

Naponta az emberi szervezet sejtjeinek milliárdjai halnak le természetes módon apoptózissal úgy, hogy ennek az egészséges szövetek homeosztázisában nincs kóros következménye: mind a hivatásos mind az egyéb szöveti sejtek az elhaló sejteket érzékelve azt felszínükhöz kötik, bekebelezik, majd csaknem nyomtalanul eleméztik. Az elhaló sejtek és az azokat bekebelező sejtek közötti kölcsönhatást, molekuláris sejt-felszíni mintázatot napjainkban harmadik (apopto-fagocita) szinapszisnak is szokás nevezni. A harmadik szinapszis működésének, szabályozásának, fiziológias és patológias szerepének megismerése igen kezdeti stádiumban van. Kutatási programunk ennek a viszonylag ismeretlen területnek a feltárását célozta több kísérletes megközelítéssel.

## A TRANZGLUTAMINÁZ KAPCSOLAT

A kísérletek kezdetekor abból az alapfeltételezésből indultunk ki, hogy az elhaló sejtek és az azokat eltávolítók között kölcsönös kommunikáció van a folyamat hatékonyságának biztosítására. A harmadik szinapszis működésének egyik általunk megismert meghatározó eleme a fehérjéket keresztkötő szöveti transzglutamináz (TG2), amelynek kifejeződését az elhaló sejtekből kiszabaduló, jelenleg még ismeretlen szignál molekula váltja ki a bekebelező sejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy fagocitáló sejtekből kiszabadulva az enzim aktiválja a TGF- $\beta$  molekulát, amely egyrészt visszahat a bekebelező sejtekre tovább előkészítve azt a hatékony fagocitózisra és a gyulladáshoz való válasz elkerülésére, másrészt hat az elhaló sejtekre is gyorsítva annak elhalását, megakadályozva a sejten belüli molekulák kiszabadulását. Megállapítottuk, hogy a transzglutamináz 2 knock out egerekben *in vivo* a tímuszban és a májban kiváltott fokozott apoptózist követően a sejtek bekebelezése jelentős mértékben késleltetett a kontroll vad típusú egerekhez viszonyítva (*Szondy és mtsai., PNAS. USA., 2003*). Az elhalt sejtek bekebelezésének késleltetettsége a transzglutamináz hiányos egerekben életkoruk előrehaladtával autoimmun válasz és reakciók kialakulásához vezet, többek között a vesében alakul ki ezeknek az egereknek az esetében egy éves korukra autoimmun károsodás. Legfrissebb eredményeink szerint a TG2 a TGF- $\beta$  módosításon túlmenően úgy befolyásolja a fagocitózis hatékonyságát, hogy részt vesz a citoskeletális rendszernek a fagocitózishoz szükséges, sejtmozgást biztosító összerendezésében. Mivel ismert, hogy a TG2 képes a rho molekulát poliaminok beépítésével módosítani, az egér sejt-kultúra apopto-fagocita rendszerünkben vizsgáltuk, hogy bekövetkezik-e ez apoptotikus sejtek felvétele közben. Eddigi eredményeink ezt nem támasztották alá, bár egyértelműen megállapítható, hogy a TG2 knock-out egerekből izolált makrofágokban az aktin citoskeleton rendezettsége zavart szenved; az utóbbi jelenség rho kináz inhibitorokkal normál egerek makrofágjaiban is reprodukálható volt.

Felvetődött annak lehetősége is, hogy a TG2-nek gének kifejeződését befolyásoló hatása áll az enzim fagocitózishoz játszott szerepe mögött. Megfigyeltük, hogy a promyelocita sejtek neutrofil és makrofág sejtekké történő differenciálódása során a TG2 indukciója bekövetkezik és a nagy kópiaszámban megjelenő enzim molekulák közel fele a sejt-magba vándorol, ahol magfehérjéket módosít és befolyásolja gének kifejeződését. Az egyik valószínűsíthetően TG2 által befolyásolt gén a NADPH oxidáz gp91<sup>phox</sup> alegysége; a TG2 gátlása valamint hiánya (knock out egerek) hatására jelentősen csökkent ezen gén kifejeződése, ennek következtében pedig a sejtek szuperoxid anion termelő képessége (*Balajthy és mtsai, Blood 2006*). Annak tisztázására, hogy melyek az intakt sejtekben biotinált kadaverinnel (a TG2 amin szubsztrátja, amit a sejtek felvesznek) módosított fehérjék, a jelzett fehérjéket avidin affinitás kromatográfiával tisztítottuk, két dimenziós elektroforézissel elválasztottuk, majd a biotinált fehérjéket kiemelve azokat szekvenciájuk megállapításával (MALDI, MS/TOF) azonosítottuk. Az eddig megismert szubsztrátok

(PCNA, nukleofozmin, TBP-vel kölcsönható fehérje) alapján egyértelműen felvetődik, hogy a transzglutamináz katalizálta folyamatok jelentős szerepet játszhatnak a gének kifejeződésének szabályozásában, beleértve a makrofágok fagocitózisát befolyásolókat.

