

**Megnövekedett fagocitózis és gyulladásoos válasz glükokortikoid kezeléso
hatására humán dendritikus sejtekben**

Hodrea Judit

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2011

Megnövekedett fagocitózis és gyulladáshoz vezető válasz glukokortikoid kezelés hatására humán dendritikus sejtekben

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta:

Hodrea Judit, okleveles vegyész

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

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora
Dr. Vellai Tibor, Ph.D., az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2011. november 29. - 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
Prof. Dr. Ian Dransfield, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
Prof. Dr. Ian Dransfield, Ph.D.
Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora
Dr. Vellai Tibor, Ph.D., az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2011. november 29. - 13 óra, a Debreceni Egyetem OEC

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. Bevezetés

Az immunológia tudományterülete, mely jelenleg is folyamatosan növekszik, számos kutatót vonz. Munkájuk eredményeként jobban megismerhetjük a betegségek molekuláris mechanizmusait, amelyek új és hatékonyabb kezelések kifejlesztésére adnak lehetőséget. Ezen kutatási terület népszerűségét jól tükrözi az is, hogy 2011-ben az orvosi és élettani Nobel Díjat az immunológia élvonalában dolgozó kutatóknak ítélték oda: Bruce Beutlernek és Jules Hoffmann-nak „a veleszületett immunitás területén született felfedezéseikért”, illetve Ralph Steinmann-nak „a dendritikus sejtek felfedezésért és az adaptív immunválaszban játszott szerepük leírásáért”.

A dendritikus sejtek (DS), mint az immunválasz szabályozói, joggal érdemelték meg ezt a megkülönböztetett figyelmet. Legelőször, 1868-ban Paul Langerhans a bőr epidermiszében figyelte meg és írta le őket, még orvostanhallgató korában. Nyúlványai miatt azonban azt gondolta, hogy a sejtek az idegrendszerhez tartoznak. A dendritikus sejt nevet, Ralph Steinmann és Zanvil Cohn adták 1973-ban, akik a fehérvérsejtek egy különleges altípusaként azonosították a DS-t. Mára ezek a sejtek az immunoterápiák és oltóanyagok célpontjai lettek. Ki gondolta volna, hogy a tudás ezen sejtekről olyan gyorsan növekszik, hogy maga a felfedezőjük is részesül dendritikus sejt alapú immunterápiában?

1.1. A dendritikus sejtek és funkcióik

A dendritikus sejtek hematopoetikus őssejtekből alakulnak ki. Profeszionális fagocitasejtek és a leghatékonyabb antigén prezentáló sejtek, melyek valamennyi szövetben, a limfoid és nem-limfoid szervekben fordulnak elő. Nevüket ágas-bogas nyúlványaik (görögül dendron = fa) után kapták, amelyeknek köszönhetően, a sejt méretéhez képest, nagy felületen érintkeznek a környezetükkel.

A DS-et számos mintázatfelismerő receptor (Toll-like, RIG-I like és NOD-like) segíti az antigének felismerésében. E mellett a DS a sejt felszínükön citokin és kemokin receptorokat, valamint C-típusú lektin receptorokat is expresszálnak, melyek szintén a patogének felismerésében játszanak szerepet. Az antigénnel való találkozás előtt a DS úgy nevezett éretlen (immature) állapotban vannak, melyet magas fagocitáló képesség, alacsony MHC és kostimuláló fehérjék (pl. CD80, CD86) expressziója jellemez. Az antigén felvétele fagocitózis, makropinocitózis vagy receptor mediált endocitózis révén történhet meg. Az apoptotikus sejtek fagocitózisa az éretlen dendritikus sejtek jellemzője, és az $\alpha_v\beta_5$ integrinek, a CD36 és az MFG8 molekulák részvételével történik DS esetében.

Az antigének felvételét ezek feldolgozása és az antigén bemutatás követi, az MHC I és II molekulákon keresztül. A dendritikus sejtek az érési szignálokra, melyek származhatnak patogénektől vagy gyulladási ingerektől, megváltoztatják a kemokin receptoraik kifejeződését, és a perifériáról a nyirokszervekbe vándorolnak, miközben érési folyamaton mennek keresztül. Az érett DSet alacsony fagocitózis képesség valamint magas MHC és kostimulatorikus molekulák expressziója, illetve citokinek termelése jellemző. Ezen folyamatok eredményeként indukálódhat az antigén specifikus immunválasz, amely a T sejtek proliferációjához valamint ezen sejtek segítő illetve effektor sejtekké való differenciálódásához vezet.

A DS azonban képesek nem csak T sejt immunitást, de T sejt toleranciát is indukálni. Azt, hogy az immunválasz e kettő közül melyik irányba indul el, a patogének, a kostimulációs molekulák és a citokin környezet jelenléte dönti el. Amennyiben az apoptotikus sejtekből származó antigéneket a CD8⁺ T sejteknek az MHCI molekulák révén mutatják be a folyamatot kereszt-prezentációnak hívjuk. Ennek eredményeként a citotoxikus T sejtek aktiválódnak, szerepet játszva a vírusok és tumorok elleni immunválaszban.

A DS a B sejtekkel való interakciójuk eredményeként a humorális immunválaszt is képesek indukálni. A plazmocitoid DS, INF1 és IL-6 citokinek révén indítják el a B sejtek differenciálódását effektor plazma sejtekké.

In vitro körülmények között a DSet CD34⁺ progenitor sejtekből differenciáltatják GM-CSF (granulocita makrofág kolóniastimuláló faktorról) és tumornekrózis faktorról (TNF α) vagy IL-13 citokin jelenlétében. A leggyakrabban használt *in vitro* differenciációs protokoll, mellyel monocita eredetű DS differenciálthatók, a GM-CSF és IL-4 segítségével történő differenciáció. Ennek eredményeként egy heterogén sejtpopulációt kapunk, mely CD1a⁺ és CD1a⁻ altípusú sejteket tartalmaz. A CD1a membrán fehérje, amely a lipidek bemutatásában játszik szerepet és ugyanakkor egy gyakran használt DS marker is.

Mivel a DS kulcsfontosságúak a T sejt mediált immunitásban kiemelt célpontok az oltóanyagok fejlesztésében és az immunterápiás kutatásokban.

1.2 Apoptotikus sejtek eltakarítása

A szervezet természetes folyamatainak egyik következménye, hogy naponta több milliárd sejt pusztul el, beleértve az idősödő a sérült és fertőzött sejteket. Fiziológias körülmények között ezen események térben és időben szabályozott módon következnek be, a programozott sejtihalál, azaz apoptózis, folyamatán keresztül.

Az apoptózis a legjelentősebb programozott sejtihalál típus, nélkülözhetetlen a

fejlődéshez és a szöveti homeosztázis fenntartásához. Fejlődés során szerepet játszik a szöveti struktúrák kialakulásában és a felesleges sejtek elpusztításában. Az öregedő és sérült sejtek apoptózis által pusztulnak el, mielőtt a szervezetet károsíthatnák. Morfológiailag az apoptózist a sejt legömbölyödése, a sejtmag kondenzációja és fragmentációja és a plazmamembrán blebbing-je, de integritásának megőrzése jellemzi. Csökken a sejt térfogata, visszavonja nyúlványait és a citoplazmatikus organellek morfológiája kis mértékben változik.

