

Hízósejtek és bazofil granulociták génexpressziós tulajdonságainak vizsgálata

Doktori tézisek

Baráné Gilicze Anna

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens,

Hivatalos bírálók: Dr. Erdélyi Dániel Ph.D.,
Láglerné Dr. Éder Katalin Ph.D.,

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ferdinandy Péter, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sebestyén Anna, tud. munkatárs
Dr. Szeberényi Szabolcs, tud. oszt. vez. főorvos.

Budapest
2015

Bevezetés

A természetes immunitás képviseli az elsődleges védvonalat a patogének elleni immunválaszban, melynek sejtjes elemei döntően a mieloid sejtvonalak immunsejtjeiből állnak: monociták és makrofágok, hízósejtek, neutrofil-, eozinofil- és bazofil granulociták, mieloid dendritikus sejtek. Ezen sejtek képesek a behatoló patogén gyors eltávolítására fagocitózis által, valamint kemokin-receptoraiuk segítségével odagyűlnék a fertőzés helyének megfelelő szövetekbe, ahol kiváltják a gyulladásos folyamatokra jellemző komplex fiziológiás hatásokat, – többek közt - a vazodilatáció és a vaszkuláris permeabilitás fokozódását. A mieloid sejtek fejlődésének rendellenességei az érett mieloid sejtek vagy a mieloid blasztok abnormális felszaporodását okozhatják, ezzel akut vagy krónikus mieloid leukémiát okozva.

A mieloid sejtcsoportozáshoz tartozó, az allergiás reakciók fő effektorsejtjeiként ismert hízósejteket és bazofil granulocitákat egyaránt Paul Erlich fedezte fel a XIX. század végén. Számos közös funkcionális és morfológiai tulajdonságuk következtében sokáig ugyanazon sejttypus keringsben levő, illetve szövetekben lokalizálódó sejtformáiként tartották őket számon.

A hízósejtek egy-, esetenként két- vagy sok, nem lebenyezett magvú, kerek vagy hosszúkás sejtek. Intracelluláris granulumaik anilinkék festékekkel lilára színeződnek. Ezt a festődést a granulumok erősen savas heparin tartalma okozza. Az érett hízósejtek proliferációra képesek és hosszú hónapokig életben maradnak. A bazofil granulociták a perifériás vér leukocitáinak meglehetősen kis részét, kevesebb, mint 1%-át alkotják; éretten proliferációra képtelenek és életidejük rövid: mindössze kb. 60 óra. Tipikus felépítésük szerint magjuk lebenyezett, bázikus festékekkel festődő citoplazmatikus granulumaik kerek vagy ovális alakúak. Mivel a bazofilok a hízósejtekhez nagyon hasonló módon, metakromáziásan festődnek, elkülönítésükkor segítségünkre lehet a granulumok azon tulajdonsága, hogy azok - bazofilok esetén - a festődést követően eltakarhatják a sejtmagot.

Hasonlóan a monocitákhoz, az eozinofil- és a neutrofil granulocitákhoz, a bazofil granulociták és a hízósejtek is a köldökvérből, a perifériás vérből vagy a csontvelőből származó CD34⁺ progenitorokból differenciálódnak. Megjegyzendő, hogy a granulocitáktól eltérően, a hízósejtek érése a periférián megy végbe.

A csontvelői eredetű hematopoietikus őssejtekből fejlődnek a multipotens progenitorok (MMPs), majd ezekből jönnek létre a közös mieloid- (CMPs) és limfoid progenitorok (CLPs). Klasszikusan, a CMP-kből jönnek létre a megakariocita/eritrocita progenitorok (MEPs) és a

granulocita/monocita progenitorok (GMPs). Az, hogy a hízósejtek melyik progenitorból származnak, még vitatott, mint ahogy az is, hogy a bazofilok a hízósejtekkel állnak-e közelebbi rokonságban, vagy az eozinofilokkal.

A bazofilok sokáig a hízósejtek árnyékába kerültek, mivel számos folyamatban a hízósejtekkel közösen vesznek részt, hasonló morfológiás tulajdonságokkal rendelkeznek, közösen hordozzák felszínükön a nagy-affinitású IgE receptort, az FcεRI-et, granulumentartalmuk hasonló, valamint vizsgálatukat is sok tényező nehezítette: vérben igen kis számban és éretten keringenek, s mivel még nem találtak a bazofilok sejtfelszínén specifikus markert, vérből való izolálásuk sokáig nehézségekbe ütközött. Bazofil mintákból származó, nagy mennyiségű RNS izolálása is problémás. Továbbá, sokáig híján voltunk a bazofil-hiányos állatmodellnek is. Az utóbbi időben viszont mindinkább jelentőséget nyer ez a hosszú ideig az érdeklődés perifériájára szorult sejttípus, ahogy jelentősége egyre több immunfolyamatban igazolódik.

