

## A pollenek által indukált oxidatív stressz hatása a humán dendritikus sejtek működésére

OTKA 73347

### Zárójelentés

#### *I. A pollenszemek által termelt reaktív oxigéngyökök szerepe a humán mieloid dendritikus sejtek aktiválásában*

Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a hidratált pollenszemek NAD(P)H oxidáz aktivitással rendelkeznek, és reaktív oxigéngyököket termelnek. Jelen kísérleteink célja a pollen NAD(P)H oxidázok által indukált oxidatív stressz hatásának vizsgálata volt a humán dendritikus sejtek funkcionális sajátosságaira.

A pollenszemek hatását a dendritikus sejtek funkcióira humán, monocita eredetű dendritikus sejteken vizsgáltuk. Redox-szenzitív fluoreszcens festék (2-7-dihydro-dichlorofluorescein diacetate, DCF) felhasználásával kimutattuk, hogy a pollenszemekkel való érintkezés oxidatív stresszt generál a dendritikus sejtekben, amely gátolható antioxidáns hatású vegyülettel, valamint a pollen NAD(P)H oxidázok közvetlen gátlásával is. Szintén kimutattuk, hogy a dendritikus sejtek a pollenkezelés hatására olyan citokineket termelnek, melyek részt vesznek a természetes immunválaszban (IL-8, TNF-alfa, IL-6), valamint a T limfociták polarizációjában (IL-10 és IL-12). Eredményeink azt mutatják, hogy a dendritikus sejtek antioxidánsal történő előkezelése szignifikánsan csökkentette a proinflammatorikus citokinek termelődését. A hőinaktivált pollenszemekkel kezelt dendritikus sejtek szintén kevesebb mediátort termeltek. További vizsgálatainkban a parlagfű pollenszemekkel tenyésztett dendritikus sejtek fenotípusos tulajdonságait analizáltuk áramlási citometriával. Kimutattuk, hogy a pollenkezelt sejtek felszínén fokozódik a kostimulációs (CD40, CD80, CD86) és aktivációs (CD83) molekulák expressziója. Ezek alapján megállapítható, hogy a pollenszemek által indukált oxidatív stressz hozzájárul mind a gyulladáshoz, mind pedig a sejtek fenotípusos aktivációjához, éréséhez. Eredményeink arra is rávilágítottak, hogy a pollen NAD(P)H oxidázokon kívül a pollenszemek egyéb komponensei is hozzájárulhatnak a reaktív oxigéngyökök megemelkedett szintjéhez a sejtekben.

A pollenszemekkel kezelt dendritikus sejtek T limfocita aktiváló és polarizáló képességét a dendritikus sejt-T sejt kokultúrákban T sejt proliferációs teszt és a T sejtek által termelt citokinek mérése alapján vizsgáltuk. Eredményeink szerint a pollenszemekkel tenyésztett dendritikus sejtek elősegítik a T-limfociták proliferációját. Kimutattuk, hogy a dendritikus sejtek antioxidánsokkal történt előkezelése csökkentette a T-sejtek proliferációs képességét. A T-limfociták citokin termelő képességét autológ dendritikus sejt-T-sejt

kokultúrákban vizsgáltuk immobilizált anti-CD3 ellenanyaggal kiváltott aktiváció után. A szekretált citokinek mennyiségét CBA módszerrel vizsgáltuk, mely lehetővé teszi több citokin együttes detektálását. Az általunk használt rendszerben IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10 és GM-CSF mérését végeztük el, az IFN-gamma kimutatására ELISA módszert használtunk. A T-sejtek pollenszemekkel kezelt dendritikus sejtekkel történt tenyésztése után a sejtek felülúszójában nagyobb mennyiségű Th2 citokineket detektáltunk, mint az éretlen dendritikus sejtekkel tenyésztett T-limfociták esetében. Továbbá a T limfociták a pollenszemekkel kezelt dendritikus sejtekkel kölcsönhatva fokozott IFN-gamma termeléssel jellemezhetők. Az antioxidánsok jelenléte csökkentette a citokinek termelődését. Tanulmányoztuk azt is, hogy a nem allergiás és a parlagfű pollen allergiás egyének perifériás véréből izolált naív T sejtek eltérően reagálnak-e az autológ, pollen-aktivált dendritikus sejtekkel történő kölcsönhatásra. Kimutattuk, hogy az aktiválást követően a nem allergiás egyénekből származó T sejtek szignifikánsabb több IFN-gammát termelnek, mint az allergiás egyénekből származók, ugyanakkor nem volt különbség az eltérő eredetű T sejtek IL-4, IL-5 és GM-CSF produkciójában. Azt is kimutattuk, hogy a pollen-aktivált dendritikus sejtekkel kölcsönható naív T sejtek egy alpopulációja IL-10-et termel. Áramlási citometriás vizsgálatokkal ezeket a sejteket CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>-</sup> T sejtekként azonosítottuk. Eredményeink szerint, a pollen-kezelt DS-ekkel kölcsönható naív T sejtekből létrejövő effektor T sejt populáció nem homogén, Th1- és Th2-citokineket, valamint IL-10-et termelő T sejtek is azonosíthatóak.