Az apoptotikus sejtek gyors és hatékony eltakarítása fontos szerepet játszik a szöveti homeosztázis fenntartásában valamint a gyulladás felszámolásában, mivel nem kerül sor a sejt tartalmának kiömlésére, amely károsíthatná a környező sejteket. Az eltakarításban részt vesznek mind professzionális fagociták (makrofágok és dendritikus sejtek), mind nem professzionális fagociták, például szomszédos sejtek, endotél vagy epitél sejtek.

Az apoptotikus sejtek felvétele igen komplex és jól szabályozott folyamat, amely négy lépésre osztható. Első lépésként az apoptotikus sejtek oldékony kemoattraktánsokat bocsátanak ki, melyek odavonzák a fagocitákat. Második lépésben az apoptotikus sejtek specifikus felismerése történik, amit a bekebelezésük követ. Az egyik legfontosabb szignálmolekula a foszfátidilzerin, amely kizárólag az apoptotikus sejtek felszínén jelenik meg. Számos más molekula is szerepet játszik az apoptotikus sejt felismerésében, amelyek különböző szignál útvonalakat indukálva a bekebelezést eredményezik. Ezt követően a bekebelezett sejt komponensei lebomlanak aminosavakra, nukleotidokra és zsírsavakra, melyekből később új makromolekulák lesznek.

Az apoptotikus sejtet fagocitáló makrofágok gyulladáscsökkentő mediátorokat termelnek és csökkentik a proinflammatorikus citokin termelésüket, ezáltal az apoptotikus sejt bekebelezése nem vonja maga után az immunrendszert aktiválódását. Amennyiben az apoptotikus sejtek eltávolításában zavar keletkezik, azok másodlagos nekrozison mennek keresztül és a sejtösszetevők az extracelluláris térbe ürülnek, amely erős gyulladási választ vált ki. Az apoptózis és a nekrosis közötti alapvető különbség tehát az, hogy az előbbi gyulladáscsökkentő, míg az utóbbi gyulladási immunválaszt vált ki, amint azt főleg makrofágokon végzett kísérletekben kimutatták.

Kimutatták, hogy az apoptózis folyamatában bekövetkező molekuláris hibák megváltozott immuntoleranciához és autoimmun betegségek kialakulásához vezetnek, például SLE-hez atheroszklerózishoz, neurológiai és daganatos megbetegedésekhez. A szervezet természetes folyamatainak egyik következménye, hogy naponta több milliárd sejt pusztul el, beleértve az idősödő a sérült és fertőzött sejteket. Fiziológiai körülmények között ezen események térben és időben szabályozott módon következnek be, a programozott sejtihalál, azaz apoptózis, folyamatán keresztül.

1.3. Glükokortikoidok

A glükokortikoidok (GC) kisméretű, lipofil szteroid hormonok, melyek hatásukat az intracelluláris glükokortikoid receptorokon keresztül fejtik ki. Ezen receptorok a magreceptorok családjába tartoznak, ligand nélkül a citoplazmában találhatóak, hőszokkfehérjékhez kapcsolt állapotban. Ligand hatására a glükokortikoid receptor leválik és transzlokálódik a magba, ahol közvetlenül vagy közvetve számos gén expresszióját befolyásolja.

Endogén glükokortikoid kortizol formában termelődnek a mellékvesekéregben, a hipotalamikus hipofizeális mellékvese tengely stimulálásának hatására (fertőzések, gyulladások, fájdalom és stressz). A kortizol anyagcserére kifejtett hatásain túl (vércukorszint növekedés, glükoneogenezis és aminosavak valamint zsírsavak mobilizálása), az endogén glükokortikoidok az immunválasz szabályozásában is részt vesznek.

A GC széleskörűen alkalmazott gyógyszerek, melyeket autoimmun, krónikus gyulladásos, allergiás betegségekben, limfomákban és leukémiákban használnak erős immunuszuppresszív hatásuk miatt. Jellegzetes mellékhatásaik az oszteoporózis, izomgyengeség, bőrrátrófia és inzulinrezisztens diabétesz. A GC terápiás hatását kezdetekben kizárólag a T sejtekre gyakorolt hatásukkal magyarázták, képesek ezekben a sejtekben apoptózist indukálni, gátolni számos T sejt eredetű citokin termelését, valamint indukálják a regulatórikus T sejtek alpopulációját, amint azt *in vitro* és egér kísérletekben kimutatták.

Azonban, számos vizsgálat bizonyította, hogy a GC egyéb immunsejtekre is hatást gyakorolnak, sejttípustól függően. Például, humán monocitákban a GC antiapoptotikus hatásúak, favorizálják egy antiinflammatórikus altípussá való differenciálódásukat miközben fokozzák az apoptotikus sejtfelevételt. A DS-ben a GC jelenléte tolerogén fenotípus differenciálódását eredményezi, valamint gátolják az aktiválódásukat. *In vivo* kísérletekben kimutatták, hogy gátolják a DS nyirokszervek felé való migrációját. Noha ismert, hogy a mannóz receptor mediált endocitózist a GC fokozzák, mindazonáltal az apoptotikus sejtek fagocitózisára gyakorolt hatását dendritikus sejtekben még nem vizsgálták. Korábbi eredményeink szerint az apoptotikus neutrofilek fagocitózisa DS-ben proinflammatórikus citokinek termelését eredményezi, és ismerte, hogy a GC tolerogén DS fenotípust hoznak létre, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk milyen hatással van a dexametazon az apoptotikus neutrofilek gyulladásokeltő hatására monocita eredetű DS-ben.

1.4. A szöveti transzzglutamináz

A szöveti transzzglutamináz (TGM2) egy multifunkcionális enzim, mely a kalcium-függő transzamidáló aciltranszferáz fehérjecsaládhhoz tartozik, a XIII-as faktorral, hat transzzglutamináz enzimmel (TG1, 3-7) és a 4.2 transzzglutamináz aktivitást nélkülöző fehérjével együtt.

A TGM2 nagyrészt a citoplazmában található, de jelen van a sejtmagban és mitokondriumban is. A sejtől nem a klasszikus endoplazmatikus retikulum-Golgi útvonalon keresztül kerül ki hanem a citoplazmatikus TGM2 az endoszómákban β_1 integrinokkal lép kapcsolatba, és segítségével kerül ki a sejtől. Ezt követően vagy kötődik a sejtfelszínhez vagy átkerül az extracelluláris mátrixba, ahol keresztköti a jelenlevő komponenseket, elősegítve a szöveti stabilitást, a sejtek letapadását és migrációját.

Keresztkötő aktivitásán túl a TGM2 G fehérjeként is működhet, proteindiszulfid izomeráz és proteinkináz aktivitása is van. A makrofágok felszínén mind a β_3 integrinnal mind az MFGE8 fehérjével kapcsolatban van. A fibroblasztokban az externalizációja syndecan-4-től és a sejtfelszíni lokalizációja a fibronektin kötő motívum jelenlététől függ. Kimutatták, hogy a sejtfelszínről internalizálódik és a lizoszómákban degradálódik.

Irodalmi adatok szerint a TGM2 a sejtelhalás, jelátvitel, citoskeletális átrendeződések, extracelluláris mátrix stabilizálás és fagocitózis folyamatában vesz részt. Az enzim aktivitásában fellépő zavarok gyulladásos betegségekhez, diabéteszhez, neurodegeneratív betegségekhez, reumatoid artritiszhez és coeliákiás betegséghez vezethetnek.

