzorként működő sejtekké differenciálódnak, melyek aktiváció hatására a közeli nyirokcsomókba vándorolnak, ahol hivatásos antigén prezentáló sejtként működve bemutatják a szöveti környezetben felvett és intracellulárisan feldolgozott részecske természetű vagy oldott anyagokat a T-limfociták számára. Ezáltal elsődleges szerepet játszanak a tolerancia fenntartásában és az immunválasz elindításában. A mieloid DS-ek emellett az immunrendszer szinte összes sejtípusával is képesek kapcsolatba lépni és így fontos immunreguláló szereppel is bírnak [2. és 15. közlemény]. A DS-ek másik fő típusát a hivatásos interferon (IFN) termelő sejtek képviselik, amelyek a vírusfertőzések elleni védelemben játszanak kiemelt szerepet [13. és 14. közlemények].

Vizsgálataink elsődleges célja a humán DS-ek differenciálódását, aktivációját és funkcionális sajátságait befolyásoló új mechanizmusok feltárása, és a T-limfocitákkal kialakított kapcsolat következményeinek tanulmányozása volt.

Vizsgálatainkban az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

- Mennyiben rendelkeznek hasonló funkcionális sajátságokkal a dendritikus sejt sajátságokkal rendelkező KG-1 myeloid eredetű sejt vonal és a primer humán monocita-eredetű dendritikus sejtek?
- Hogyan befolyásolják a monocitából induló DS differenciációt kiváltó citokinek a képződő sejtek funkcionális sajátságait?
- Milyen szöveti környezeti tényezők hatnak a DS-ek differenciációjára és aktivációjára?
- Hogyan befolyásolják az azonosított környezeti tényezők a DS-ek funkcionális sajátságait és a T-limfocita polarizációt és aktivációt?
- Milyen szerepet tölt be az IL-7 citokine a DS-ek és a T-limfociták funkcióiban?

1. A KG-1 sejt vonal és a primer monocita-eredetű dendritikus sejtek összehasonlító vizsgálata

Vizsgálatainkban a dendritikus sejt tulajdonságokkal rendelkező humán KG-1 sejt vonal fenotípusos és elektrofiziológiai tulajdonságait hasonlítottuk össze a primer humán monocita-eredetű DS-ekével. Ebből a célból a kétféle sejtet először különböző körülmények között tenyésztettük és aktiváltuk, majd fenotípusos és citokin termelő képességük, valamint elektrofiziológiai sajátságaik alapján jellemeztük. Eredményeink szerint a KG-1 sejtek bizonyos funkcionális sajátságaikban hasonlóak a primer sejtekhez, de számos jellemzőik eltérnek a monocita-eredetű DS-ekétől, ezért nem helyettesíthetik a primer sejtek vizsgálatát [1 közlemény]. Megállapítottuk, hogy a nem stimulált, valamint a PMA és ionomicin jelenlétében aktivált KG-1 sejtek az időtől és a feszültségtől független, Charibdotoxin (ChTx)

szenzitív, az intracelluláris Ca^{++} mennyiségétől függő K^{+} csatornával rendelkeznek [1. közlemény].