A központi idegrendszerben elhaló sejtek eltávolítása a szöveti jellegzetességek miatt feltehetően komplexebb folyamat mint más szervekben. Különösen igaz ez a neurodegeneratív kórképekben, így Alzheimer betegségben, ahol szintén megfigyelhető a TG2 indukció és aktiváció miközben az idegsejtekben fehérje aggregátumok keletkeznek és az elhalóban lévő sejtek tartósan jelen vannak. Speciális technikákat használva izolálni tudtuk verifikált humán agymintákból (fiatalon, Alzheimer kóros, illetve korban illesztett elhaltak) ezeket az aggregátumokat és azokban meghatároztuk a transzglutamináz által létrehozott keresztkötések koncentrációját. Ez kifejezetten emelkedett volt az Alzheimer kórban szenvedőknél összehasonlítva az azonos korú, ebben a betegségben nem szenvedők mintáival. Azt is meg tudtuk határozni az aggregátumok proteolitikus emésztése, a keresztkötést tartalmazó frakciók kinyerése, majd MALDI/MS-TOF analízissel, hogy mely fehérjék mely oldalláncait kötötte keresztbe az enzim a feltehetően elhaló sejtekben. A keresztkötések alpha-synuclein, parkin, HSP27 és ubiquitin glutamin és lizin oldalláncok között alakulnak ki. Feltételezhető, hogy a lebontásra kerülő ezen fehérjék egy részét az aktiválódott TG2 keresztköti, ubiquitin oldalláncokat is bevonva a reakcióba, és ezzel stabilizálja az aggregátumokat, rezisztensé téve azokat a proteosómális degradációval szemben (*Nemes és mtsai, FASEB J., 2004*). Ezek a kísérleti eredmények különösen fontossá tették, hogy áttekintést adjunk a transzglutaminázok katalizálta lehetséges „transzglutaminálásokról”, azok kimutatásának és mérésének lehetőségeiről (*Nemes és mtsai, Anal. Biochem. 2005*) és az enzim ehhez szükséges szerkezeti tulajdonságairól (*Nemes és mtsai, Progr. Exp. Tumor Res. 2005*).

Amin-donor transzglutamináz szubsztrátokat *Caenorhabditis elegans*-ban (a természetes sejtelhálás és az apopto-fatgocitózis jelenség alapvető modell rendszere) is találtunk új biotinált oligoglutamin peptidet használva szubsztrátként (*Mádi és mtsai, BBRC, 2004*). A szubsztrátok között megtaláltuk a glutamát dehidrogenázt, a protein diszulfid izomerázt és az aldehid dehidrogenázt; ezek transzglutamináz-katalizált módosításának még nem találtuk meg a kapcsolatát a nematóda sejteltakarító molekuláris mechanizmusához. Mivel a transzglutamináz hatás egyértelműen köthető volt az apoptotikus sejtek fagocitózisához, fontosnak ítéltük, hogy álljon rendelkezésünkre új nagy áteresztőképességű és érzékenységgel bíró transzglutamináz aktivitást mérő módszer, amivel tudjuk nagyszámú betegmintában mérni az enzim aktivitását. Az általunk kidolgozott „scintillation proximity” módszer (*Mádi és mtsai, Anal. Biochem. 2005*) erre tökéletesen alkalmas.

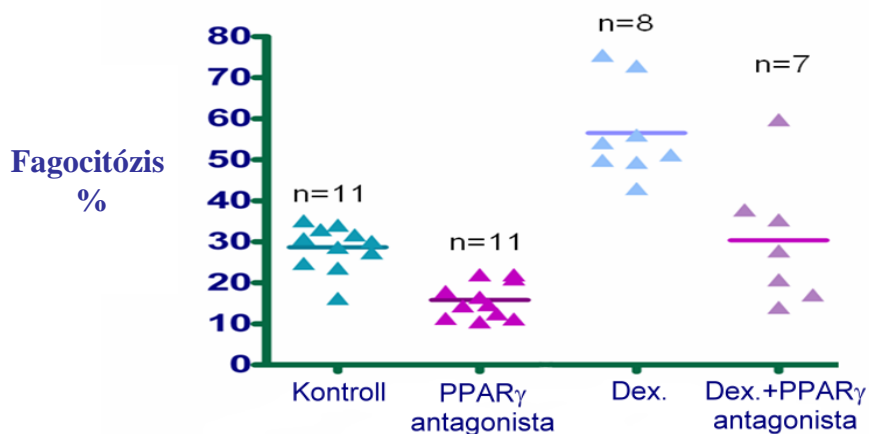
A TG2-nek az apoptózis molekuláris mechanizmusában játszott lehetséges szerepéről az utóbbi években több ellentmondásos közlemény jelent meg. Ezek feloldására azt a következtetésünket publikáltuk, hogy a TG2 szerepe tenyésztett sejtekben lehet mind pro-, mind anti-apoptotikus a sejttípustól, a sejthalált kiváltó jelátviteli útvonaltól, az enzim sejten belüli lokalizációjától és attól függően, hogy különböző biokémiai aktivitásai (fehérje keresztkötés/deamidálás/amin-módosítás, G fehérje hatás, protein diszulfid izomeráz, protein kináz) közül melyik kapcsolódik be (*Fésüs és Szondy, FEBS Letts., 2005*). Míg a fehérje keresztkötés/módosítás elősegíti a sejthalált és a sejtek hatékony eltávolítását, addig a TG2 G fehérje funkciója az apoptózis bekövetkezése ellen hat. Az utóbbira közvetlen *in vivo* bizonyítékokat is szereztünk. Megállapítottuk, hogy a májban a Fas receptor jelátviteli úton bekövetkező hepatocita elhalással szemben a TG2 védő hatása, a TG2 knock out egerek sokkal érzékenyebbek a Fas elleni antitesttel kiváltott, egyébként az állatok elhalásával is járó tömeges hepatocita apoptózisra (*Sarang és mtsai, Hepatology 2005*). Ennek az oka az, hogy TG2 hiányában nem működik megfelelően az adrenerg jelátviteli útvonal (itt a TG2 G fehérjeként szerepel) amely normál körülmények között fenntartja a sejtek védelméhez