A coeliákia (CD), közismertebb nevén lisztérzékenység, egy krónikus vékonybél-gyulladásos betegség, melyet malabszorpció, hasmenés és számos extraintesztinális tünet jellemez. Glutén bevétele esetén jelennek meg a tünetek, amíg a gluténmentes diéta teljes tünetmentességhez vezet. Jelenleg ez tekinthető az egyetlen hatékony terápiás beavatkozásnak is. A betegség tünetei a boholyatrófia, kriptális hiperplázia és limfocitás infiltráció, amelynek hátterében a $CD4^+$ T sejteknek való, DQ2 és DQ8 HLA molekulákon keresztül történő, gluténbemutató áll. A TGM2 autoantigén a coeliákiában, és azt feltételezik, hogy az antigén prezentáló sejtek felszínén levő TGM2 szerepet játszik a glutén reaktív T sejteknek való prezentálásában.

2. Célkitűzések

- Megvizsgálni, hogy a dexametazon miként befolyásolja az apoptotikus neutrofilek fagocitózisát humán humán monocita eredetű dendritikus sejtekben és tisztázni, hogy mely apopto-fagocita gének játszanak szerepet a folyamatban;
- Megvizsgálni, hogy a dexametazon hogyan befolyásolja a humán dendritikus sejtekben az apoptotikus neutrofilek által kiváltott gyulladásos választ;
- Tisztázni, hogy DS-ben a dexametazon módosítja-e a T sejt aktivációs képességet apoptotikus neutrofilek fagocitózisát követően;
- Megvizsgálni, hogy a dendritikus sejtek kifejezik-e a sejt felszínén a TGM2-t és az aktív állapotban van-e.

3. Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák és reagensek

A humán monocitákat egészséges donorok perifériás véréből izoláltuk, gradiens centrifugálással, Ficoll–Paque Plus-t használva. A CD14+ sejteket mágneses gyöngyökkel (MACS) szeparáltuk, amit PBS-0.5% BSA-2mM EDTA-val való mosás követett. A monocitákat 2×10^6 sejt/ml sejtsűrűséggel 6 lyukú tenyésztő edényekben differenciáltattuk, éretlen DS-ké, 2 illetve 5 napig AIM-V tápfolyadékban, ami 800 U/ml GM-CSF és 500 U/ml IL-4-et tartalmazott. A dexametazont a differenciáltatás elején adtuk a sejtekhez.

Érett DS nyeréséhez az ötödik napon 100 ng/ml LPS-el és 10 ng/ml INF γ -val aktiváltuk az éretlen DS-et további 16 órán keresztül. Az LPS-el stimulált sejtek esetén a DS-et 100 ng/mL LPS-el kezeltük 16 órán keresztül az ötödik napon. Az allogén neutrofileket friss perifériás vérből izoláltuk gradiens centrifugálással, Histopaque 1119 és Histopaque 1077 alkalmazásával. Ezt követően 16 órás spontán apoptózisnak vetettük őket alá IMDM tápfolyadékban, amely 10% humán AB szérumot tartalmazott. Az autológ limfocitákat -70°C -on tároltuk sejtfagyaszto folyadékban (FBS: DMSO – 9:1) egészen a T sejt aktiválási kísérletben való felhasználásukig.

Fagocitózis mérés

A differenciáltatott éretlen DS-et piros színű, CMTMR festékkel, míg a neutrofileket zöld fluoeszccens CFDA-SE-vel jelöltük. A koinkubálás előtt a neutrofileket háromszor mostuk PBS-el és ötszörös feleslegben adtuk a megszámlolt és frissen kiszélesztett DS-hez friss médiumban. 8 óra fagocitózis (37°C és 5% CO_2 jelenlétében) után a sejteket tripszinezttük, PBS-el mostuk majd 1%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk. Minden minta esetében duplikátumokkal dolgoztunk és a GC nem volt jelen a DS és neutrofilek együtt való inkubálása alatt. A mintákat áramlási citométerrel mértük le, meghatározva a fagocitáló DS arányát (mind CMTMR-el mint CFDA-SE-vel jelölt sejtek).

A blokkoló kísérletek esetében a neutrofilekkel való inkubálás előtt a DS-et előkezeltük 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-MERTK (klón 125508) vagy anti-CD14 antitestekkel 15 percig 37°C és 5% CO_2 jelenlétében. Az antitestek a fagocitózis ideje alatt is jelen voltak. Az ADORA3 antagonistá hatásának tesztelésékor a DS-et előkezeltük 1 óra hosszáig, termosztátban a szelektív adenosin A3 antagonistával (MRS1220), amely végig jelen volt az apoptotikus neutrofilekkel való inkubálási idő alatt is.

Sejtfelszíni jelölések

A nem specifikus kötődések elkerülése érdekében, minden esetben a DS-et 30 percig 37°C és 5% CO₂ jelenlétében 50% humán AB szérummal inkubáltuk. Ezt követően PBS 1%-os BSA-val mostuk és a jelöléseket a specifikus és kontroll antitestekkel 30 percig, jégen végeztük el. A differenciálódott DS fenotípusos ellenőrzését PE-konjugált anti-CD209, anti-CD14, anti-CD1a és anti-CD40 antitestekkel, illetve a megfelelő izotípus kontroll antitestekkel IgG2b, IgG2a és IgG1-el végeztük el, 50x hígításban használva az ellenanyagokat.

A MERTK és CD14 sejtfelszíni expresszió meghatározását 10 µg/ml jelöletlen monoklonális anti-MERTK és anti-CD14, illetve IgG1 (izotípus kontroll) antitestek felhasználásával végeztük el. A másodlagos antitest FITC-konjugált anti-egér ellenanyag volt, amit 50x hígításban használtunk. A CD14 felszíni festését direkt módszerrel is ellenőriztük PE-CD14 és PE- IgG2a antitestek felhasználásával.

A felszíni TGM2 detektáláshoz különböző anti-TGM2 ellenanyagokat használtunk: TG100, CUB7402, 4G3 hibridóma sejtfelülűszó, H23, G92 és pab0062, illetve egér IgG1 izotípus kontroll. Minden esetben 1µg antitestet használtunk 10⁶ sejthez, és a másodlagos antitest FITC-konjugált anti-egér (1:50) antitest volt.

A jelölést követően a sejteket PBS-1% BSA-val mostuk és PBS 1% PFA-ban fixáltuk, majd áramlási citométerrel végeztük az elemzést.

Immunoblott

A monocitákat differenciáltattuk dendritikus sejtekké dexametazon jelenlétében majd a sejteket begyűjtöttük, mostuk PBS-el és a lizis pufferrel (50mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 1mM EDTA, 15 mM 2-MEA és proteináz inhibitor) lizáltuk őket. Centrifugálást követően a sejtlizátumhoz ötszörös Laemmler puffert adtunk, majd 10 percig elfőztük a mintákat. Mintánként 15 µg fehérjét futtattunk 10% SDS poliakrilamid gélen, amiket PVDF membránra vittünk át nedves blottolással. A membránokat 5% sovány tejben blokkoltuk, majd inkubáltuk monoklonális TGM2 specifikus antitestekkel (4G3 vagy CUB7402) illetve GAPDH vagy β-aktin antitestekkel, minden esetben 4°C-on egy éjszakán keresztül, amit mosás és a másodlagos antitesttel való inkubálás követett (HRP-konjugált anti-egér) egy órán keresztül szobahőmérsékleten. A fehérjéket Immobilon Western kemilumineszcens szubsztrát segítségével tettük láthatóvá.