2. Ioncsatornák jellemzése és azonosítása primer humán monocita-eredetű dendritikus sejtekben

További vizsgálatainkban a primer, monocita eredetű éretlen és érett DS-ek biofizikai sajátosságait is jellemeztük. A monocita-eredetű DS-ek ionáramait a patch-clamp technika teljes-sejt konfigurációjában mértük. Megállapítottuk, hogy az éretlen és az érett DS-ekben – a monocitákban nem detektálható – eltérő ionszelektivitású és biofizikai tulajdonságú feszültség-kapuzott áramok mérhetők, melyek gátlószer érzékenysége is különbözik. Eredményeink szerint az éretlen DS-ekben befelé irányuló, tetrodotoxin (TTX) érzékeny kation áram mutatható ki, melynek jellemzése alapján egy feszültség-kapuzott nátrium csatorna működése valószínűsíthető, míg a gyulladásos citokinekkal aktivált érett DS-ekben ennek a csatornának az aktivitása eltűnik. Az éretlen DS-ekben kifejeződő nátrium csatorna típusának meghatározása céljából az áram-kapuzott nátrium csatornák közös szekvenciáját tartalmazó DNS szakaszt a cDNS-ből degenerált primerek felhasználásával PCR technikával felsokszoroztuk. A gél elektroforézissel tisztított PCR terméket pCRBlunt vektorba, tompa véggel ligáltuk és *E. coli* TOP10 törzsbe transzformáltuk standard hősokk módszer alkalmazásával. A plazmidokat tartalmazó baktérium kolóniákat restrikciós emésztéssel ellenőriztük. Az inzertet hordozó konstrukciókat szekvenáltuk, az eredményként kapott szekvenciát az NCBI adatbázis segítségével SCN9A csatornaként azonosítottuk, mely az áram-kapuzott nátrium csatorna 1.7 (NaV1.7) génjének bizonyult. További érdekes megfigyelésünk volt, hogy a mérhető Na^{+} áram szignifikánsan magasabb volt a CD1a⁺ Langerhans sejt típusú primer DS-ekben, mint a CD1a⁻ sejtekben.

További eredményeink szerint az aktivált/érrett DS-ekben a NaV1.7 csatorna eltűnésével párhuzamosan egy Charibdotoxin (ChTx) érzékeny, kifelé irányuló, feszültség függő K^{+} csatornára jellemző aktivitás jelenik meg. Az éretlen és az érett primer DS-ekben kimutatott, eltérő elektrofiziológiai sajátosságokkal rendelkező ioncsatornák további azonosítása céljából az éretlen és az érett, valamint a CD1a⁺ és CD1a⁻ DS-eket RT-PCR és immunoblot módszerrel vizsgáltuk abból a célból, hogy gén és fehérje szinten is igazoljuk az elektrofiziológiai mérések eredményeit. Az NaV1.7 csatorna jelenlétét éretlen DS-ekben mRNS szinten, specifikus primerek segítségével hagyományos és QRT-PCR módszerrel is igazolni tudtuk és kifejeződésüket Western Blot technikával specifikus ellenanyagokkal is bizonyítottuk. Jelen vizsgálatainkban az NaV1.7 csatorna fiziológias szerepét éretlen DS-ekben funkcionális vizsgálatokkal (internalizáció, fagocitózis) és a gátló toxin felhasználásával próbáljuk tisztázni. Hasonló vizsgálatok vannak folyamatban a feszültség függő K^{+} csatorna mRNS és fehérje szintű kifejeződésének igazolására és esetleges funkcionális szerepének tisztázására is. Ezekben a vizsgálatokban a csatorna gátlók jelenlétében vizsgáljuk a DS-ek mobilitását, citokin termelő és T-limfocita aktiváló képességét.

3. Citokinek hatása a monocita-eredetű dendritikus sejtek differenciálódására, aktivációjára és funkcióira

Vizsgálatainkat egészséges véradók Buffy Coat mintáiból primer humán monocita-eredetű DS-ekkel végeztük. A vizsgálatok elsődleges célja az volt, hogy tanulmányozzuk a DS-ek funkcionális flexibilitását és citokin függő differenciálódását. Ennek igazolására a perifériás vérből izolált monocitákból *in vitro* különböző körülmények között állítottunk elő DS-eket, melyeket különböző stimulusokkal aktiváltunk, majd összehasonlítottuk az éretlen és az aktivált sejtek fenotípusos és funkcionális sajátosságait. A DS differenciálódás és érés

folyamatát a sejtfelületen kifejeződő receptorok (CD14, DC-SIGN, CCR7), antigén prezentáló (MHC-I, MHC-II és CD1), kostimuláló (CD80, CD86, CD40), és aktivációs (CD38, SLAMF, CD83) molekulák mérésével követtük. Az éretlen DS-ek funkcionális sajátosságait a receptor-mediált internalizáló, pinocitotikus és fagocita képesség alapján jellemeztük, az érett sejtek működését a kemokin indukált migráció és a gyulladásos és anti-inflammatorikus citokinek és kemokinek termelése alapján hasonlítottuk össze. Az aktivált/érett DS-ek T-limfocita aktiváló és polarizáló képességét a DS – T-sejt kölcsönhatásokban mérhető citokinek szintje alapján hasonlítottuk össze.