A hízósejtekkel együtt a bazofilok az allergiás és fertőzőes folyamatok során játszott jelentős szerepük révén váltak ismertté, ahol hisztamin és leukotrién kibocsátásuk miatt jelentős effektor feladatokat látnak el. Mindkét sejttípus immunmoduláló funkcióval is rendelkezik, a Th2 irányt mindkettő befolyásolja. Egyrészt, mint fő Th2 citokineket termelő sejttípusok, a naív T-sejtek Th2 sejtekké való alakulását segítik elő, valamint a B-sejtek IgE-termelő sejté válóérését. Mindketten szerepet játszanak a leukociták gyulladással szövetekhez való toborzásában is. A bazofiloknak egy egérben újonnan felismert tulajdonsága, hogy részt vesznek a humorális immunmemória kialakulásában is, és ebben a funkciójukban a hízósejtekkel nem osztoznak. A hízósejtekről korábban is ismert volt, hogy a Th1 folyamatokban is részt vállalnak, a bazofilok kapcsán azonban csak nemrégiben jelent meg erre utaló közlemény.

Egyre több információval rendelkezünk arról, hogy a különböző kórokozó organizmusok a szervezetben rákos folyamatok kialakulását okozhatják, s régóta tudjuk, hogy a gyulladás, különösen abban az esetben, ha hosszú ideig fennáll, rákos elváltozásokhoz vezethet. Minthogy az elmúlt időszakban egyre több publikáció jelenik meg a gyulladás és a rákos megbetegedések közötti viszony feltárásával kapcsolatban, érdemes a hagyományosan gyulladással sejté emlegetett hízósejteket és bazofil granulocitákat a rákos elváltozások kapcsán is szemügyre venni.

Hízósejtek

A hízósejtek számos „előkészített” gyulladással mediátort tartalmaznak, más anyagokat pedig aktiváció hatására gyorsan szintetizálni képesek, melyekkel hozzájárulnak az IgE-mediált

gyulladásos, illetve a késői típusú túlérzékenységi reakcióhoz, az anafilaxiás folyamatokhoz. A B-sejteket támogatják antitest-termelő plazmasejtté való érésükben, szerepet játszanak a paraziták elleni immunválaszban, stimulálják az eozinofilok kemotaxisát, aktivációját és proliferációját, támogatják a fagocitózist, továbbá számos, a tumorbiológiát érintő folyamatot is befolyásolni képesek: így a tumorfejlődést, a tumor-indukált angiogenezist, a szöveti átrendeződéssel járó folyamatokat és a tumorelles adaptív immunválaszt.

A hízósejtek aktivációja alapvetően kétféle módon mehet végbe: az aktiváció legrégebben ismert, legjelentősebb mechanizmusa Fc ϵ RI/IgE keresztkötése révén alakul ki, másrészt léteznek nem-IgE általi szignálok, mint a TLR-ok és ligandjaik (LPS és nukleinsavak), a C3a és C5a anafilatoxinok, valamint bizonyos citokinek és kemokinek általi aktivációk.

A hízósejtek granulomokban tárolt molekulái közé tartoznak a szerotonin, a hisztamin, a heparin, a triptázok és a kimázok. Más molekulák a hízósejtek aktivációját követően *de novo* szintetizálódnak, ilyenek a lipid mediátorok: a PAF, a prosztaglandinok (PDG2) és a leukotriének (LTB₄, LTD₄). Ezeken kívül Th1 (IFN γ , IL-2, IL-3, GM-CSF és TNF α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-33 és GM-CSF), Th17-hez kapcsolható (TGF β , IL-6, IL-1 β és TNF α) citokinek, kemokinek (CCL3, CCL5, MIP-1 β , MCP-1, MIP-2, CXCL8) és angiogén faktorok (VEGF, NGF, FGF) termelődnek a hízósejtekben.

Bazofilok

A bazofilok a hízósejtekhez hasonlóan a túlérzékenységi reakciók fő effektor sejtjeiként gyulladásos mediátorokat, illetve hisztamint tartalmaznak, más anyagokat *de novo* szintetizálni képesek, jellemzően Th2 citokinek termelnek, a B-sejteket támogatják antitest-termelő sejté váló alakulásukban, jelentősek a bakteriális és féreg fertőzések esetén, részt vesznek más immunsejteknek a gyulladás helyére való toborzásában és a humorális immunmemória kialakulásában.

A bazofilokról tudjuk, hogy AML-ben jelentősek. A bazofilok tumor szövetekben való funkciójáról azonban nincs rendelkezésre álló adat, de mivel ők is képesek a véráramból a szövetekbe való kilépésre, a jövőben elképzelhető, hogy ilyen jellegű tanulmányok is születnek majd.

A bazofilok legismertebb receptora az IgE/antigén kötő nagy-affinitású Fc ϵ RI. A TLR-okon keresztüli aktiváció az IgE-mediált aktivációval szinergisztikusan hat, és a termelődő citokinek a Th2 differenciálódást segíti elő. Citokinreceptorai: az IL-3 receptora a CD123, az IL-5 és a GM-CSF receptorai (CD125, CD116), az IL-18 receptora, valamint a Th2-es irányba befolyásoló IL-33 receptora, az ST2 receptor. Találhatóak rajtuk komplementreceptorok különböző adhéziós fehérjék, „homing”-, halál- valamint néhány, az

angiogenezisben szerepet játszó receptor is. A bazofilok számos kemokinreceptort expresszálnak.