szükséges Bcl-x<sub>L</sub> szintet. Azt tapasztaltuk, hogy a TG2 knock out egerek a normál, vad típusú egerekhez képest sokkal érzékenyebbek az oxigénhiánnyal járó szöveti elhalásra is. A szív koronária elzárást követő reperfúzió hatására sokkal nagyobb a szöveti elhalás TG2 hiányában mint jelenlétében. Ennek magyarázata pedig abban van, hogy a mitokondrium respirációs lánc ATP termelése jelentősen alacsonyabb a TG2 hiányában, konkrétan itt a TG2 terminális oxidációs lánc komplexeit összerendezni segítő protein diszulfid izomeráz aktivitása hiányzik (Szondy és mtsai, *Cell Death and Differ.* 2006).

## TRANSZKRIPCIÓ SZABÁLYOZÁS

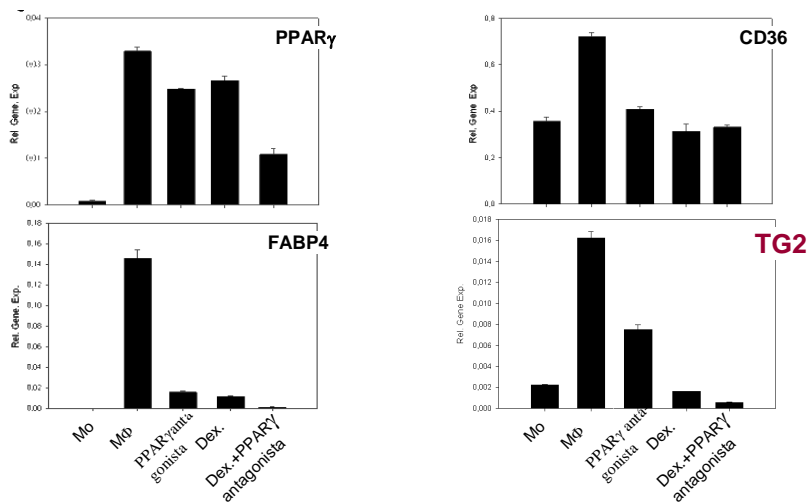
Kísérleteink során kiderült, hogy a PPAR $\gamma$  receptor szerepet játszik a makrofágok érése során az apoptotikus sejteket eltávolító fagocitáló képesség kialakításában. Bár PPAR $\gamma$  ligandokkal nem tudtuk fokozni a humán makrofágok spontán módon elhaló humán neutrofil sejteket felvevő képességét, az ezen magreceptort gátló, az azt inaktíváló antagonisták hatására azonban jelentősen csökkent a fagocitózis hatékonysága. Ehhez a hatáshoz a PPAR $\gamma$  antagonistának jelen kellett lennie a humán monociták makrofággáérésének teljes időtartama alatt. Kiderült, hogy a glükokortikoid dexametazon ebben a rendszerben már korábban megfigyelt apoptózist fokozó hatását is képes gátolni a PPAR $\gamma$  hatás blokkolása (Májai és mtsai, *J. Immunology* 2006, közlésre benyújtva).

### A PPAR $\gamma$ antagonista jelenléte a humán makrofágok érése során csökkenti azok képességét apoptotikus sejtek fagocitózisára



Azt is meg tudtuk mutatni, hogy milyen célgének indukálódnak a PPARgamma hatására a differenciálódó makrofágokban. A monocita makrofággá érése során indukálódik maga a PPAR $\gamma$  is, és annak célgénje az FABP4 (jelezve hogy a PPAR $\gamma$  aktív). A CD36 és a CD14, két fagocitózisban szerepet játszó felszíni molekula kifejeződése jelentősen csökkent PPAR $\gamma$  antagonista jelenlétében ahogy azt az általunk kidolgozott Q-PCR assay-k, illetve FACS analízissel kimutattuk. A TG2 kifejeződés szintén csökkent (szintén Q-PCR, illetve Western blot eredmény).