Eredményeink szerint a humán perifériás vérből izolált monociták GM-CSF, GM-CSF+IL-4, GM-CSF+IL-7 valamint GM-CSF+IL-13 citokinek jelenlétében egyaránt dendritikus sejt sajátosságokkal rendelkező sejtekké fejlődnek. Mivel ezekről a citokinekről illetve citokin kombinációkról előzőleg is ismert volt, hogy elősegítik a DS-ek monocitákból történő differenciálódását, célunk a kapott sejtek fenotípusos és funkcionális összehasonlító vizsgálata volt. A különböző sejtfelületi molekulák megjelenése alapján megállapítottuk, hogy a különböző citokin kombinációk jelenlétében differenciálódó DS-ek nem térnek el egymástól: az antigén felvételben elsődleges szerepet játszó receptorok expressziójában, a DS-T sejt kommunikációban szerepet játszó adhéziós és kostimulátor molekulák, valamint az MHC-II membrán fehérjék kifejeződésében. Bizonyos fenotípusos és funkcionális sajátágaikban azonban találtunk különbségeket, amennyiben az eltérő citokinek jelenlétében differenciáltatott DS-ek a CD14, CD64, DC-SIGN internalizáló receptorok, valamint a CD83 aktivációs molekula kifejeződésében eltéréseket mutattak. Ennek értelmében a GM-CSF vagy a GM-CSF+IL-7 jelenlétében kialakult sejtek CD14^{high}DC-SIGN(-)CD83(-) fenotípusúak, míg a GM-CSF+IL-4 és a GM-CSF+IL-13 jelenlétében kialakuló sejtek CD14^{low}DC-SIGN+CD83+ fenotípusúnak bizonyultak. Az IL-4 és az IL-13 jelenlétében differenciáltatott DS-ek hatékonyan fagocitáltak a latex gyöngyöket és gyulladásos citokinek hatására fagocita funkciójuk csökkent. A GM-CSF és a GM-CSF+IL-7 jelenlétében differenciáltatott DS-ek ezzel szemben mind éretlen, mind aktivált állapotban hasonló mértékű fagocitózisra voltak képesek. Mind a négy DS altípus hasonló mértékű allogén T sejt proliferáció kiváltására volt képes és a sejtfelületi CD40 molekulák keresztkötése mind a négy DS típus esetében IL-12 termelést váltott ki. Ezek alapján megállapítható, hogy mind a négy citokin hivatásos antigén prezentáló sejtnek működő DS-ek differenciálódását váltja ki, melyek fenotípusa és aktiváltsági állapota eltérő.

A DS-ek mobilitási sajátosságainak vizsgálatára migrációs kamrában végzett vizsgálatokat állítottunk be. A módszer alkalmazását a DS sajátosságokkal rendelkező KG-1 sejtvonalon és gyulladásos citokinek és prosztaglandin-E2 (PGE2) együttes jelenlétében aktivált monocita eredetű DS-eken bizonyítottuk [1. közlemény]. A különböző citokinek jelenlétében nevelt DS-ek összehasonlító vizsgálata során azt találtuk, hogy a DS-ek éretlen állapotban nem vándorolnak a nyirokcsomókban termelődő CCL19 vagy CCL21 kemokinek hatására. Az IL-4 és az IL-13 jelenlétében differenciáltatott DS-ek gyulladásos citokinekkel történő aktiválást követően képessé váltak a kemokin koncentráció-grádiens irányába történő vándorlásra, míg a csak GM-CSF vagy a GM-CSF+IL-7 jelenlétében differenciáltatott DS-ek esetében nem tapasztaltunk kemotaxist. Az öt napig GM-CSF jelenlétében tenyésztett, majd az 5. – 7. nap között GM-CSF+IL-4 citokinekkel kezelt sejtek kemokinektől függő migrációja kimutatható volt. Ezek az eredmények az IL-4 és az IL-13 citokinek esszenciális szerepére utalnak az aktivált DS-ek CCR7 kemokin receptortól függő migrációjában. További kísérleteinkben kimutattuk, hogy a CCL19 kemokin hatására bekövetkező intracelluláris Ca²⁺ felszabadulás lényegesen több sejtben következik be a GM-CSF és az IL-4 jelenlétében differenciálódó DS-ek esetében, mint a csak GM-CSF-ben kialakuló sejtek között. Előzetes eredményeink szerint a jelenség hátterében valószínűleg az áll, hogy az IL-4/IL-13 citokinek