A bazofilokban tárolt molekulák közé tartozik a hisztamin, szerotonin, bazofil proteázok. Bazofilokban megtalálható lipid mediátorok a PAF és az LTC₄. Ezenkívül, Th2-es citokinek (döntően IL-4, IL-13 és TSLP), kemokinek (IL-8, CCL3, CCL4, CCL5) és angiogén faktorok (VEGF) produkciója jellemzi őket.

mikroRNS-ek

A mikroRNS-ek csoportja olyan kis, evolúciósan konzervált, nemkódoló RNS-eket magába foglaló családot jelent, melynek tagjai poszttranszkripciós szinten negatívan szabályozzák a génexpressziót azáltal, hogy a target mRNS-ük 3' le nem fordítódó régiójának komplementer szekvenciáihoz kötődve annak degradálódását vagy translációjának gátlását indukálják. A mikroRNS-ek speciális módon jönnek létre, a primer mikroRNS a sejt DNS-ében kódolt, a magban átíródik, majd a Drosophila enzim feldolgozza, és a citoplazmába exportálja, ahol RNáz Dicerek tovább alakítják. Végül 19-23 nukleotid hosszúságú, egyszálú RNS-ek, vagyis érett mikroRNS-ek jönnek létre. A mikroRNS-eket először a sejtfejlődésben és differenciálódásban fontos faktoroknak tartották, de később számos más biológiai folyamatban igazolódott a jelentőségük, úgy mint a sejt-differenciálódásban, az apoptózisban, a szignál transzdukcióban, a szervfejlődésben, valamint számos humán megbetegedésben, úgy mint a fejlődési rendellenességek, rákos megbetegedések (beleértve a hematológiai kórképeket), gyulladásos megbetegedéseket, asztmát és fertőzést. A mikroRNS-ek meghatározó jelentőségűek a normál hematopoiezisben, mivel a hematopoiezis csaknem minden szakaszát szabályozzák, ugyanakkor rendellenes expressziójuk szolid tumorokkal és hematopoietikus malignanciákkal hozható összefüggésbe.

Célkitűzések

A kutatók és klinikusok körében régóta ismert tény, hogy a gyulladásos folyamatok, kiváltképp, ha huzamosabb ideig fennállnak, tumoros elváltozások kialakulását eredményezhetik a szervezetben. Bizonyos például, hogy azok a gyulladásos mediátorok, melyek normál körülmények között rövidtávú gyulladást eredményeznek, majd down-regulálódnak, amennyiben nem megfelelően szabályozódnak, elősegíthetik bizonyos tumorok fejlődését, invazivitását, illetve angiogén aktivitását. Érdekes tehát a gyulladásban jelentős immunsejteket ilyen szempontból is megvizsgálni. Arról, hogy a jól ismert gyulladásos

mediátorok (pl. hisztamin) a tumoros folyamatokban milyen jelentős szerepet vállalnak, egyre többet tudunk. Az azonban, hogy milyen egyéb, eddig ismeretlen molekulák vesznek még részt a gyulladásban megismert sejtek tumoros folyamatokkal kapcsolatos funkcióiban, eleddig meglehetősen ismeretlen terület. Célunk volt tehát

- A hízósejtekben és az eddig sokszor méltatlanul mellőzött bazofilokban új gének, ill. mikroRNS-ek azonosítása.
- A differenciáltatott mukozális hízósejtekből végzett microrarray vizsgálat alapján olyan proteázok és proteáz-inhibitorok megtalálása, melyek expressziója hízósejtekben korábban még nem volt ismert.
- A kiválasztott gének expressziójának real-time PCR-rel való validálása és a funkcionálisan releváns gének expressziójának fehérjeszinten történő megerősítése.
- A validált gének funkcióinak megbecslése az adott gének más sejtekben, szövetekben való szerepét tárgyaló irodalmi adatok alapján, és az így a felmerült funkciók igazolása vagy elvetése a mukozális hízósejtekben.
- Irodalmi adatok alapján kiválasztott mikroRNS-ek expressziójának bazofilokban való igazolása.
- A bazofilok differenciálódásához, illetve aktivációjához szükséges IL-3 hatása az azonosított mikroRNS-ek expressziójára.

Módszerek

Csontvelői hízósejtek izolálása

2-4 hónapos Balb/c vad, nőstény egerek csontvelői sejtjeinek izolálása céljából, cervikális diszlokációt követően, steril eszközökkel mindkét femurt eltávolítottuk, majd átmostuk a csontvelőt. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel.

A c-kit pozitív populáció kinyerésére a sejtfelszíni CD117 alapján, mágnesesen kétszer szeparáltuk a sejteket MACS LS szeparációs oszlopokon.