*Csillag, A., Boldogh, I., Pázmándi, K., Magyarics, Z., Gogolák, P., Sur, S., Rajnavölgyi, É., and Bácsi, A.: Pollen-grain-induced oxidative stress promotes both innate and adaptive immune responses via activating dendritic cells.*

*J. Immunol. 184, 2377-2385 (2010)*

2. Külföldi kollaborációs partnerrel (Dr. Boldogh István, University of Texas Medical Branch at Galveston) végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy hízósejtekben (RBL-2H3) parlagfű pollen kivonattal történő kezelés után fokozódik a mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termelés. A fokozott mitokondriális reaktív oxigéngyök kibocsátás hisztamin és szerotonin kiszabadulását eredményezi a sejtekből, függetlenül az IgE ellenanyagok által közvetített szignáloktól. Azonosítottuk, hogy a jelenség hátterében protein kináz C- $\delta$  aktiválódása, valamint a szekretoros vezikulák H<sup>+</sup>-ATPáz aktivitásának gátlása áll. Szintén kimutattuk, hogy a fokozott mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kibocsátás elősegíti a hízósejtek IL-4 termelését. Eredményeink szerint a pollenszemek NAD(P)H oxidázai által kiváltott oxidatív stressz mitokondriális

diszfunkcióhoz vezethet, és a hízósejtek aktiválódását eredményezheti függetlenül az adaptív immunválasztól.

*Chodaczek, G., Bácsi, A., Dharajiya, N., Sur, S., Hazra, T.K., and Boldogh, I.: Ragweed pollen-mediated IgE-independent release of biogenic amines from mast cells via induction of mitochondrial dysfunction .*

*Mol. Immunol.* **46**, 2505-2514 (2009)

3. Kimutattuk, hogy parlagfű pollen expozíció hatására a légúti hámsejtekben mitokondriális fehérjék oxidatív modifikációja következik be, ami fokozott mitokondriális H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> termeléshez vezet. Azonosítottuk, hogy a légzési lánc III. komplexének UQCRC2 fehérjéje a legérzékenyebb az oxidatív stresszre. Antiszensz oligonukleotidok felhasználásával lereguláltuk az UQCRC2 expresszióját Balb/c egerek légútjaiban (ezzel modelleztük a mitokondriumok oxidatív károsodást) és megvizsgáljuk ennek hatását az allergiás gyulladás kialakulására. Eredményeink szerint a légúti hámsejtekben kialakuló mitokondriális diszfunkció fokozza az allergének által kiváltott eozinofil infiltrációt, a mucin termelődését, és a bronchiális hiperreaktivitást. Ez arra utal, hogy a környezeti oxidatív hatások által kiváltott mitokondriális károsodásnak szerepe lehet a súlyos tünetekkel járó allergiás légúti gyulladások kialakulásában.