jelenléte nélkülözhetetlen a kemotaxis kiváltásához szükséges mennyiségű CCR7 kemokin receptor megjelenéséhez a DS-ek felszínén.

Az érett humán monocita eredetű DS-ek fenotípusos és funkcionális sajátosságait többféle aktivációs stimulussal (gyulladásos koktél, CD40 ligand, Toll receptor ligandumok, mint pl. bakteriális lipopolysaccharid (LPS), polyI:C és IFN γ való kezelést követően vizsgáltuk. A fenotípus jellemzésére a funkcionális sajátságokkal összefüggő sejtfelszíni molekulák megjelenését követtük nyomon, köztük a CD83 aktivációs markert, a CD40, CD80/B7-1, CD86/B7-2, SLAM kostimuláló molekulákat, a DS-ek mobilizációjában elsődleges szerepet játszó CCR7 kemokin receptort. Eredményeink szerint a membránfehérjéknek a kifejeződése lehetőséget nyújt az aktiváció hatásfokának követésére. A funkcionális vizsgálatok keretében összehasonlítottuk az éretlen és érett DS-ek internalizáló képességét, az aktivált DS-ek gyulladásos citokinek hatására kiváltott migrációját és a CD40 ligand általi aktiváció eredményeként termelődött citokinek összetételét és mennyiségét. A citokintermelés követésére számos, eltérő elven működő és eltérő célra optimalizált mérési módszert állítottuk be. A teljes citokin profil jellemzésére RayBio citokin array módszert használtunk, a különböző DS alpopulációkat a fenotípus meghatározással kombinált intracelluláris citokin kimutatással végeztük, a DS-ek által szecernált citokinek mennyiségét ELISA és citokin bead assay (CBA) módszerrel mértük. Ezek a módszerek lehetőséget nyújtottak az aktivált DS-ek és a DS-ek által aktivált T-limfocita populációk által termelt citokinek összehasonlító vizsgálatára is. Eredményeink igazolták feltételezésünket, miszerint a SLAM által közvetített jelátviteli folyamatok a DS-mediált T-limfocita válasz során jelentősen módosítják a citokin mintázatot. Az ezzel kapcsolatos új eredményekről részletesen a T038353 számú pályázatban számoltunk be [10. közlemény].

4. A szöveti környezeti hatások szerepének tanulmányozása az immunológiai szinapszis kialakulására és a T-limfocita aktiválás hatékonyságára, polarizációjára.

4.1. A dendritikus sejtek differenciálódását befolyásoló tényezők

A human monocita eredetű DS-ekkel végzett *in vitro* vizsgálataink azt igazolták, hogy a tápfolyadék összetétele és szérumszintje jelentősen befolyásolja a monocita eredetű CD1a⁻ és CD1a⁺ DS-ek arányát. Azt is igazoltuk, hogy a szérumszintje lipidek vagy lipoproteinek eltávolítása kedvez a CD1a⁺ sejtek képződésének, míg bizonyos szérumszintje lipid komponensek gátolják azt és a CD1a⁻ sejtek képződését segítik elő [16 közlemény]. Korábbi eredményeink azt is igazolták, hogy a mieloid differenciálódásban fontos szerepet játszó ligand indukált nukleáris hormon receptorok egyik tagja, a *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPAR γ) agonista ligandumai szintén gátolják a CD1a⁺ sejtek differenciálódását. Ezek a vizsgálatok azt is igazolták, hogy a PPAR γ aktiváció az I. típusú CD1 molekulák összes tagjának (CD1a, CD1b, CD1c, CD1e) kifejeződését képes gátolni, ugyanakkor a II. típusú CDd molekula expresszióját a PPAR γ aktiváció elősegíti. Ezt az új szabályozó mechanizmust mRNS és fehérje szinten is igazoltuk, és kimutattuk hogy a CD1d PPAR γ általi fokozott expressziója elősegíti az iNKT sejtek aktiválódását [7. közlemény].