A Balb/c-egér csontvelői őssejteket *in vitro* tenyésztettük.

A csontvelői szeparációból származó sejtekhez hozzáadtunk 40 ng/ml rekombináns egér SCF-et és 4 ng/ml rekombináns egér IL-3-at, valamint néhány kísérletben emellett 2 ng/ml humán TGF- β 1-et és 10 ng/ml IL-9-et is adtunk a tápoldathoz, így biztosítva a körülményeket az *in vitro* létrehozott, mukozális hízósejteknek megfelelő típusú sejtek differenciálódásához.

A tápoldat felét 4-5 naponta cseréltük.

20 nap differenciálódás után a sejt kultúra homogenitását alciánkék-safranin festéssel és áramlási citométerrel ellenőriztük.

A hízósejt-differenciálódás során bekövetkező génexpressziós változások vizsgálata céljából a sejtenyésztés 4. és 20. napján a sejt kultúra sejtjeiből mágneses szeparációt végeztünk a sejt felszíni CD117 alapján, a fent említett módon.

Köldökvér eredetű hízósejtek izolálása

A köldökvér-eredetű humán mononukleáris sejtek szeparálása Histopaque oldat segítségével történő, sűrűség alapú elválasztással, majd a CD34⁺ őssejtek mágneses szeparációja segítségével történt. A sejtenyésztés 10% FCS-tartalmú, komplett DMEM tápoldatban, 40 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-6 és 3 μ M lizofoszfátsav hozzáadásával történt. A tápoldat felét 4-6 naponta cseréltük. 6 hét elteltével a sejteket mágnesesen szeparáltuk egér anti-humán CD117 antitesttel és mágnesesen jelölt, kecske anti-egér IgG-vel.

A peritoneális hízósejtek izolálása

A peritoneális sejtek kinyeréséhez szintén cervikális diszlokációt alkalmaztunk, majd kb. 15 ml jég hideg PBS-t injektáltunk a hasüregbe. 1-2 perces inkubációt követően a folyadékot kiszívtuk, jégre tettük, majd még egyszer megismételtük a folyamatot.

PBS-sel történő mosást követően a sejteket a sejt felszíni CD117 alapján mágnesesen kétszer szeparáltuk MACS LS szeparációs oszlopokon.

A sejt kultúra homogenitását alciánkék-safranin festéssel és áramlási citométerrel ellenőriztük.

Toluidinkék és alciánkék-safranin festés

A hízósejt kultúrából vett kis aliquotokat tárgylemezre citocentrifugáltuk, a centrifugált sejteket a festés előtt 10 percre jég hideg metanolba helyeztük, majd 0,1 %-os toluidinkék (pH 1) vagy alciánkék-safranin oldatban inkubáltuk 45 percig, szobahőmérsékleten. A pozitív sejtek arányának

(toluidinkék esetében a metakromáziás sejtek aránya) meghatározását követően a min. 90%-os tisztaságú sejt kultúrákat használtuk fel.

Hízósejtek vizsgálata áramlási citometriával

PBS-sel való mosást követően a mintákat 25 percig inkubáltuk az ellenanyaggal szobahőmérsékleten, majd centrifugáltuk. A következő ellenanyagokat használtuk fel kísérleteink során: anti-humán CD117 PE, anti-egér CD117 APC, anti-egér B220 PE, anti-egér CD11b PE, egér anti-humán triptáz, egér anti-humán kimáz és anti-egér IgG FITC. Végül a minták mosása után a mérés FACSCalibur műszeren történt.

Intracelluláris áramlási citométeres analízis előkészítése során a sejtek jelölését megelőzően a mintákat 2%-os PFA-ban fixáltuk 20 percig, majd 0,1 %-os szaponinban permeabilizáltuk.

RNS-izolálás, minőségellenőrzés és real-time PCR

A különböző hízósejt mintákból RNS izolálást végeztünk RNeasy Isolation Kit segítségével. A teljes RNS mennyiségi és minőségi ellenőrzése Agilent 2100 Bioanalyzer berendezés felhasználásával történt. Mind a Real-time PCR, mind a microarray kísérletekhez csak azon mintákat használtuk fel, melyek esetében az RNS integritási szám (RIN) 8.0 fölötti, a gékép tiszta és DNS szennyeződés nem volt kimutatható a hisztogramjukon.

1 U MuLV Reverz Transzkriptáz enzim segítségével 1 µg RNS-t írtunk át random primerek felhasználásával 42 °C-on, 55 percig, majd inaktiváltuk a MuLV enzimet 95°C-on, 5 percig.

A real-time PCR-reakciót 25 µl végtérfogatú, 1,5 µl cDNS-tartalmú mintákkal végeztük el, ABI Prism 7000 berendezés segítségével.

Microarray és IPA

A microarray kísérletekhez Agilent Mouse Oligonucleotide 22K chipet használtunk. A GeneSpring 7.3 szoftverből származó génexpressziós adatokat tovább analizáltuk Ingenuity Pathway Analysis alkalmazás segítségével.