**PPAR $\gamma$  antagonistista hatása humán PPAR $\gamma$ , FABP4, CD36 és TG2  
génjeinek kifejeződésére makrofágok**



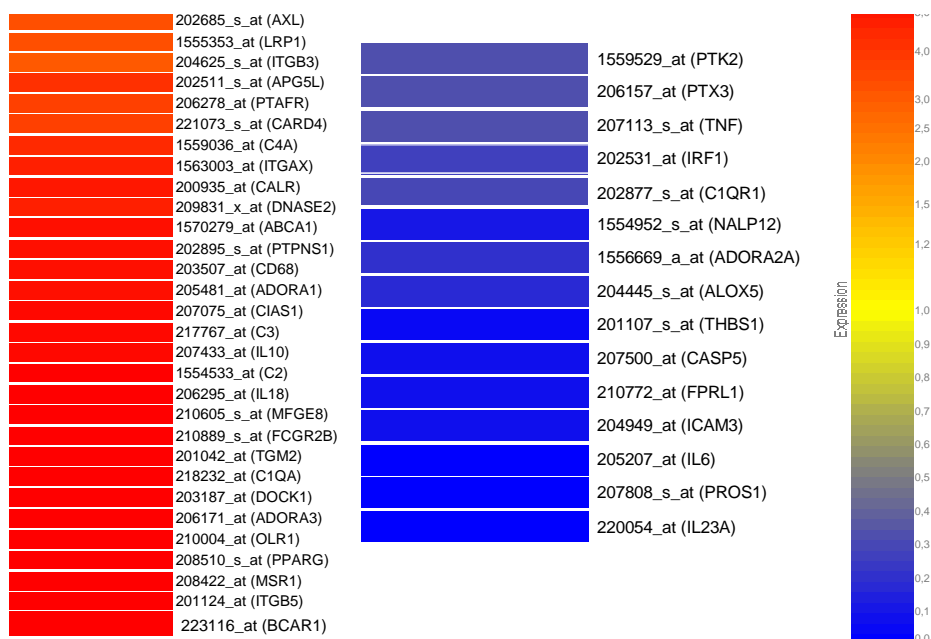
A következő kérdésünk az, hogy mi a PPAR $\gamma$  endogén ligandja a makrofágok differenciálódása során? Ennek felderítését analitikai módszerekkel szintén elkezdtük. A projekt eddigi munkái során számos modellrendszerünkben kezdtük el keresni azokat a lipid természetű molekulákat, amelyek az apoptotikus sejtekből felszabadulva hatnak az azokat fagocitáló sejtekre fokozva azok bekebelező hatékonyságát. Kísérleteink kezdeti szakaszában ilyen hatást nem tudtunk kimutatni apoptotikus sejtek felülűszójából vagy az azokból készült preparátumokkal. Ezért érzékenyebb módszert kerestünk. Q-PCR assay-eket dolgoztunk ki apoptózis és fagocita génekre és ezekkel vizsgáljuk a sejtek válaszadó képességét. Ezen kísérleteinkben egyértelműen kimutattuk, hogy az elhaló sejtek felülűszója tartalmaz olyan molekulákat, amelyek hatására indukálódnak a fagocitózisban résztvevő gének. Így tehát rendelkezésünkre áll az a szűrő rendszer, amelynek segítségével (é a nemrégiben kiépített lipid analitikai rendszerünkre támaszkodva) megkísérelhetjük azonosítani az apoptózissal elhaló sejtekből kiszabaduló, fagocitózist szabályozó molekulákat. Ennek a feladatnak az elvégzése túlmutat a lezárt kutatási perióduson éppen a technikai nehézségek miatt valamint tekintettel a PPAR $\gamma$  széles kölcsönhatási képességére többféle lipid természetű liganddal.

A koleszterol felvétel és leadás (többek között a nagy tömegű elhalt apoptotikus sejtekből) alapvető jelentőségű a makrofágok működésében és az érlelmeszesedés kialakulásában. Az LXR $\alpha$  (Liver X Receptor) és a PPAR $\gamma$  fontos szerepet játszanak ezen folyamatok szabályozásában. Az azonban még tisztázásra várt, hogy ezen receptorok aktiváltsága hogyan kapcsolódik egymáshoz és milyen endogén lipid molekulák vesznek részt ennek szabályozásában. Azonosításra került a CYP27, egy p450 enzim, mely kapcsolatot teremt a PPAR $\gamma$  és az LXR útvonlak között (Szántó és mtsai, *Mol. Cell. Biol. és Cell Death and Differ.*, 2004, ). Megmutattuk, hogy az emberi CYP27 gén PPAR $\gamma$  aktivátorok és retinoidok együttes komplex szabályozása alatt áll. Az enzim indukcióját a termék, a 27-hidroxikoleszterol szintjének az emelkedése kíséri, ami aktiválja az LXR transzkripciós faktort, és ez az LXR-függő koleszterol leadás növekedéséhez vezet. A megnövekedett CYP27 enzimaktivitás ugyanakkor egy LXR-től független leadást is aktivál: a CYP27 metabolitjai transzporter nélkül, passzívan kiáramlanak megvalósítva ezzel az alternatív koleszterol leadást. Szintén megmutattuk, hogy emberi, makrofágban gazdag, érlelmeszesedő lézióban emelkedett a retinsav receptor, a PPAR $\gamma$  és az LXR transzkripciós faktorok szintje,