*Aguilera-Aguirre, L., Bácsi, A., Saavedra-Molina, A., Kurosky, A., Sur, S., and Boldogh, I.: Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation.*

*J. Immunol.* **183**, 5379-5387 (2009)

## *II. A parlagfű pollen szub-partikulák (SPP-k) hatása a humán mieloid dendritikus sejtek működésére*

Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy hipotóniás közegben a parlagfű pollenszemek egy része kisméretű (0,5-4,5 µm) partikulákat bocsát ki, amelyek allergéneket is tartalmaznak és reaktív oxigéngyökök termelésére is képesek. Megfigyeléseink szerint a frissen gyűjtött pollenszemek képesek jelentős mennyiségű SPP kibocsátására. A 2009-es parlagfű pollenszezonban elkezdtük a friss pollenszemek gyűjtését a SPP-k előállításához, de a csapadékos időjárás következtében nem tudtunk elegendő mennyiségű pollent összegyűjteni. Az időjárás bizonytalanságának kiküszöbölésére felvettük a kapcsolatot a pollen kivonatokat klinikai felhasználásra gyártó Greer Laboratories (Lenoir, NC, USA) céggel, akiktől 2010 őszén közvetlenül a pollenszemek „iparszerű” begyűjtése után volt lehetőségünk nagyobb mennyiségű parlagfű pollen megvásárlására. A tervezett kísérleteket így

csak jelentős késéssel tudtuk elkezdni, emiatt kérelmeztük a pályázat futamidejének 1 évvel történő meghosszabbítását.

Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a SPP-kal történő kezelés befolyásolja-e a humán dendritikus sejtek fenotípusos, illetve funkcionális sajátosságait. Munkánkhoz a dendritikus sejteket egészséges véradók perifériás véréből izolált monocitákból *in vitro* differenciáltattuk. Sikerült kimutatnunk, hogy a SSP-val történő kezelést követően a dendritikus sejtek képesek a partikulák megkötésére, illetve felvételére. SPP expozíciót követően megnő a dendritikus sejtek felszínén az antigén prezentációban jelentős HLA-DQ és valamint CD40, CD80 és CD86 molekulák expressziója, valamint fokozódik a sejtek IL-6, TNF-alfa és IL-8 termelése. Az SPP-vel kezelt dendritikus sejteknek fokozódott a naív T-sejteket aktiváló képessége. Amikor az SPP-vel kezelt dendritikus sejteket allogén, CD3+ pan T-sejtekkel tenyésztettük együtt, az aktiválást követően mind a nem allergiás egyénekből, mind az allergiás egyénekből származó T sejtek esetén fokozott IL-17 és IFN-gamma termelést detektáltunk. IL-4 termelés csak az allergiás egyénekből származó T sejteknél volt megfigyelhető. Megfigyeléseink szerint e jelenségek kialakulásáért – legalább részben - a pollen NAD(P)H oxidázok, illetve az általuk kiváltott oxidatív stressz felelős. Eredményeink arra utalnak, hogy a SPP-k a DC-ek aktiválása révén az allergének elleni adaptív immunválasz kialakulásában is szerepet játszanak.

*PLoS One. (közlésre beküldve) manuscript number: PONE-D-12-16959*

### *III. Az oxidatív stressz hatása az in vitro tenyésztett plazmacitoid dendritikus sejtek funkciójára*

Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy különböző koncentrációjú és időtartalmú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hogyan befolyásolja a plazmacitoid dendritikus sejtek életképességét, fenotípusos jellemzőit, citokin termelését és T sejt aktiváló/polarizáló képességét. A vizsgálatokhoz a plazmacitoid dendritikus sejteket egészséges véradók perifériás véréből, mágneses sejtszeparálási eljárással izoláltuk. Áramlási citometria segítségével vizsgáltuk a sejtek életképességében bekövetkező változásokat, illetve a plazmacitoid dendritikus sejtek fenotípusos jellemzőit. A plazmacitoid dendritikus sejtek citokin termelését ELISA módszerrel határoztuk meg, a plazmacitoid dendritikus sejtekkel kokultivált T sejtek citokin termelését ELISPOT módszerrel detektáltuk. Megfigyeléseink szerint a plazmacitoid dendritikus sejtek érzékenyen reagálnak az oxidatív stresszre, már 0.1 µM koncentrációjú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is jelentősen csökkenti a sejtek életképességét 24 órával a kezelés