Western-blot analízis

A sejteket lízispufferben denaturáltuk, majd Bradford-módszerrel meghatároztuk a minták fehérjetartalmát. Mintánként 15 µg fehérjét denaturáltunk, és redukáltunk β-merkaptotanolban 100 °C-on 5 percig, majd 10 %-os SDS-PAGE felhasználásával gélelektroforézist végeztünk. A futtatás eredményét Immobilon-P membránra blottoltuk. Molekulasúly markerként egy „full-range

Rainbow"-t használtunk. A membránokat 10% tejporos PBS-tartalmú oldattal blottoltuk 1 órán át majd az elsődleges ellenanyagot 1% tejpor-és 0,1% Tween-20 tartalmú PBS-oldatba helyeztük 2 óra hosszára, szobahőmérsékletre, Tween-PBS-ben történő erőteljes mosás után a HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltattuk 45 percig. Az előhívás ECL Plus Western Blotting Detection System segítségével történt.

Housekeeping kontrollként anti-tubulin ellenanyagot használtunk.

Munkánk során a következő antitestek kerültek felhasználásra: nyúl poliklonális anti-N-terminális HtrA1 antitest (1:250-es hígításban), egér anti-humán HtrA1, patkány anti-tubulin antitest (1:1000-es hígításban), anti-patkány HRP (1:10000-es hígításban), anti-egér HRP (1:10000-es hígításban), anti-nyúl HRP (1:8000-es hígításban).

ELISA assay-k

A hisztamin ELISA kereskedelmi forgalomból. A sejt kultúra felülűszojában található HtrA1 fehérje detektálására saját fejlesztésű ELISA-t használtunk. Maxisorp lemezek felszínét nyúl poliklonális anti-HtrA1 N-terminális antitesttel (0,5 µg/lyuk, 100 µl-es térfogatban) inkubáltunk egy éjszakán keresztül, majd blokkoltuk 1% BSA-t tartalmazó PBS + 0,5% Tween-20 oldatban. Elfogó antitest gyanánt monoklonális anti-humán HtrA1-et alkalmaztunk, 1 µg/ml-es koncentrációban, majd másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-egér antitestet, 1:10000-es hígításban. A reakciót végül TMB-szubsztrát segítségével tettük láthatóvá, 2N kénsavval állítottuk le, majd 450 és 540 nm-en olvastuk le.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálat

A humán hízósejt kultúrák aliquotjait tárgylemezre citocentrifugáltuk, majd 10 percig 2%-os paraformaldehidben fixáltuk őket. A mintákat ezután 3-szor mostuk mosópufferben, majd az aspecifikus kötést kialakító részek blokkolására nem-immun egér szérummal inkubáltuk 45 percig, szobahőmérsékleten. A sejteket egér anti-humán HtrA1 antitesttel jelöltük (5 µg/ml), 60 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd PBS-ben mostuk 3-szor. A sejteket ezután FITC-cel jelölt anti-egér másodlagos antitestekkel inkubáltuk 40 percig szobahőmérsékleten, és Daunorubicinnal festettük. Az elkészített tárgylemezeket Bio-Rad MRC 1024 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk, fényforrásként argon/kripton vegyes gázlézert alkalmazva. A lézert 480 nm-es hullámhosszon gerjesztettük. Minden negatív kontroll (melyek előkészítésekor az elsődleges antitestet kihagytuk) esetében a fluoreszcens háttér elhanyagolhatóan bizonyult.

Statisztikai elemzés

Az adatoktól függően egyszempontos ANOVA, majd „Tukey’s all pairwise multiple comparison”, illetve Student-féle t-próba.

Az adatok kiértékeléséhez Excel-t, illetve Statistica 7-es verziójú szoftvereket használtunk.

Humán vérminták

A felhasznált perifériás vérminták normál felnőtt egészséges véradók vérmintái, melyek az Országos Vérellátó Szolgálatról származnak. A teljes kísérleti periódus alatt az 1975-ös Helsinki Deklarátum útmutatója és szabályrendszere alapján jártunk el, és a kísérletek a Magyar Tudományos Etikai Bizottság jóváhagyásával történtek.

Bazofilok perifériás vérből való immunomágneses szeparálása és IL-3-mal való *in vitro* stimulációja

Bazofil granulociták perifériás vérből való izolálására egy kétlépéses módszert alkalmaztunk, melynek során első lépésben sűrűség alapú szeparálást végeztünk HetaSepTM segítségével, majd állómágnes és az EasySep Human Basophil Enrichment Kit felhasználásával a bazofil sejteket negatív izolálással választottuk el. Az izolált bazofil populációk tisztaságát FACSCalibur áramlási citométerrel (FSC/SSC) és May-Grünwald festéssel igazoltuk.

A humán bazofil mintákat 10% FCS, 100 U/ml penicillin és 0.1 mg/ml streptomycin tartalmú komplett RPMI médiumban inkubáltuk 100 percig 10 ng/μl hIL-3 jelenlétében vagy hiányában, 3×10^5 sejt/well vagy lyuk elosztásban, 96-lukú lemezben. A klasztereket formázó élő sejt kultúrákat 37°C-os inkubátorral kiegészített Nikon Diaphot TMD-EF típusú mikroszkópban fényképeztük le.