ezek célgénjeinek szintje és a CYP27 kifejeződése is. Eredményeink azt mutatják, hogy a magreceptorok által szabályozott CYP27 kifejeződés lehet összekötő kapocs a retinsav receptor, a PPAR és az LXR szignál rendszerek között és hogy természetes vegyületek, mint a retinsav, oxidált zsírsavak képesek elindítani azt a folyamatsort, mely végül két független módon koleszterol kiáramláshoz vezet a makrofágokból. Ennek fontosságát aláhúzza, hogy a sejtmembránok koleszterol szintjének emelkedése csökkentti az apoptotikus sejtek fagocitózist (a munkacsoport még nem publikált eredménye).

Az apopto-fagocita rendszer transzkripciós szabályozása részleteinek megismerésére Taqman Low Density Array-t (TLDA) terveztünk és készítettünk, amely egyszerre 94 apoptotikus sejtek eltávolításában résztvevő gének nézi adott RNS mintából a kifejeződését pontosan meghatározva az adott gének RNS-ének koncentrációját. A vizsgált gének kiválasztását saját kísérleti eredményeinkre és az irodalmi adatokra alapoztuk. Beemeltük közéjük az adenosin receptorokat is, mert legutóbbi eredményeink szerint az adenosina tímuszban jelentős szerepet játszik a sejtelhálás és sejtek eltakarításának szabályozásában (Tóth és mtsai, *Eur. J. Immunol.* 2006) A TLDA hatékonyságát jól mutatja a monocita és az abból differenciáltatott makrofágok közötti génkifejeződési különbség.

### Az apopto-fagocita gének kifejeződésének változása (növekedés, illetve csökkenés) a makrofágokban monocitákhoz viszonyítva Taqman Low Density Array vizsgálat alapján



A TLDA-t több apopto-fagocita kísérleti rendszerben hasznosítottuk. Ezek közül kiemelkedik az a kísérlet sorozat, amelynek során autofágiával elhaló sejtek fagocitózist tanulmányoztuk. Az emberi emlő epitheliális sejtek 8MCF-7) éheztetés és tamoxifen hatására hatására jelentős mértékű autofágiát és következményes sejtelhálást mutatnak. Amikor ugyanezek a sejtek nem adhezív szubsztrátra kerülnek anoikisz-szel hálnak el, amely felgyorsítja az autofágiát mind tamoxifen jelelntében mind anélkül. Jelentős új

megfigyelésünk, hogy mind a *de novo* mind az anoikisz eredetű autofágiás sejteket fagocitálni tudják mind a humán makrofágok mind a nem elhaló MCF-7 sejtek (*Petrovski és mtsai, Cell Death and Differ. 2006, közlésre beküldve*). Ugyanakkor csak az előbbieket fagocitózist lehet gátolni az autofágia blokkolásával. A különbség megnyilvánul génkifejeződési mintázatokban is. Míg az autofágiával elhaló sejtek fagocitózisa során a makrofágokban a pentraxin, az adenosin 2 receptor, az oxidált LDL, az aszialoglikoprotein receptor és a trombospondin indukálódik, addig az anoikisz-szel elhaló sejtek bekebelezésekor a C1q receptor, az MFGE8 molekula, a rac-1 és a DNáz I. Ez azt jelenti, hogy az apopto-fagocita szinapszisban a bekebelezett elhaló sejtől függően más és más fagocitózis mechanizmusok indukálódhatnak, vagyis új lehetőségek nyílnak többek között a gyulladásos folyamatok (amely végül a granulociták fagocitózisaival „tisztul fel”) terápiás befolyásolására.