4.2. A perifériás vérből izolált monocitákból differenciálódó dendritikus sejt alpopulációk jellemzése

A monocita eredetű DS-ek differenciálódásának tanulmányozása azt igazolta, hogy a CD1a⁺ DS-ek a CD1a⁻ sejtekből differenciálódnak és ezt a folyamatot a DS-ek aktivációját kiváltó stimulusok blokkolják. A DS-ekkel kapcsolatos kérdések tanulmányozása során kifejlesztett módszertani repertoire és a DS-ek funkcionális vizsgálata során kapott előkísérleti eredmények arra utaltak, hogy az általunk alkalmazott *in vitro* körülmények között képződő monocita eredetű CD1a⁻ és CD1a⁺ DS-ek nem csak az ioncsatorna

kifejeződésében, hanem más fenotípusos és funkcionális sajátágaikban is eltérnek egymástól. Ezirányú összehasonlító vizsgálataink azt igazolták, hogy a CD1a⁻ sejtek internalizáló és fagocita működése lényegesen magasabb, mint a CD1a⁺ sejteké. Aktiváció hatására a két alpopuláció hasonló kemotaktikus aktivitást mutatott, de citokin termelő képességük lényegesen eltért egymástól. A T-sejtekkel való kölcsönhatást modellező CD40 ligandummal történő keresztkötés hatására mindkét sejt nagy mennyiségű TNF- α , IL-1 β , IL-6 citokin és IL-8 kemokin termelésére vált képessé, de a CD1a⁺ DS-ek szignifikánsan nagyobb mennyiségű biológiailag aktív IL-12p70 citokin és CCL1 kemokin szekréciójára voltak képesek. Ez az eltérés a T-limfociták eltérő polarizációját eredményezi, aminek megfelelően a CD1a⁺ DS-ek által aktivált allogén T-limfociták által termelt IFN γ szekréció lényegesen magasabb, mint a CD1a⁻ sejtek által aktivált T-limfocitáké. További vizsgálataink azt is igazolták, hogy a CD1a⁻ és CD1a⁺ DS alpopulációk a nyirokszervekben és bizonyos epitél sejt rétegekben is megtalálhatók és arányuk fontos lehet a gyulladásos immunválasz kiváltásában illetve megakadályozásában [16 közlemény].

4.3. A monocita eredetű dendritikus sejtekben kifejeződő ABC transzporterek

Előzetes irodalmi és saját, a lipid szabályozással összefüggő DS differenciációt feltáró kísérleti eredményeink alapján feltételeztük, hogy a DS-ek az ABC transzporter család több tagját is kifejezhetik. Ezért 5 egészséges donorból monocitákat, makrofágokat, éretlen és érett DS-eket állítottunk elő, majd az ABC transzporter család 40 tagjának expresszióját a különböző sejt típusokban QRT-PCR módszerrel hasonlítottuk össze. Eredményeink szerint a monocita – DS átalakulás 10 transzporter kifejeződésének jelentős fokozódásával járt. E molekulák megjelenésének funkcionális jelentősége nem ismert, így ezek az előkísérleti eredmények új kutatási irányok lehetőségét nyitják meg. A monoklonális ellenanyag előállítási programot olyan transzporter molekulákkal kezdtük el, amelyekkel szemben a nemzetközi piacon még nem állnak rendelkezésre ilyen reagensek. Mivel ezek a membránfehérjék az immunizálási és az ellenanyag szűrési lépések során speciális módszertani problémákat vetnek fel, eddigi vizsgálataink elsősorban ezek megoldására irányultak. Egyik stratégiaként KLH hordozóhoz kémiaiilag kapcsolt, megfelelő predikciók alapján tervezett szintetikus peptideket próbáltunk immunogénként alkalmazni. Eddigi eredményeink azt igazolják, hogy az immunizált egerekben kiváltott poliklonális ellenanyag válasz során csak kis számban képződnek a fehérjével is reagáló ellenanyagok. Ezért további kísérleteinkhez a rekombináns transzporter fehérjét illetve azok fragmentumait használtuk. Ezzel az immunizálási eljárással sokkal jobb hatásfokkal sikerült olyan ellenanyagokat indukálni, amelyek felismerik a membránfehérjét is.

