

Szakmai zárójelentés a PD75938 pályázathoz

A pályázat keretei között elvégzett kísérletek eredményei a munkatervben meghatározott feladatok sorrendje szerint kerülnek tárgyalásra.

1. feladat/ A mesenchymalis őssejtek által termelt immunszuppresszív faktorok meghatározása.

A mesenchymalis őssejtek (MSC) által termelt, T sejtekre ható gátló faktorok közül a szakirodalom elsősorban a prosztaglandin E2 (PGE2), tumor növekedési faktor (TGF)- β , interleukin (IL)-10, nitrogén-monoxid (NO) és az indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) szerepét emeli ki, illetve az utóbbi években a galektin (Gal)-1 szerepére is történt utalás. Ezeknek a faktoroknak a termelését mRNS, illetve fehérje szinten határoztuk meg csontvelői MSC-ből.

- Mind az egér (eMSC), mind a humán (hMSC) mesenchymalis őssejtekben kimutattuk a Gal-1 fehérje termelését Western-blot technikával. A Gal-1 szekretálódhat, ekkor visszakötődik a termelő sejtek felszínén levő glikozilált struktúrákhoz, amit áramlási citometriával detektáltuk. Mivel a humán csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtekhez (MSC) való hozzáférésünk korlátozott és transzfektálhatóságuk alacsony hatásfokú, ezért a további kísérleteinket zömében egér rendszerben végeztük.

- Az eMSC Gal-1 termelését siRNS technikával csendesítettük, stabil transzfektáns vonalakat hoztunk létre (siMSC), amelyek Gal-1 termelése lényegesen alacsonyabb, mint a vad típusú sejteké (eMSC), vagy a scrambled RNS-sel transzfektált vonalaké (scMSC) (QRT-PCR, Western-blot és FACS ellenőrzés is történt). Az egér rendszer további nagy előnye a Gal-1 knock out egértörzs elérhetősége, amely biztosítja, hogy ezekből az állatokból izolált csontvelői MSC egyáltalán nem termel Gal-1-et (Gal-1 KO MSC).

- Az eMSC által termelt egyéb immunszuppresszív faktorok vizsgálata QRT-PCR módszerrel történt. Alapállapotban összehasonlítva a vad típusú és a Gal-1 KO MSC-ből közel azonos mennyiségű TGF- β , COX2 (PGE2 szintézisért felelős), PD-L1, NOS2 (nitrogén-oxid szintáz 2) mRNS mutatható ki, IDO-t egyik sem fejez ki. Ismert, hogy az aktivált T sejtek által termelt gyulladáscsökkentő citokinek indukálják ezeknek a faktoroknak a megnövekedett szintjét az MSC-ben. Az MSC sejt kultúrát aktivált T sejtek kondicionált médiumával kezelve megnövekedett a NOS2, COX2, IDO1 és PD-L1 expressziója. A vad típusú és Gal-1 hiányos eMSC sejt vonalak válaszában mértéke eltért: a Gal-1 KO MSC-ben erőteljesebb transzkripciót tapasztalunk, a NOS2 esetén ez a különbség 20-szoros, IDO1-nél 8.5-szeres, a COX2 és a PD-L1 esetén 3.5-szeres mRNS mennyiséget jelent. IL-10-et nem sikerült kimutatnunk egyik MSC vonalból sem, indukció hatására sem. Rekombináns IFN- γ -val kezelve az eMSC sejt vonalakat a vizsgált gének expressziós profilja hasonlóan változik, mint az aktivált T sejt felülúszóval történő kezelés esetén, bár még magasabb szintű génkifejeződés figyelhető meg a NOS2, IDO1 és a PD-L1 esetén.

Az ismert immunszuppresszív faktorok mellett tehát mind a humán, mind az egér MSC Gal-1 termelését sikerült igazolnunk. Az egér MSC sejt vonalaink (vad típusú,

siMSC, scMSC, Gal-1 KO MSC) fenotípusos jegyeikben (CD44, CD73, CD90 és Sca-1 sejtfelszíni markerek), differenciálódási képességükben adipogén és osteogén irányba, valamint az alapállapotban kifejezett faktoraik mértékében sem különböznek, de aktivált T sejtek jelenlétében génexpressziós profiljuk eltérően változik. Az eMSC sejtvonalak jellemzése egy közlésre elküldött kéziratban szerepel (G. Szébeni et al. „Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stem cell-mediated tumor promotion”, bírálóat alatt)

2. feladat/ A Gal-1 MSC immunszuppresszív hatásában betöltött szerepének meghatározása.

Az MSC által termelt Gal-1-nek a T sejtekre gyakorolt hatását két folyamatban vizsgáltuk: egyrészt a T sejtek poliklonális aktivációjára és osztódására kifejtett, másrészt a már előzetesen aktivált T sejtek életképességét befolyásoló hatást.