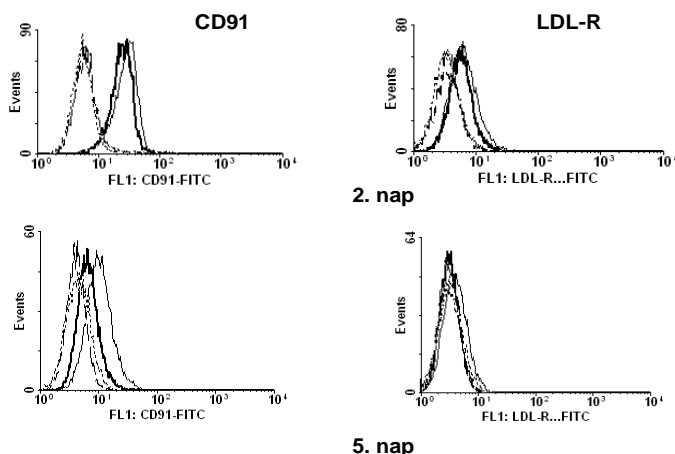
## A DENDRITIKUS SEJTEK ÉS AZ IMMUNVÁLASZ

A szöveti környezetben kis számban jelenlévő dendritikus sejtek olyan szöveti szenzorok, amelyek környezetükből pino- és makropinozitózis révén folyamatosan vesznek fel anyagokat és a makrofágokhoz hasonlóan hivatásos fagocitaként is működnek. Azt találtuk, hogy a PPAR $\gamma$  kifejeződése nagy mértékben felerősödik a monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódása során; sejtfelszíni receptorok kifejeződése megváltozott, a fagocitáló képességük nőtt amikor a receptort ligandjaival aktiváltuk. Az is kiderült, hogy a ennek hatására a saját és az idegen lipid molekulák prezentációjában résztvevő CD1 glükoproteinek koordinatív módon szabályozódnak. A CD1a szint csökkent, a CD1d kifejeződés nőtt. A CD1d indukciója együtt járt a dendritikus sejtek autoreaktív natural killer T sejteket (iNKT) aktiváló képességének megjelenésével alfa-GalCer jelenlétében. Ezeknek az eredményeknek az ismeretében feltételezhető, hogy a PPAR $\gamma$  aktiváció olyan transzkripció folyamatokat indít el a dendritikus sejtekben, amelynek hatására belőlük fokozott fagocitózisa, hatékony lipid prezentációra és iNKT aktivitásra képes alpopuláció alakul. Megfigyelésünknek jelentős klinikai vonatkozásai vannak, amennyiben a CD1d -NKT kapcsolható autoimmun folyamatok, így 1. típusú diabetes kialakulásához (*Szatmári és mtsai., Immunity 2004*).

Makrofágok vagy/és DS-ek jelenlétében tanulmányozzuk az apoptotikus sejt felvételt, a DS aktivációt, a gyulladásos és az azt gátló folyamatok elindulását. Az apoptotikus sejtek szöveti eredete, egyedi sajátosságai, az apoptózist kiváltó stimulusok természete (UV/ $\gamma$  besugárzás, vírusfertőzés, malignitás) hatással lehet a felvétel hatékonyságára és az immunológiai tolerancia vagy a gyulladásos folyamat kialakulására (*Májai és mtsai. Immunol. Letts. 2006*). Apoptotikus sejtekben a kaszpáz-1 aktiváció eredményeként biológiailag aktív IL-1 $\beta$  és IL-18 szabadulhat fel, ami gyulladásos folyamatot válthat ki. A stressz által kiváltott HSP indukció elősegíti a tumorantigének DS-ek általi bemutatását. Az apoptotikus tumor sejtekből IL-10 és TGF $\beta$ 1 is felszabadulhat, ami gátolja a gyulladást. Vizsgálatainkban különböző apoptotikus/nekrotikus sejtek felhasználásával vizsgáltuk a felvétel határfokát és a DS aktivációt. Ezek az eredmények felhasználhatók a DS-ek tumor ellenes immunterápiás alkalmazása során.

Vizsgálatainkban tovább jellemeztük a monocita eredetű dendritikus sejtek lipid és/vagy apoptotikus felvételben résztvevő receptorait. Igazoltuk, hogy a CD36 scavenger receptor mellett a monocita eredetű DS-ek LDL-receptort és CD91 molekulát is hordoznak:

**Lipid és apoptótikus sejt felvevő receptorok megjelenésének kinetikája monocita eredetű dendritikus sejteken**



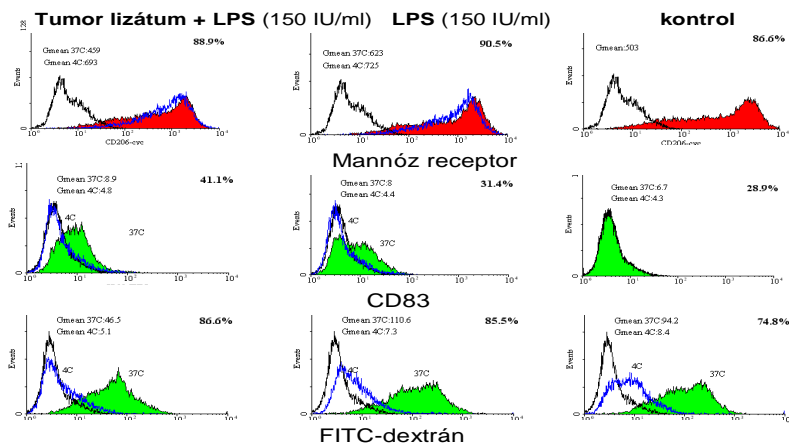
A dendritikus sejtek apoptótikus/nekrotikus sejtekkel való „feltöltéséhez” három eltérő *in vitro* vizsgálati rendszert alkalmaztunk:

a) A monocitából kiinduló dendritikus sejt differenciáció során a kiindulási sejtszám ~50%-a nyerhető vissza (>70 donor vizsgálata alapján), amiből arra következtettünk, hogy a folyamat során a sejtek fele apoptózissal/nekrozissal elpusztul. Eredményeink azt igazolták, hogy a monocita eredetű dendritikus sejtek CD1a- alpopulációja jelentősen hatékonyabb a módosított lipidek – és feltételezhetően az apoptótikus sejtek – felvételében, mint a CD1a+ sejtek. Annak vizsgálatára, hogy a differenciálódó sejtek tolerogén vagy inflammatórikus sajátosságúak, CD40 ligand aktiválást követően hasonlítottuk össze a CD1a- és CD1a+ sejtek citokin termelését. Eredményeink szerint mindkét sejtpopuláció azonos mennyiségű biológiailag aktív TGF-beta citokint termel, de többféle citokin mérési eljárással igazoltuk, hogy a CD1a- sejtek szignifikánsan kevesebb IL-12, és több IL-10 citokint termelnek, mint a CD1a+ sejtek. Ennek alapján a saját sejtek bekebelezése a tolerancia irányába polarizálja a dendritikus sejteket.

b) A tumorsejtek elleni immunválasz kiváltásának egyik fő akadály a tumor ellenes tolerancia kialakulása, aminek hátterében a tumorsejtek nagyfokú saját sejtekhez való hasonlósága, a gyulladásos folyamatok hiánya és a tumorsejtek által termelt faktorok toleranciát indukáló hatása áll (*Gogolák és Rajnavölgyi, Immunogenomics and Human Disease, 2005*). A tumorsejt felvétel hatásának vizsgálatára nekrotikus primer tumorsejtekből származó teljes sejt lizátum hatását vizsgáltuk a dendritikus sejtek mannóz receptor-mediált dextrán felvételére és aktivációjára. A dendritikus sejtek a monocitákhoz és makrofágokhoz hasonlóan hatékonyan aktiválhatók LPS-dal, de az aktiváció dózis függése jelentősen eltér a másik két sejt típusétól. Továbbá dendritikus sejtekben – a makrofágokkal ellentétben – LPS hatására csökken a fagocita és internalizáló képesség, míg egyes Toll-like receptorok (TLR3, TLR5) által közvetített aktiváció fokozza a tumor ellenes immunválasz kiváltásában szerepet játszó „kereszt prezentáció” hatásfokát. A tumorelles immunválasz terápiás hatékonyságának fokozása céljából azt vizsgáltuk, hogy az LPS valamint a nekrotizált tumorsejtek lizátuma és az LPS együttes hatása hogyan befolyásolja a dendritikus sejtek dextrán felvételét és aktivációját. Eredményeink azt igazolták, hogy az LPS dóziszfüggően kiváltja a dendritikus sejtek aktivációját, amit a CD83 sejtfelszíni marker megjelenése alapján követtünk. Ez a hatás 150 IU/ml LPS dózis mellett kimutatható, de 30 IU/ml LPS dózis mellett nem detektálható. Ebben a dózis tartományban azonban nem változott a mannóz receptor (MR) membrán kifejeződése és a MR-közvetítette dextrán felvétel sem. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a nekrotikus tumorsejtekből származó teljes sejt lizátum kismértékű aktivációs jelekkel kombinálva hatékony

módszer a dendritikus sejtek tumor antigénekkal való feltöltésére, aktivációjára és a hatékony immunválasz kiváltására.