Felszíni TGM2 aktivitásmérés

Az ötödik napon az éretlen DS-et 24 lyukú sejt tenyésztő edénybe tettük át, 2×10^6 sejt / 300 μ l friss szérummentes RPMI tápfolyadékba. A kontrollokat kivéve, a mintákat az alábbi komponensekkel inkubáltuk: 25 μ g/ml 5-BP, 2 mg/ml kazein, 2mM CaCl_2 , 4mM EDTA. Adott mintáknál az említett komponensekkel való inkubálást megelőzte egy 30 perces termosztátban történő előinkubálás 1 μ g anti-TGM2 antitesttel (TG100 és CUB7402). Ezt követően a sejtfelülúsókat begyűjtöttük és 5x Laemmli puffer hozzáadásával Western blott analízishez készítettük elő. A fehérjéket 12% SDS gélen futtattuk, nedves blottolással PVDF membránra vittük át, majd a membránokat inkubáltuk HRP-konjugált streptavidin illetve anti-TGM2 (CUB7402) és GAPDH antitestekkel. A fehérjéket a fent említett kemilumineszcens szubsztráttal tettük láthatóvá.

TNF α koncentrációmérés sejtfelülúsóból

A differenciáltot, de festetlen DS-et koinkubáltuk jelöletlen apoptotikus neutrofilekkel 8 órán keresztül termosztátban, majd 0.1 μ g/ml LPS-el és 10 ng/ml IFN γ -val stimuláltuk további 16 órán keresztül. A sejtfelülúsókat begyűjtöttük és -20 °C tároltuk a citokin lemeréséig, ami a gyártó utasításainak megfelelően TNF α duo set ELISA kitt segítségével történt minden minta esetén, triplikátumokból.

Humán IFN γ ELISPOT mérés

Az 5 napig differenciáltot kontroll és dexametazon kezelt DSet apoptotikus neutrofilekkel inkubáltuk 8 óra hosszúig termosztátban (mindkét sejttípus festetlen volt) majd a koinkubálást követően autológ limfocitákat adtunk (DS:limfocita = 1:25) további 5 napig termosztátban tartva a sejteket. Ezt követően anti-humán IFN γ Ready-Set-Go ELISPOT kittet használva detektáltuk az IFN γ termelő T sejteket biotinizált anti-IFN γ antitest segítségével. A citokin „szpotokat” ELISPOT Image Analyzer szoftver segítségével azonosítottuk és a méréseket OptiEIA rendszer segítségével elemeztük ki.

RNS izolálás és TaqMan RT-PCR

Kontroll és dexametazonnal kezelt DS-ből valamint monocitákból TRIzol reagens segítségével teljes RNS-t izoláltunk a gyártó ajánlása szerint. Az apopto- fagocita gének expresszióját TaqMan Low-Density Array (TLDA) segítségével elemeztük ki. A TLDA olyan apopto-fagocita géneket tartalmazott, amelyeket az intézetünk irodalmi adatok alapján válogatott és a gyártó kérésünkre ennek megfelelően állított össze. Minden célgénre két replikátumot használtunk

és 3 biológiai párhuzamost. Referencia génként a 18S rRNA szolgált. A gének relatív expresszióbeli változását az átlag génexpresszióból számoltuk. A differenciálódás alatt változó gének esetén az 5 napos, nem kezelt, sejtek relatív expresszióját hasonlítottuk a monocitákéhoz, a dexametazon kezelés hatására változott gének esetében pedig az 5 napos, dexametazon kezelt sejtek relatív expressziós értékeit a nem kezeltkéhez.

Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Bizottság etikai szabályzatának megfelelően folyták. 8-12 hetes C57BL/6J és ADORA3 KO egerek csontvelői progenitorait fiziológias só oldatban mostuk, majd RPMI tápfolyadékban tenyésztettük mely tartalmazott 10% FBS-t és 2mM glutamint valamint penicillint és sztreptomocint. A csontvelői sejteket $1,5 \times 10^6$ sejt/ml, 6 lyukú plate-ken differenciáltattuk dendritikus sejtékké 20 ng/ml GM-CSF és 20 ng/ml IL-4 jelenlétében 9 napig. Minden harmadik napon a médium felét lecseréltük és friss citokint tartalmazó tápfolyadékkal helyettesítettük. A dexametazon jelen volt a differenciálódás kezdetétől fogva. Az egér neutrofil granulocitákat csontvelői progenitorokból gradiens centrifugálással izoláltuk és Histopaque 1119 illetve Histopaque 1077 felhasználásával. Az egér neutrofileket zöld CFDA-SE festékkel festettük és 24 órás apoptózisnak vetettük alá 10%-os egér szérumot tartalmazó IMDM tápfolyadékban. A preparátum tisztaságát May-Grünwald/Giemsa festéssel ellenőriztük. A 9-ik napon a differenciáltott egér DSet CMTMR festékkel festettük a gyártó leírásának megfelelően, majd a sejteket újra szélesztettük szérummentes tápfolyadékban és 8 óra hosszáig együtt inkubáltuk az apoptotikus egér neutrofilekkel 1:5 arányban, termosztátban. A mintákat tripszinezéssel gyűjtöttük be, PBS-el mostuk majd áramlási citométerrel meghatároztuk a fagocitáló DS arányát.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez páros Student's t-test-et használtunk és a $p < 0.05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. A dexametazonnal kezelt humán éretlen DS-nek magasabb a fagocitózis képességük

A humán, monocita eredetű makrofágok hatékonyan kebelezik be az apoptotikus neutrofileket, amit a szintetikus GC, a dexametazon jelentősen megnövelt. Kísérleteink során az apoptotikus neutrofillal történő több órányi koinkubáció után a DS-nek 9-25%-a fagocitál, donortól függően. A makrofágokhoz hasonlóan a dexametazon jelenlétében történő 5 napos differenciáció után a DS fokozott fagocitózis képességet mutattak. A dexametazon indukált fagocitózis növekedés donorfüggő volt, és nem a koncentráció növekedésével változott, hanem a legalacsonyabb 10 nM-os koncentrációban volt a leghatékonyabb a donorok többségében.

4.2. GC jelenlétében a DS CD1a⁻ CD14⁺ dendritikus sejtekké differenciálódnak

Hogy lássuk a dexametazon hatását a DS differenciálódására, ellenőriztük a jellemző DS markerek sejtfelszíni expresszióját egy korábbi időpontban is (második nap). Azt tapasztaltuk, hogy a dexametazon meggátolta a CD14 kifejeződésének a lecsökkenését, amely a kezelés nélkül ötödik napra, a differenciálódás eredményeként, nagyon alacsonyan expresszálódik. A különböző donorok változó arányban voltak CD1a⁺-ak az éretlen kontroll DS esetében, de a dexametazon minden esetben csökkentette ezen sejtek arányát, még a legalacsonyabb koncentrációkban is. Kontroll kísérleteink megmutatták, hogy a DS karakterizálására használt CD209 (DS-SIGN) expressziója nem változott a glükokortikoid kezelés hatására.

4.3. A monocita eredetű DS génextpressziós mintázatának változása differenciálódás alatt és dexametazon hatására

Annak tisztázására, hogy a DS differenciációja alatt illetve GC hatásra hogyan változnak az apopto-fagocita génextpressziós vizsgálatokat végeztünk TLDA technikával 95 db kiválasztott génen. Az eredmények kiértékelése után figyelmünket elsősorban a felregulált génekre irányítottuk.