után. Alacsony koncentrációjú (0.01  $\mu\text{M}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés hatására a plazmacitoid dendritikus sejtek felszínén csak kismértékben változott a CD40, CD80, CD86, és a CD83 expressziója, azonban jelentősen csökkent a HLA-DQ kifejeződése. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés nem fokozta a sejtek IL-6, TNF-alfa, és IL-8 kibocsátását, illetve nem váltotta ki IFN-alfa termelődését. Allogén T sejtekkel történő kokultivációt követően azt volt megfigyelhető, hogy az oxidatív stressznek kitett plazmacitoid dendritikus sejtek hatékonyabban aktiválják az IL-4-termelő T sejteket, mint a kezeletlen plazmacitoid dendritikus sejtek. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés ugyanakkor nem változtatta meg a plazmacitoid dendritikus sejtek IFN- $\gamma$ - vagy IL-17-termelő T limfocitákat aktiváló képességét. Kimutattuk, hogy a naív autológ T sejtekkel történő kokultiváció előtt oxidatív stressznek kitett plazmacitoid dendritikus sejtek inkább Th2, mint Th1 irányú polarizációt segítenek elő, valószínűleg a fokozott OX40-L kifejeződés következtében. Megállapítottuk azt is, hogy az oxidatív stressz felfüggeszti az R837 (TLR7 agonista) plazmacitoid dendritikus sejtekre gyakorolt aktiváló hatását. Eredményeink arra utalnak, hogy a gyulladásos sejtek által termelt oxigéngyökökkel reagáló plazmacitoid dendritikus sejteknek a gyulladásokat csökkentő illetve tolerogén hatása lehet az adaptív immunválasz során.

*Pázmándi K, Magyarics Z, Boldogh I, Csillag A, Rajnavölgyi E, and Bácsi A.: Modulatory effects of low-dose hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells. Free Radic Biol Med. 52, 635-645 (2012)*

#### *IV. A plazmacitoid dendritikus sejtek funkcionális analízise parlagfű allergiás egyének perifériás vérében*

Parlagfű pollen allergiában szenvedő betegek (n=20) és egészséges önkéntesek (n=20) perifériás vérmintáiban a plazmacitoid dendritikus sejtek fenotípusát hasonlítottuk össze áramlási citometriás módszerrel. Meghatároztuk az MHC-II (HLA-DR) és számos ko-stimulatorikus molekula (CD80, CD86, ICOS-L, CD40, CD83), kemokin-receptor (CCR7 és CXCR4) illetve Fc-receptor (CD32 és CD64) expresszióját. Méréseink során szignifikáns eltérést csak a sejtfelszíni, nagy affinitású IgE-receptor (FcERI) kifejeződésében találtuk. Az FcERI expressziója a pDS-eken allergiás betegekben magasabb volt. Megfigyelésünk megegyezik egy a közelmúltban publikált vizsgálat eredményével, így sajnos nem tudtuk leközölni (Tversky et al. Clin Exp Allergy. 38, 781-788, 2008).

Lehetőségünk nyílt azonban arra, hogy egy magyarországi betegből származó, plazmacitoid dendritikus sejt-eredetű leukémia sejtek funkcionális vizsgálatát elvégezzük. Megvizsgáltuk hogyan reagálnak ezek a leukémiás sejtek TLR7 és TLR9 agonistákkal történő kezelésre. A TLR agonisták fokozták a sejtfelszíni expresszióját a HLA-DQ, a CD80, és a

CD86 molekuláknak. „B” típusú CpG oligonukleotidok vagy imiquimod kezelés hatására a sejtek TNF $\alpha$ -t és IL-6-ot termeltek. „A” típusú CpG oligonukleotidok vagy imiquimod IFN $\alpha$ 1 expressziót váltottak ki, de IFN $\alpha$  nem volt detektálható a sejtek felülcsúszójában (valószínűleg a cryoprezerváció következményeként). Sikerült kimutatnunk, hogy TLR agonisták fokozzák a citoplazmatikus nukleinsav szenzorok (RIG-I és MDA5) expresszióját mind a leukémiás sejtekben, mind a normál pDS-ekben. Eredményeink szerint a leukémiás sejtek felhasználhatók a normál pDS-ek funkcionális sajátosságainak vizsgálatához.

*European Journal of Haematology (közlésre beküldve) manuscript number: 7224*