#### Nekrotikus tumorsejt lizátum felvételét követő változások dendritikus sejtekben

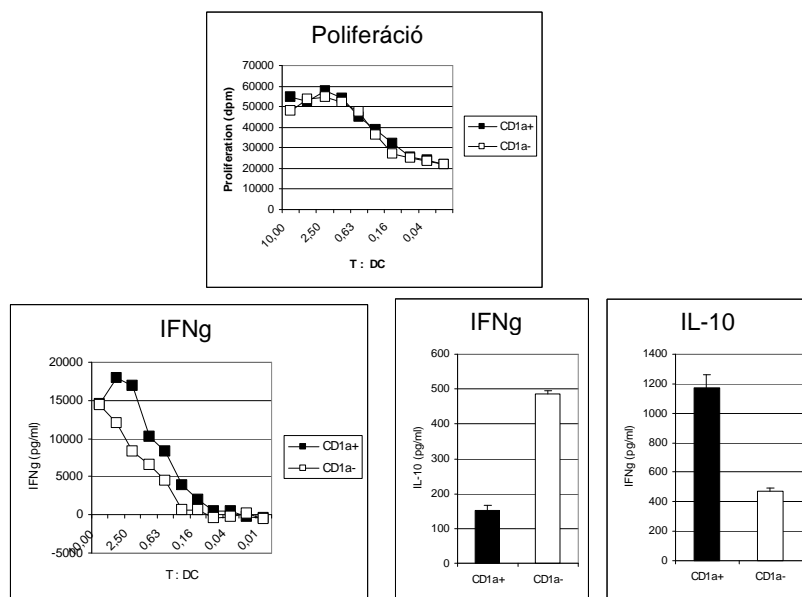


Vizsgáltuk a DS-ek T limfocita aktiváló képességét különböző eredetű és eltérő hatásra elhaló sejtek felvételét követően (*Gogolak és mtsai, J. Mol. Recognition 2003*). Az aktivált DS-ek – a makrofágokhoz hasonlóan – hivatásos APS-ek, amelyek kitüntetett szerepet játszanak a CD4+ segítő (helper) T limfociták aktiválásában, polarizálásában, effektor sejté történő differenciálásában. A Th sejtek differenciációja – az APS tulajdonságaitól függően – Th1 és/vagy Th2 effektor sejtek kialakulásához is vezethet, ezek aránya meghatározó a gyulladásos folyamatok kialakulásában. A DS-ek egyedi sajátága, hogy a Th1 sejtekkel való kölcsönhatás eredményeként alkalmassá válnak a CD8+ naív T limfociták aktiválására és a citotoxikus effektor sejtek (Tc) képződésének elősegítésére. *In vitro* kultúrákban autológ T limfociták felhasználásával mértük az antigént hordozó apoptotikus sejtekkel feltöltött makrofágok és DS-ek T sejt aktiváló képességét, a Th1 (IFN $\gamma$ , IL-2) és a Th2 (IL-4, IL-13) sejtekre jellemző citokinek koncentrációját.

Vizsgálatainkban a CD1a- és CD1a+ sejteket áramlási citometriával szétválasztottuk, majd nem saját, allogén T-limfocitákkal tenyésztettük együtt. Irodalmi és saját eredményeink szerint az allogén DS-ek mind a CD4+ segítő, mind pedig a CD8+ citotoxikus T-limfocitákat is aktiválják. A citotoxikus T-limfociták viszont a célsejtek (adott esetben az allogén DS-ek) apoptózist majd nekrozist váltják ki. Vizsgálatainkban a CD1a- és CD1a+ dendritikus sejtekkel stimulált allogén T-limfocita kultúrákban CBA és ELISA módszerrel mértük a T-sejt aktiváció hatásfokát és a termelt citokinek összetételét. Ebben a rendszerben nem találtunk különbséget a CD1a- és CD1a+ dendritikus sejtek T-sejt proliferációt indukáló képességében, de a kétféle DS citokin termelésével összhangban a citokin szintekben jelentős eltérést tudtunk kimutatni. Három nappal a T-sejt aktivációt követően IL-2 és IL-4 citokinek a felülűszóben nem tudtunk kimutatni (feltehetőleg az osztódó sejtek felhasználták ezeket a növekedési faktorok), de a CD1a- dendritikus sejtek által kiváltott allogén válasz során kevesebb IFN-gamma és több IL-10 termelődött, mint a CD1a+ sejtek által kiváltott allogén válasz során.



## Aktivált CD1a- és CD1a+ dendritikus sejtek allogén T-limfocita aktiváló képessége



Eredményeink azt mutatják, hogy a DS-ek kölcsönhatása apoptotikus vagy nekrotikus sejtekkel illetve az azokból kiszabaduló komponensekkel – más környezeti tényezőkkel együtt hatva – képes az immunválasz finom szabályozására.

Az antigén prezentálás szorosan összefügg a negatív szelekció jelenségével, vagyis a autoreaktív timociták szelektív eltávolításával. A retinsav korábbi eredményeink szerint gátolja a T sejt receptor közvetített apoptózist miután kölcsönhatásba lép az RAR $\alpha$  receptorával. Kimutattuk, hogy ez a jelenség *in vivo* is bekövetkezik, vagyis az RAR $\alpha$  szabályozza a negatív szelekciót (Szegezdi és mtsai, *J. Immunol.* 2003) és hogy a retinoidok hatására gátódik a nur77 molekula DNS kötődése (a negatív szelekció során a T sejtekben bekövetkező egyik kritikus molekuláris történés) valamint a bim pro-apoptotikus fehérje szintézise.

### Összefoglalva:

*Az OTKA Tudományos Iskola nyújtotta támogatással eddig nem művelt, a sejtkémiai, immunbiológiát, genomikát, pathobiokémiát összekötő, interdiszciplináris kutatási területet tudunk nyitni Debrecenben. Az apoptotikus sejtek jól szabályozott és hatékony eltávolításának új molekuláris részleteire derült fény, emberi és az egér apopto-fagocita modell rendszerek megismerése és tanulmányozása segítségével kóros folyamatok tisztázására került sor, a makrofágok és dendritikus sejtek komplex működésének újabb elemeit sikerült tisztázni, jelentős publikációk, új módszerek, további munkahipotézisek születtek.*