5. Az IL-7 citokin szerepe a dendritikus sejtek és T-limfociták funkcióiban

5.1. Az IL-7 citokin szerepe a dendritikus sejtek differenciálódásában

Már ismertetett eredményeink szerint az IL-7 citokin GM-CSF jelenlétében képes a monocita eredetű DS-ek differenciációját elősegíteni. A csak GM-CSF-ben vagy a GM-CSF+IL-7 jelenlétében differenciálódó DS-ek között azonban nem tapasztaltunk lényeges különbséget sem a sejt felszíni molekulák expressziójában, sem a funkcionális vizsgálatok során, de igazoltuk, hogy az IL-7 citokin hatása a DS differenciálódásra lényegesen eltér az anti-inflammatorikus IL-4 és IL-13 citokinektől. Vizsgálataink szerint az IL-7 receptor (IL-7R) α -alegysége nem, vagy csak nagyon kis mértékben fejeződik ki monocitákon és az éretlen vagy az aktivált DS-eken. Ugyanakkor a monocitából a DS irányba történő differenciálódás során a második napon az IL-7R expresszió jelentősen megnő a sejt felszínen, ami arra utal, hogy az IL-7 citokin a kezdeti időszakban befolyásolhatja a DS-ek differenciálódását. Azt is kimutattuk, hogy az IL-4 ezt az átmeneti IL-7R α expressziót

gátolja. Az az IL-7R α időleges expressziójának okát és funkcionális szerepét ezidáig nem sikerült tisztáznunk.

5.2. Az IL-7 citokin szerepe a T-limfociták túlélésében és apoptózisában

A Fas receptor szerepét egér T-sejt hibridóma sejtek felhasználásával az antigén prezentáló sejtek és a T limfociták kapcsolatának kialakulását követő jelátviteli folyamatokban is vizsgáltuk. Eredményeink szerint az antigén prezentáló sejt egyedi sajátságai meghatározzák az effektor T limfociták aktivációjának mértékét és az effektor funkciók intenzitását, valamint szabályozzák az aktiváció indukálta sejthalál (AICD) mértékét is. E a vizsgálatokban a leghatékonyabb antigén prezentáló sejtnak a DS-ek és egy különleges, egyedi sajátságokkal jellemezhető B sejt bizonyult [3. és 8. közlemény].

Az IL-7 T sejtekre gyakorolt hatását vizsgálva új, nem várt eredményként mutattuk ki, hogy a citokin – bár elsősorban mint a naiv T-limfociták egyik fontos túlélési és osztódási faktora ismert – fokozza a perifériás vérből izolált T sejtek Fas receptor expresszióját. A fokozott Fas expresszió – melynek hátterében a Fas receptor ezrin-citoskeleton által közvetített polarizációja áll – ellenére azonban a T sejtek Fas-mediált apoptózist csak cikloheximid jelenlétében tudtuk kimutatni. Ugyanakkor a T sejtek anti-CD3 ellenanyaggal kiváltott aktivációja során az IL-7 jelenlétében fenntartott T sejtekben a Fas receptor kostimuláló szerepe fokozódott. A T sejt receptor (TSR) és a Fas molekulák együttes aktiválása csökkentette a cikloheximid jelenlétében kiváltott apoptózis mértékét. Kimutattuk azt is, hogy mind a cikloheximid jelenlétében kiváltott apoptózis mértéke, mind a Fas receptor kostimuláló hatása fokozottan érvényesül a memória T sejtekben. Eredményeink az IL-7 új, elsősorban a perifériás memória sejtekre gyakorolt apoptózist szabályozó hatását igazolják, melynek kiemelt szerepe van citopéniás és HIV fertőzött betegekben [9. és 17. közlemény].