A humán bazofil sejtek festése May-Grünwald festékkel

Az izolált bazofil mintákból vett kis aliquotokat tárgylemezre citocentrifugáltuk, majd 3 percig 0,25% May-Grünwald oldattal festettük.

A humán bazofil granulociták mikroRNS-einek izolációja, detektálása és az rhIL3 hatása a mikroRNS expresszióra

A miRNS izolációhoz, illetve kimutatáshoz egyaránt TaqMan MicroRNA Cells to Ct Kit-et használtunk, a gyártó utasításai szerint megadott módon. A génexpressziós analízishez $\Delta\Delta Ct$

módszert alkalmaztunk. A delta-delta Ct értékek normalizálásához RNU48-at, mint endogén kontrollt alkalmaztunk.

A real-time PCR amplifikációkhoz a TaqMan microRNA Assay-k szekvencia-specifikus primereit használtuk (RNU48 Assay ID 001006, hsa-miR-16 Assay ID 000391, hsa-miR-155 Assay ID 002623, hsa-miR-223 Assay ID 002295) ABIPrism 7000 berendezésben. A technikai beállításokhoz a kísérletek megkezdése előtt egy előkísérletet végeztünk, a gyártó utasításai szerint.

Annak vizsgálatára, hogy az rhIL-3 hogyan befolyásolja a miR-223, a miR-155 és a miR-16 expressziót, 100 perces 10 ng/ml rhIL-3-mal történő inkubációt követően realtime PCR-méréseket végeztünk.

A miRNS-ekre vonatkozó target predikció és útvonal-elemzés

A hsa-miR-223, hsa-miR-155 and hsa-miR-16 esetében lehetséges potenciális targetek azonosítása érdekében 'multiple' miRNS elemzést végeztünk DIANA-mirPath software segítségével. Az általunk használt 'multiple' miRNA analízis olyan útvonalak azonosítását végezte el, amelyek a 3 miRNS esetében együttesen megvalósulhatnak. Ezek közül is azon útvonalakat kerestük, melyeket az 5 kereső algoritmusból legalább 3 egyaránt azonosított. Közöttük szerepelt az „FcεRI szignalizációs útvonal”, valamint a ‘Hisztidin metabolizmus útvonal’ is, melyek számos bazofil granulocita funkcióval is kapcsolatba hozhatóak.

Eredmények

A mukozális hízósejtek differenciálódásának modellezése

Egér mukozális hízósejtek *in vitro* differenciálódása során jelentős mértékű expressziót mutató, eddig le nem írt gének azonosítása érdekében, a sejteket IL-3+SCF+IL-9+TGFβ jelenlétében tenyésztettük, majd a differenciálódás két különböző időpontjában mágneses szeparációt végeztünk a sejtfelszíni CD117 expresszió alapján. Az első időpont - a sejtdifferenciálódás 4. napja – a differenciálódás olyan stádiumát jelenti, melyben a sejtek jellemzően hízósejt progenitoroknak felelnek meg. A teljesen érett mukozális hízósejtek a differenciálódás 20. napján izolált sejteknek felelnek meg. Az általunk vizsgált sejtpopulációk tisztasága 95%-osnál nagyobb volt, ahogyan azt áramlási citometriával igazoltuk. Alciánkék-safranin festéssel negatívnak bizonyultak a 4 napos sejtek, valamint esetükben csökkent Mcpt1 expresszió volt megfigyelhető. Ezzel szemben a 20 napos sejtek alciánkék-safranin festéssel kékre színeződtek, és esetükben jelentős Mcpt1 expresszió volt megfigyelhető –

ezáltal bizonyítva, hogy ez az érett típus a mukozális hízósejtek irányában elköteleződött sejteknek felel meg.

Továbbá, az IL-3+SCF+IL-9+TGF β jelenlétében 20 napig differenciáltatott sejtek esetében alacsonyabb c-kit expresszió volt megfigyelhető, mint az IL-9 és TGF β hiányában tenyésztett 20 napos populáció esetében. Sőt, az alacsonyabb sejtfelszíni c-kit expresszió mellett, magasabb mRNS expressziót mutattak Mcpt1-re nézve, ahol az Mcpt1 az érett mukozális hízósejtek jellemző proteázának génje. Ezen eredmények jól korreálnak azon korábbi feltételezésünkkel, hogy a szóban forgó sejtek az érett mukozális hízósejtek megfelelői.