4.3.1. Az éretlen DS differenciációja és GC kezelés hatására megnövekvő apopto-fagocita gének

Három donor mintái közül kiválogattuk a kontrollokat és a leghatékonyabb dexametazon koncentrációjukat a TLDA elemzés elvégzésére. A génexpressziós változásokat, átlag relatív expressziókból vizsgáltuk meg. A DS - monocita összehasonlítás során 17 gén expressziója fokozódott az 5 napos differenciálódás során. Ezek közül 6 génnek az expressziós szintje több mint 10-szeresére nőtt: DOCK1, FCGR2B, GAS6, IRF4, PROS1 és PPARG. Dexametazon hatására pedig 10 apopto-fagocita gén expressziója növekedett több mint kétszeresére. Ezen gének közül négy az 5 napos differenciáció során is megemelkedett, tehát a GC ezt a szintet fokozta tovább. Ez a 4 gén az: ADORA3, FCGR2B és a híd funkciójú molekulák C1QA és C2.

4.3.2. Gének amelyeknek expressziója dexametazon hatására növekedett valamennyi donorban

A GC által felregulált apopto-fagocita géneket valamennyi donorban megvizsgáltuk. A legnagyobb mértékben az adozin receptor ADORA3, a fagocitózis receptorok MERKT és CD14, a híd molekula C1QA és a DNASE2 expressziója növekedett.

4.3.2.1. A dexametazon már a differenciáció második napján hatékony

Monocitákat differenciáltattunk DS sejtekké, és 2 nap után apoptotikus neutrofilekkel fagocitózis vizsgálatot végeztük. Az apoptotikus sejtek fokozott bekebelezését tapasztaltuk, és a hatékony dexametazon koncentrációk különböztek az 5 napig differenciáltatott éretlen DS-ben azonosított koncentrációktól. A felregulált gének megegyeztek az éretlen DS-ben felreguláltakkal (ADORA3, MERKT, CD14 és C1QA).

4.4. A MERKT szerepe a dexametazon mediált apoptotikus sejt fagocitózisában

4.4.1. Dexametazon hatására a MERKT kifejeződik a sejtfelszínen

TLDA vizsgálataink kimutatták, hogy a MERKT nagymértékben expresszálódik GC kezelés hatására, tehát megvizsgáltuk a fehérje sejtfelszíni kifejeződését is. Áramlási citometriás vizsgálataink szerint a MERKT csak a dexametazon kezelt DS sejteken volt kimutatható.

4.4.2. A MERKT blokkoló antitest hatása a dexametazon indukált apoptotikus neutrofilek fagocitózisára

Mivel a dexametazon hatására a fehérje kifejeződik a sejtfelszínen, megvizsgáltuk, hogy a MERKT specifikus antitest használható-e fagocitózis gátlásra DS esetében, mivel humán makrofágokban a dexametazon által indukált bekebelezés növekedést hatékonyan gátolta, amint azt irodalmi adatok mutatják. Az elvégzett fagocitózis vizsgálataink szerint DS-ben az antitest nem gátolta a dexametazon által indukált apoptotikus sejtek felvételét.

4.5. A CD14 ellenes antitest hatása a dexametazon által indukált apoptotikus neutrofilek fagocitózisára

A MERTK-hoz hasonlóan a CD14 expressziója is megnőtt a GC kezelés hatására. Direkt és indirekt jelölési módszerekkel ezt a sejtfelszínen is detektálni tudtuk. Tesztelni kívántuk, hogy a CD14 ellenes antitest gátolja-e rendszerünkben a fagocitózist, de eredményeink nem igazolták feltevéseinket.

4.6. Az ADORA3 szerepe dexametazon által indukált apoptotikus neutrofilek fagocitózisában

Az ADORA3 dexametazon hatására DS-ben jelentős, közel hétszeres expressziós szint növekedést mutatott. Ahhoz, hogy teszteljük az ADORA3 szerepét rendszerünkben, az MRS1220 szelektív ADORA3 antagonistát használtuk. Az DS-t antagonistával inkubáltuk, az apoptotikus neutrofilekkel való kezelés előtt. Az MRS gátolta a dexametazon által indukált fagocitózis fokozódást 3 donorban, és 1 donor nem mutatott semmilyen változást az apoptotikus sejtek felvételében az antagonista hatására. A dexametazon koncentráció, ahol a fagocitózis gátló hatás kimutatható volt, donoronként változott.

Az ADORA3 szerepét dexametazon hatásának létrejöttében egérmódelben is teszteltük. DS-et differenciálttunk csontvelői progenitorokból, vad típusú és ADORA3 KO egereket használva, a GC-t a differenciáció elejétől hozzáadva a sejtekhez. A fagocitózis vizsgálatot egér apoptotikus neutrofilekkel végeztük el. Vad típusú DS-ben a dexametazon fokozta az apoptotikus sejtek felvételét, míg Az ADORA3 hiányában a DS nem válaszoltak dexametazon kezelésre, vagy csökkent fagocitózist mutattak.

4.7. A fokozott apoptotikus sejt fagocitózis a dexametazon kezelt DS-ben proinflammatórikus citokinek termelésével és T limfocita aktiválással jár

8 órás koinkubálás során az apoptotikus neutrofil felvevő DS-et LPS és IFN γ -val kezeltük további 16 óráig, amikor a termelt TNF α -t mértük meg a felülülőszóból. Meglepetésünkre a dexametazon jelenlétében differenciáltott DS megnövekedett TNF α termeléssel reagáltak, és amennyiben ezeket a sejteket apoptotikus neutrofilekkel inkubáltuk, a citokin termelés tovább fokozódott. A leghatékonyabb dexametazon kezelés változott donoronként.

A T sejt polarizálás vizsgálatára autológ T limfocitákat tenyésztettünk, DS-vel további öt napig azok neutrofillel való inkubálását követően, és az IFN γ termelő T sejteket ELISPOT vizsgálattal mutattuk ki. Bár a donorok között jelentős eltérések mutatkoztak, a dexametazon kezelt DS-ben apoptotikus neutrofilek hatására minden esetben magasabb számú IFN γ -t termelő T sejtet detektáltunk. Sőt, a dexametazon kezelés önmagában is képes volt az DS T sejtek aktiválását kiváltani, ugyanakkor a dexametazon koncentráció donorfüggése megmaradt.

Mivel a CD1a⁺ és a CD1a⁻ DS altípusok donoron belül különböznek a bekebelező képesség, és a citokin és kemokín profiljukban, ezért mi is elvégeztük a CD1a jelölést. Valamennyi donorunk kontroll sejtjei 40-60% volta CD1a⁺-k, és a GC kezelés hasonlóan a korábbi adatainkhoz a DS-et CD1a⁻ altípusává változtatta.

4.8. A GC kezelés által down-regulálódott apopto-fagocita gének vizsgálata

A DS és a monociták összehasonlításában 41 apopto-fagocita gént találtunk, melyeknek génexpressziós csökkenése nagyobb volt, mint kétszeres. Ezen gének közül 8 átfedett a dexametazon által leregulált génekkel (adenozin A2a receptor, AXL, ITGAX, ITGB, LRP1, komplement komponens 3, ICAM3 és az IRF1). Ugyanakkor, a felszíni mérésekkel összhangban, a CD14 mRNS szintje is folyamatosan csökken a differenciáció 5 napja során (FC = 0.005). 22 apopto-fagocita gén szintje csökkent a GC kezelés hatására DS-ben, melyek közé tartozott a TGM2 gén, amit további vizsgálatoknak vetettük alá, mivel mind mRNS, mind fehérje szinten már a differenciáció kezdeti fázisaiban is csökkent.