A mukozális hízósejtek érése során különbözőképpen expresszálódó proteáz és proteáz-inhibitor gének kiválasztása

Annak érdekében, hogy rátaláljunk azon génekre, amelyek expressziója megváltozik a mukozális hízósejtek differenciálódása során, kétcsatornás micorarray kísérletben a 4 és 20 napos minták kerültek összehasonlításra. A kapott adatok közül a $p < 0,05$ szinten (Benjamini-Hochberg-féle hamis elfogadási arány alapján) több mint 2-szeres upregulációban részesült géneket szűrtük ki. Mivel a hízósejtek gazdag forrásai különböző proteázoknak, a 240 szignifikánsan upregulálódott gén közül kiválasztottuk a proteázokat és proteáz-inhibitorokat. Ahogy az várható volt, a lista számos jól ismert, hízósejt-specifikus proteáz gént tartalmazott (Mcpt5, Mcpt6, Mcpt1), valamint olyanokat is, melyek funkciója még kevésbé ismert (triptáz-gamma 1, másnéven transzmembrán-triptáz). Sőt, olyan proteáz, illetve proteáz-inhibitor géneket (pl. Spink-2 vagy HtrA1) is azonosítani tudtunk, melyek hízósejtekben való előfordulása korábban még nem volt ismert. A microarray eredményeket a Prss11 (HtrA1), a Spink2, a Tpsg1, az Mcpt6, valamint az Mcpt1, mint pozitív kontroll esetében real-time PCR módszerrel validáltuk.

A HtrA1 (Prss11) az érett mukozális hízósejtekre nézve specifikusnak bizonyult

A kiválasztott proteázok és proteáz-inhibitorok expressziójának mértékét megvizsgáltuk éretlen és érett mukozális hízósejtekben, illetve a különböző hízósejt-populációkban. Kísérleteink során az érett mukozális hízósejtek IL-3, SCF, IL-9 és TGF β jelenlétében differenciáltattuk, míg az éretlen hízósejtek IL-9 és TGF β hiányában nőttek, a kötőszöveti hízósejtek pedig a peritoneumból izoláltuk. A kiválasztott proteáz, illetve proteáz-inhibitor gének közül a HtrA1 specifikusnak bizonyult az érett mukozális hízósejtekre nézve.

Mivel az mRNS-szinten mért változások nem mindig felelnek meg a protein-szinten tapasztalt változásoknak, ezért a HtrA1 expresziót Western-blottal is megvizsgáltuk. A HtrA1 fehérje

nem bizonyult detektálhatónak az éretlen mukozális hízósejtekben (melyek csak IL-3 és SCF jelenlétében differenciálódtak), 20 napos sejt kultúrában. Továbbá, a 20. napon izolált érett mukozális hízósejt kultúrában magasabb Prss11 fehérje expressziót tapasztaltunk, mint az éretlen, 4 napos sejt kultúrában. Sikerült tehát a microarray eredményeket fehérjeszinten is igazolnunk.

Humán triptáz-típusú hízósejtek is expresszálják a HtrA1-et

Mivel számos publikációban utalnak az egér és a humán rendszer közti különbségekre, mi is megvizsgáltuk a HtrA1 jelenlétét humán rendszerben. Köldökvér-eredéű hízósejtek toluidinkékkal metakromatikusan festődnek 6 hetes sejt kultúrában, triptáz-pozitívak, kimázt viszont nem tartalmaznak, melyek a humán triptáz-típusú hízósejtekre jellemző tulajdonságok. A triptáz-típusú hízósejteknek tűnő sejtek a HtrA1-et különböző mértékben, de folyamatosan termelik. Úgy találtuk továbbá, hogy számos más proteázzal ellentétben a HtrA1 nem a szekréciós granulumban tárolódik.

A HtrA1 konstitutívan szabadul fel humán hízósejtekből

A HTRA1 nem a szekréciós granulumban lokalizálódik, hanem e fehérjét (az Mcpt1 kimázhoz hasonlóan) konstitutív módon szecernálják a hízósejtek. Ezt a kijelentést azon ELISA kísérleteinkre alapozzuk, melyek során kezeletlen, illetve Ca-ionofór (ionomycin) kezelt triptáz típusú hízósejt tenyészetek felülúszóiban HTRA1-tartalom tekintetében nem találtunk különbséget. A kezelt sejt kultúrák esetén tapasztalható fokozottabb hisztamintermelés révén igazoltuk ugyanakkor az ionomycin degranulációt kiváltó hatását.

A HtrA1 nem befolyásolja a TGF β általi egér mukozális hízósejt differenciálódást

Génexpressziós adataink Ingenuity Pathway Analízise szerint a HtrA1 két útvonal-hálózat része. Az egyik hálózat apoptózissal, illetve rákkal kapcsolatos géneket tartalmaz, a másik csoportba a sejt/kötőszövetes fejlődésben és funkcióban, vagy a szkeletális és muskuláris rendszer fejlődésében szereplő gének tartoznak. A kapott adatok szerint a *HtrA1* csak két másik génnel lép közvetlen kapcsolatba: az egyik a *Tgfb1*, a másik a szintén a TGF β -családba tartozó *Bmp4*. Továbbá, a HtrA1 Tgf β -gátló hatását is leírták már. Ennek alapján megvizsgáltuk, hogy a HtrA1-nek van-e Tgf β -gátló hatása a mukozális sejtek differenciálódására nézve. Kétféle HtrA1-koncentrációt alkalmaztunk: 5 ng/ml-t, az általunk humán hízósejt felülúszókban mért HtrA1-koncentráció alapján, és 50 ng/ml-t, egy publikáció

alapján. Meglepetésünkre, a HtrA1 nem változtatta meg sem az Mcpt1-, sem a sejtfelszíni c-kit expresszió mértékét, az általunk használt modellrendszerben tehát nem sikerült kimutatnunk TGF β -gátló képességét az egér mukozális hízósejtek differenciálódása esetében.