4.9. A TGM2 expressziója a humán DS sejtek felszínén

4.9.1. A TGM2 kimutatható a monocita eredetű DS sejt felszínén

Korábbi vizsgálatok szerint a TGM2-nek szerepe lehet az antigén prezentációban a gluténreaktív T sejt aktiváció esetében a coeliákiában. A TGM2 sejt felszíni detektálását különböző specifikus antitestekkel (CUB7402, TG100, 4G3 hibridóma felülűsző, H32, G92 és pab0062) próbáltuk elérni, áramlási citometriás vizsgálatokkal. Az antitestek döntő többsége negatív eredményt adott, de a TG100 monoklonális antitest hatékonyan jelölte a TGM2-t a DS sejt felszínén. Differenciáció során a növekvő TGM2 kifejeződést, Western blottal és sejt felszíni jelöléssel is kimutatható volt.

4.9.2. Az DS felszínén kimutatható TGM2 egy aktív fehérje

Vizsgálataink során teszteltük, hogy a DS felszínén kimutatható TGM2 fehérje aktív-e. E célból a éretlen DS-t N-N dimetil kazein és N-5 aminopentil-biotinamid (5-BP) anyagokkal kezeltük. A biotil csoport kazeinbe való beépülését a sejtmentes felülűszőben streptavidin-tormaperoxidáz alapú Western blottal vizsgáltuk. Ellenőrizendő, hogy a sejtek épek maradtak-e a vizsgálat során, és nem történik intracelluláris TGM2 szivárgás, megvizsgáltuk a citoplazmatikus GAPDH fehérje megjelenését a sejtmentes felülűszőben. Eredményeink azt mutatták, hogy a GAPDH megjelent a felülűszőben, de TGM2 alig volt kimutatható, ami azt bizonyítja, hogy az 5-BP beépülése a kazeinbe a sejt felszíni TGM2 aktivitásának köszönhető. A beépülést megpróbáltuk TG100 és CUB7402 antitestekkel gátolni, úgy hogy előinkubáltuk a sejteket ezekkel, de annak ellenére, hogy az oldható TGM2-t mindkét ellenanyag gátolja irodalmi adatok szerint, mi nem tapasztaltuk ezt a gátló hatást.

4.9.3. Az LPS kezelt monocita eredetű DS magasabb TGM2 expressziót mutatnak

Irodalmi adatok szerint a coeliákiás betegségre genetikailag hajlamos egyedekben egy nemspecifikus gyulladási folyamat indul be a bélben, mely felelős a TGM2 megnövekedett aktivitásáért. Bakteriális LPS-t használtunk a DS stimulálására a differenciálódás után további 16 óráig, és TG100 antitest segítségével megnövekedett sejt felszíni TGM2 kifejeződést tapasztaltunk, ami alátámasztja a fent említett elméletet a gyulladási szignál és a fehérje expressziója közötti összefüggésről.

5. Diskusszió

A GC-k természetesen előforduló stressz hormonok, melyek az immunválasz során szabadulnak fel és nélkülözhetetlen kapcsolatot teremtenek a központi idegrendszer és a veleszületett immunrendszer szabályozása között.

Az endogén GC-k két formában vannak jelen: az aktív kortizol és az inaktív kortizon formájában. Az exogén, terapeutikus GC-at erős gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatásuk miatt kiterjedten használnak különböző betegségek kezelésében (autoimmun és allergiás megbetegedések), krónikus gyulladások és szervátültetések esetében is. A T sejtekre kifejtett ismert immunszuppresszív hatásukon kívül, az immunrendszer valamennyi sejttypusának működését befolyásolják, beleértve a makrofágokat és a DS-et is.

A GC-k szabályozzák a DS differenciálódását, éretlen állapotban tartják őket, megnövelik mind a mannóz receptor mediálta, mind a folyékony fázisú endocitózist. A GC-k hatását vizsgálva az éretlen DS esetében, ugyanazokat, az irodalomban már ismertetett morfológiai változásokat figyeltük meg (kevésbé letapadó, nagy citoplazmájú sejtek). Az általunk alkalmazott *in vitro* fagocitózis rendszer mintázza az *in vivo* megfigyelhető gyulladásos folyamatokat. A GC kezelésre megfigyelt fagocitózis növekedés változó dexametazon koncentrációknál volt detektálható, donortól függően. E hatás valószínűleg a GC receptor molekuláris heterogenitásának tudható be, melynek eredménye a GC válasz egyedenkénti változása.

A TLDA vizsgálatokkal a fagocitózisban bizonyítottan részt vevő molekulák szerepét kívántuk vizsgálni a dexametazon által indukált fagocitózis növekedésben. A vizsgált géneket az alábbiak szerint lehet csoportosítani funkcióik alapján: receptorok (integrinek, scavenger receptorok, adozin receptorok, tirozin kinázok, stb.), hídmolekulák, szignál generátorok, effektor molekulák, citokinek, magreceptorok, bekebelezési gének, autofágia gének, IFN szabályozó gének.

A következő tíz gént mely dexametazon hatására, megnövekedett expressziót mutatott az alábbiak szerint csoportosítható: sejt felszíni molekulák (ADORA3, FCGR2B), hídmolekulák (C1QA, C2), fagocitózis receptorok (CD14, MERTK, SCARB1), effektorok (DNASE2), citokinek (IL10) és gyulladás szabályozók (NLRP12). A GC jelentősen átprogramozza a fagocitózisban szerepet játszó gének kifejeződését, mivel az 5 napos differenciálódási időszak alatt, dexametazon hiányában felregulálódott gének (17 gén) közül csupán 4 gén fed át a GC által felregulált génekkel. Ez a 4 gén az: ADORA3, C1QA, C2 és az FCGR2P.

Monocita eredetű DS-ben a dexametazon felregulálja a MERTK-t, nemcsak mRNS, de sejt felszíni szinten is. Bár a blokkoló antitestek nem gátolták a GC indukálta fagocitózis fokozódását. Hasonló eredményekre jutottunk a CD14 vizsgálatával. Nem zárható ki, hogy az anti-MERKT és az

anti-CD14 antitestek kötődése nem volt eléggé erős a sejtfelszínen a fagocitózis gátlásához, vagy hogy ezen fehérjéknek szerepe nem annyira jelentős, hogy gátlásuk szignifikánsan csökkentse az apoptotikus sejtfelvételt.

Az adenosin A1 és A3 receptorok kifejeződnek az éretlen myeloid és plazmocitoid DS-ben. Aktiválásuk beindítja a kemotaxist az intracelluláris kalcium és a citoszeleatális átrendeződés eredményeként. Irodalmi adatok szerint humán monocitákban az ADORA3 expressziója megnő GC kezelés hatására. Eredményeink szerint a humán monocita eredetű DS-ben is a dexametazon felregulálta az ADORA3-at, és amennyiben egy szelektív antagonistát használtunk (MRS1220) gátolni tudtuk a dexametazon indukált apoptotikus sejtfelvételt. Az ADORA3 KO és vad típusú egerekkel végzett kísérletek is azt mutatták, hogy ADORA3 hiányában nem történik meg a dexametazon által indukált fagocitózis növekedés. Az adenosin egy olyan oldható mediátor lehet ebben a rendszerben, amely GC kezelt DS-ben ADORA3 receptoron keresztül hatva, és a ciklikus AMP szint csökkentésével hozzájárul a fagocitózis fokozásához.