Az izolált bazofilok tisztasága

A perifériás vérből izolált humán bazofil populáció közel homogénnek (99%-osnál tisztábbnak) bizonyult.

A rhIL-3-kezelés hatása a bazofil sejtenyészetekre

hIL-3-mal való 100 perces kezelés hatására a sejtek jellegzetes csoportosulása figyelhető meg a hIL-3-at tartalmazó sejt kultúrában, miközben a kontroll sejt kultúrában egyedi, lekerekített, különálló sejtek láthatóak.

miRNS-expresszió humán bazofilokban

A kezeletlen bazofilok miR-223-at, miR-155-öt és miR-16-ot expresszálnak. A miR-223 és a miR-155 esetében ismert, hogy a granulociták differenciálódásának szabályozásában jelentős, míg a miR-16 magas szinten expresszálódik minden natív hematopoietikus sejtvonalban, valamint sokféle szövetben. Mind a miR-16, mind a miR-223 esetén magas szintű, míg a miR-155 esetén alacsonyabb, de jellemző expressziót tapasztaltunk egészséges humán bazofil mintákban.

A rhIL-3 hatása a bazofilok miRNS expressziójára

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a hIL-3 kezelés hatását a bazofilok miR-223, miR-155 és miR-16 expressziójára nézve, real-time PCR méréseket végeztünk. Mindhárom vizsgált mikroRNS esetében csökkent miRNS-expressziót tapasztaltunk rhIL-3 kezelés következtében. A legmarkánsabb különbséget a miR-223 esetében találtuk, amit a miR-155, majd a miR-16 követett.

A detektált miRNS-ek target predikciós és útvonal-analízissel kapott eredményei

A DIANA-mirPath szoftver által használt 5 algoritmus közül legalább 3-ban szerepelt az 'Fc ϵ RI szignalizációs útvonal', valamint a 'Hisztidin metabolizmus útvonal' is, mely útvonalak számos bazofil granulocita funkcióval is kapcsolatba hozhatóak.

Következtetések

- A differenciáltatott egér mukozális hízósejteken végzett microarray-kísérletből kiindulva, gén- és fehérjeszinten is kimutattunk egy, az egér mukozális és az ember triptáz-típusú hízósejtjeire jellemző szerin-proteázt, a HtrA1-et.
- Igazoltuk, hogy a HtrA1 nem csak jellemző, hanem specifikus is a mukozális hízósejtekre, hiszen az egérben található másik hízósejttípusban, a kötőszöveti hízósejtekben csak igen mérsékelt expresszióját tapasztaltuk.
- Bár irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a HtrA1 gátolja a Tgf β -szignalizációs útvonalat, kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a HtrA1 nincs hatással a Tgf β -indukált hízósejt differenciálódásra, de feltételezéseink szerint szerepe lehet a hízósejtek által indukált szöveti átrendeződéses folyamatokban.
- Az irodalomban elsőként azonosítottunk bazofilokban expresszálódó mikroRNS-eket. Kimutattuk a miR-223, a miR-16 és a miR-155 humán bazofilokban való expresszióját. A legerősebb expressziót a miR-223 esetében tapasztaltuk, amely a mieloid és a granulocita differenciálódás szabályozásának kulcsfontosságú mikroRNS-e és számos rákos megbetegedéssel kapcsolatba hozták már.
- Kimutattuk, hogy ezen mikroRNS-ek a bazofilok differenciálódásához, aktivációjához és túléléséhez szükséges IL-3 hatására downregulálódtak.

Saját publikációk jegyzéke

1. Gilicze A, Köhalmi B, Pócza P, Keszei M, Jaeger J, Görbe E, Papp Z, Tóth S, Falus A, Wiener Z

HtrA1 is a novel mast cell serine protease of mice and men.

MOLECULAR IMMUNOLOGY 44:(11) pp. 2961-2968. (2007) IF: 3.742

2. Gilicze AB, Wiener Z, Toth S, Buzas E, Pallinger E, Falcone FH, Falus A

Myeloid-derived microRNAs, miR-223, miR27a, and miR-652, are dominant players in myeloid regulation.

BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL 2014: p. 870267. (2014) IF: 2.706*

3. Falus A, Gilicze A

Tumor formation and antitumor immunity; the overlooked significance of histamine.

JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 96:(2) pp. 225-231. (2014) IF: 4.304*

Megjegyzés: a *-gal jelölt Impakt Faktor-adatok az előző év alapján becsült értékeket jelenti.