Korábban kimutattuk, hogy a humán makrofágokkal ellentétben a DS az apoptotikus neutrofilekre meglepő módon gyulladásos citokinek termelésével és T sejt aktiválással reagáltak. Mi azt kívántuk vizsgálni, hogy erre a folyamatra milyen hatással van a dexametazon kezelés. De azt tapasztaltuk, hogy mind a T sejt aktivitás mind a TNF α termelés a nem kezelt kontrollokhoz képest magasabb értékű és amennyiben a DS-et apoptotikus neutrofilekkel koinkubáltuk a gyulladásos válasz felerősödött. Ezt mind megnövekedett T sejt aktiválással mind magasabb TNF α termeléssel kimutattuk. Valószínűsíthető hogy a megnőtt citokin termelés a megnövekedett TLR-4 és TLR-2 receptoroknak tulajdonítható, melyek irodalmi adatok szerint GC hatásra megnövelik expressziójukat, humán mononukleáris sejtekben. Eredményeink azt jelzik, hogy a GC hatás lényegesen bonyolultabb, mint azt korábban leírták, és kontextus függően gyulladáskeltő vagy immunszuppresszív hatást is mediálhat.

A génextpresszióban bekövetkezett nagymértékű változásokat a lefele szabályozott apopto-fagocita gének is jelzik. Az egyik ilyen gén a TGM2, amelyről korábban kimutatták, hogy az integrin β_3 és az MFGE8 fehérjékkel van kapcsolatban. Szintén leírták, hogy a TGM2 hiánya csökkent fagocitózishoz vezet, aminek eredménye az egerben kialakuló autoimmun reakció. Humán dendritikus sejtekben a TGM2 az ötnapos differenciáció során nagymértékben fokozódik már a második naptól kezdve mind mRNS, mind fehérje szinten. A TGM2 vizsgálat jelentőségét a coeliákias betegségben betöltött szerepe adja.

A vékonybélben előforduló DS közvetlenül részt vehetnek a gluténreaktív T sejt aktiválásában coeliákias betegségben, de a megfelelő anti-TGM2 antitest hiánya miatt a kérdés, hogy ezen antigén prezentáló sejtek a sejtfelszínen kifejezik-e a TGM2-t vagy nem, eddig nyitva maradt. TGM2 specifikus antitestek módszer és kontextus függő módon kötődnek a tisztított,

intracelluláris, magi vagy sejt felszíni TGM2-hoz.

Nagyszámú TGM2 ellenes antitest segítségével vizsgáltuk a fehérje sejt felszíni előfordulását, de csak a TG100-al sikerült kimutatni. Eredményeink kimutatták, hogy a sejt felszíni TGM2 DS-ben aktív állapotban van. Ezen eredmények fontosságát az enzim coeliákiás betegségben betöltött szerepe mutatja ahol autoantigén. A TGM2 általi glutén deamidálás fontos lépése a glutén prezentációnak, míg a TGM2 kereszt kötött glutén szerepet játszhat az autoantitestek kialakulásában. Az általunk megfigyelt LPS mediált TGM2 növekedés alátámasztja azt az elméletet, hogy egy nem specifikus gyulladási reakció felgyorsíthatja ezt a folyamatot. A TGM2 gátlása antitestekkel vagy szelektív gátlószerekkel, tüneti javulást okozhat coeliákiás betegségben. Bár a DS-ben a TGM2 szintjét a dexametazon csökkenti, a sejtek fagocitózis képessége fokozódik jelezve, hogy egyéb TGM2 funkciók nem szükségesek a hatás kifejtéséhez.

Eredményeink szerint a gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív dexametazon a monocita eredetű *in vitro* differenciáltatott DS-et átprogramozza gyulladásozó sejtekké, és ezen adat egybevetve mások eredményeivel, mely szerint a GC-k komplex módon szabályozzák az immunrendszert és hatásuk kontextusfüggő.

A szervezetben a DS szubpopulációi kapcsolatba kerülnek az allogén apoptotikus neutrofilekkel transzplantált szervek esetében a szöveti károsodás eredményeképpen, amelyek következménye a donor neutrofil granulocitáinak infiltrációja. Az allograft kilökődést magyarázhatja az apoptotikus neutrofilek ezen erős gyulladásozó hatása. Eredményeink alapján komolyan megfontolandó, hogy az immunszuppresszív hatása miatt adott dexametazon, mellyel a kilökődést kívánják gátolni, egy nem várt hatással is járhat, mely során a dendritikus sejtek nagyobb mértékben kebeleznek be neutrofileket, és ezáltal elősegítik a kilökődési reakció beindulását. Pontos szerepének tisztázásáért mérlegelni kell ennek a hatásnak az arányát a szteroidok által kiváltott össz-immunszuppresszív hatáshoz képest.

6. Összefoglalás

A szöveti homeosztázis fenntartásában jelentős szerepet játszik a természetes sejthalállal elpusztult sejtek folyamatos eltakarítása. Ebben a folyamatban jelentős szerepet vállalnak a professzionális fagocita sejtek, a dendritikus sejtek, amelyek egyben az immunválasz fő szabályozói is, azon képességük révén, hogy kiválthatnak mind aktivációt mind toleranciát.

A dexametazon a gyógyászatban igen gyakran használt glükokortikoid, amely az immunrendszer minden sejtjét befolyásolja. *In vitro* körülmények között, monocita eredetű dendritikus sejtek fagocitáló képességére kifejtett hatását vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy jelentősen megnövelte az allogén apoptotikus neutrofil felvételt. Az apopto-fagocita génekre való hatása pedig ezek kifejeződésének megváltoztatásában nyilvánult meg. Olyan gének expressziója nőtt meg a dexametazon jelenlétében, mint a fagocitózis receptor MERTK és CD14, hídmolekulák közül a C1QA, DNASE2 és ADORA3. Amennyiben a sejteket ADORA3 antagonistával előkezeltük, a dendritikus sejtek fagocitáló képessége lecsökkent. Valamint a génhíányos egerekből differenciáltatott dendritikus sejtek, nem növelik meg fagocitózis képességüket a glükokortikoid kezelés hatására. A MERTK szerepének tisztázására, megvizsgáltuk fehérje szinten a sejtfelszíni expressziót. Noha detektálható a felszínen a fehérje és a glükokortikoid hatásra megnő a felszíni expressziója, specifikus antitestek nem gátolták a fagocitózis Dex indukálta megnövekedését.

Dexametazon hatására, apoptotikus allogén neutrofil bekebelezése valamint LPS és IFN γ stimulus után, a dendritikus sejtek, TNF α gyulladási citokint termelnek. A megkezelt sejtek képesek T sejt aktiválásra, amit az apoptotikus neutrofilek fagocitózisa képes tovább fokozni.

Az apopto-fagocita gének közül, a TGM2 expressziója csökkent. Egér makrofágokon kimutatták, hogy ez az enzim szükséges az apoptotikus sejtek fagocitózisához. Feltételezés szerint humán rendszerben, lisztérzékeny betegek estén, a fő antigén prezentáló sejtek (dendritikus sejtek) felszínén lévő transzglutamináznak szerepe lehet a gliadin deamidálásában és a glutén-reaktív T-sejtek fokozott aktiválódásában. Azonban nem ismert olyan adat, amely a humán antigén prezentáló sejtek felszíni TGM2 expresszióját alátámasztaná, valamint a deamidálás pontos helye sem ismert. Eredményeink azt mutatják, hogy a humán monocita eredetű dendritikus sejtek kifejezik a sejtfelszínen ezt a fehérjét és az aktív. Valamint LPS-el való stimulálás esetén a felszíni expresszió megnő. A tény, hogy a glükokortikoid hatásra a TGM2 kifejeződése mind gén, mind fehérje szinten lecsökken, miközben a sejtek fagocitáló képessége megnő, arra utal, hogy Dex hatására alternatív útvonalak aktiválódnak, amelyek helyettesíthetik a transzglutamináz apoptotikus sejtfelvételben játszó szerepét.

7. Publikációk

Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁR

Iktatószám: DEENKÉTK/211/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Hodrea Judit

Neptun kód: E6DAEZ

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hodrea, J., Majai, G., Doró, Z., Zahuczky, G., Pap, A., Rajnavölgyi, É., Fésüs, L.:** The glucocorticoid dexamethasone programs human dendritic cells for enhanced phagocytosis of apoptotic neutrophils and inflammatory response. *J. Leukoc. Biol.* "accepted for publication", 2011.
IF:4.626 (2010)
2. **Hodrea, J., Demény, M.Á., Majai, G., Sarang, Z., Korponay-Szabó, I., Fésüs, L.:** Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Immunol. Lett.* 13 (1-2), 74-81, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.12.010>
IF:2.511

További Közlemények

3. **Petrovski, G., Ayna, G., Majai, G., Hodrea, J., Benkő, S., Mádi, A., Fésüs, L.:** Phagocytosis of cells dying through autophagy induces inflammasome activation and IL-1beta release in human macrophages. *Autophagy.* 7 (3), 321-330, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.3.14583>
IF:6.643 (2010)
4. **Majai, G., Gogolák, P., Ambrus, C., Vereb Jr., G., Hodrea, J., Fésüs, L., Rajnavölgyi, É.:** PPARgamma modulated inflammatory response of human dendritic cell subsets to engulfed apoptotic neutrophils.

4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

J. Leukoc. Biol. 88 (5), 981-991, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0310144>
IF:4.626

5. Takátsy, A., **Hodrea, J.**, Majdik, C., Irimie, F.D., Kilár, F.: Role of chemical structure in molecular recognition by transferrin.
J. Mol. Recognit. 19 (4), 270-274, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.777>
IF:3.794

Összesített impakt faktor: 22,2

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 7,137

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

Debrecen, 2011.10.11



Egyéb publikációk

Előadások

Hodrea J. *Molecular mechanisms in glucocorticoid induced upregulation of apoptotic cell phagocytosis in dendritic cells.* 4. Molekuláris Sejt és Immunbiológia Téli Egyetem. Galyatető, Magyarország, Január 11 –14, 2011.

Hodrea J. *Glükokortikoid hatásra történő apopto-fagocitózis növekedés mechanizmusa humán dendritikus sejtekben.* A Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése. Budapest, Magyarország, Augusztus 25– 28, 2010.

Hodrea J. *Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocyte derived dendritic cells and macrophages.* 3. Molekuláris Sejt és Immunbiológia Téli Egyetem. Mariazell, Ausztria, Január 7 – 10, 2010.

Hodrea J. *Is there any TG2 on the surface of human macrophages and dendritic cells?* 2. Molekuláris Sejt és Immunbiológia Téli Egyetem. Krompachy, Szlovákia, Január 5 – 8, 2009.

Hodrea J. *Is TG2 present on the surface of macrophages and dendritic cells?* 1. Molekuláris Sejt és Immunbiológia Téli Egyetem. Krompachy, Szlovákia, Január 9 –12, 2008.

Poszterek

Hodrea J. Majai G, Zahuczky G, Nagy J., Fésüs L. *Glucocorticoid induced upregulation of apoptotic cell phagocytosis in human dendritic cells.* 35th FEBS Congress. Gothenburg, Svédország, Június 26 – Július 1, 2010.

Hodrea J. Demény M.A. , Majai G, Sarang Z., Korponay-Szabó I.R., Fésüs L. *Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages.* Gordon Research Conference: Transglutaminases In Human Disease Processes. Davidson, NC, Amerikai Egyesült Államok, Július 7 – 23, 2010.

Hodrea J. Majai G, Zahuczky G, Nagy J., Fésüs L. *Glucocorticoid induced upregulation of apoptotic cell phagocytosis in human dendritic cells.* 15th International Summer School on Immunology. Immune System: Genes, Receptors and Regulation. Hvar, Horvátország, Szeptember 1 – 5, 2009.

8. Tárgyszavak

Dendritikus sejtek, dexametazon, fagocitózis, apopto-fagocita gének, apoptotikus neutrofilek, T sejt aktiválás, gyulladás, szöveti transzglutamináz

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Fésüs László professzor úrnak a doktorandusz évek alatt nyújtott támogatásáért és a lehetőségért, hogy egy kiváló tudományos háttérrel rendelkező intézetben folytathattam tanulmányaimat.

Köszönettel tartozom Dr. Rajnavölgyi Éva professzornőnek építő javaslataiért, valamint a lehetőségért hogy az Immunológiai Intézetben dolgozhattam Nagyné Kovács Erzsébettel, aki kiemelkedő asszisztenciát biztosított a kísérletek kivitelezésében. Köszönöm Dr. Korponay-Szabó Ilma Rita doktornőnek a kollaborációt és az első cikk megírásában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Szondy Zsuzsanna professzornőnek a tanácsait és a lehetőséget hogy ADORA3 KO egerekkel dolgozhattam. Szintén köszönöm Dr. Nagy László professzor úrnak a kollaborációs lehetőséget Pap Attilával és Hathy Edit segítségét az egér DS kísérleteket illetően.

Külön köszönet illeti Dr. Majai Gyöngyikét az alapok megtanításáért, támogatásáért és az éveken át tartó barátságáért.

Szeretném megköszönni kollégáim, kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségét, Dr. Zahuczky Gábornak a TLDA adatok kiértékelését és Doró Zoltánnak az egér neutrofilek izolálását.

Hálás vagyok kollégáimnak Dr. Demény Máté Ágostonnak, Dr. Sarang Zsoltnak, Dr. Bálint Bálint Lászlónak tanácsaikért, ötleteikért és szakmai tapasztalataiknak megosztásáért.

Köszönöm az Apopto-Fagocitózis Munkacsoport valamennyi tagjának a kellemes munka légkört, valamint Nagy Jennifernek, Klem Attilánénak, Komóczi Editnek és Fürtös Ibolyának az asszisztenciát.

A kísérleteket az alábbi anyagi forrásokból fedeztük: OTKA NI 67877, TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 és EU Marie Curie Research Training Network (MRTN-CT-2006-036032).

Végül, de nem utolsósorban hálásan köszönöm a családomnak és barátóimnak Dr. Máté Edinának és Bálint Ágnesnek valamint páromnak, Kis Bálintnak a sok bátorítást és a lelki támogatást.