A) Antiproliferatív hatás:

- Az eMSC gátolta a lépsejtek ConA-val kiváltott osztódását, ez az antiproliferatív hatás már alacsony, 1:80 MSC:lépsejt aránytól detektálható. Részletesebb vizsgálataink alapján az MSC-vel való együtt tenyésztés gátolta mind a CD4⁺, mind a CD8⁺ T sejtek antiCD3+antiCD28 aktiváló gyönggyel indukált osztódását.

- Összehasonlítva a vad típusú MSC, a Gal-1 KO MSC, az scRNS-, illetve siRNS-transzfektált MSC sejtvonalak osztódás-gátló hatását azt tapasztaltuk, hogy minden esetben, a Gal-1 termeléstől függetlenül, jelentősen csökkent a velük együtt tenyésztett aktivált T sejtek osztódása a kontroll aktivált T sejt mintákhoz képest. A Gal-1 hiányában tehát más immunszuppresszív faktor lehet felelős az MSC anti-proliferatív hatásáért.

- Az MSC által termeltIDO, TGF- β , PGE2 szolubilisek, míg a Gal-1 szekréciója után azonnal visszakötődik a termelő sejtek glikozilált struktúráihoz, vagy az extracelluláris mátrixhoz, nem mutatható ki a sejtek felülűszójában, közvetlen sejt-sejt interakcióban hat. A vad típusú MSC esetében a szolubilis faktorok és a sejt felszínhez kötött faktorok együttesen vezetnek az osztódás-gátláshoz, mert a közvetlen sejt-sejt kapcsolódást megakadályozó Transwell rendszerben kisebb mértékű gátlást tapasztaltunk, mint a sejt-sejt kölcsönhatást megengedő ko-kultúrában. Ennek megfelelően a Gal-1 KO MSC esetében nem volt különbség a kokultúrában vagy Transwell rendszerben tapasztalt osztódás-gátlás között, vagyis ez esetben a gátlást csak a szolubilis faktorok közvetítik. A PD-L1 ugyan membránfehérje, de gátló ellenanyaggal fedve nem csökkent az eMSC antiproliferatív hatása, szerepe ebben a rendszerben kizárható. A szolubilis faktorok közül a PGE2, NO ésIDO inhibitorait alkalmaztuk, azonban nem fordították vissza az MSC kiváltotta gátlást, így nem kaptunk egyértelmű eredményt arra vonatkozóan, melyik játszik fő szerepet az MSC antiproliferatív hatásában.

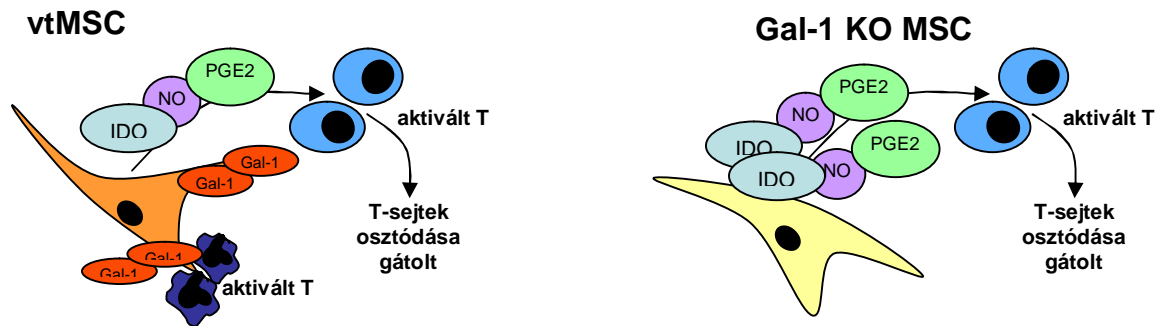
B) Citotoxikus hatás:

- Az MSC, és az általa termelt Gal-1 citotoxikus hatását ConA aktivált lépsejteken (eMSC-vel) vagy humán perifériás vérből izolált PHA stimulált T sejteken és Jurkat lymphoma sejteken (hMSC-vel) vizsgáltuk ko-kultúra rendszerben. Kísérleteink alapján

már 16 óra elteltével egyértelműen detektálható az apoptózis egyik jellemző markerének, a foszfatidil-szerinnek megjelenése a T sejteken. Ezt a rendszert eredetileg tumor sejtek és aktivált T sejtek közötti kölcsönhatás vizsgálatára dolgozta ki munkacsoportunk (F. Kovács-Sólyom, A. Blaskó, R. Fajka-Boja et al. *Immunology Letters* 127 (2010) 108–118).

- Transwell kísérleink azt bizonyítják, hogy a Jurkat sejtekben csak akkor indul el az apoptózis, ha a hMSC-vel közvetlen sejt-sejt kapcsolatot létesítenek. Ebben a folyamatban tehát nem a szolubilis, hanem membrán-kötött faktorok, mint a Gal-1, vesznek részt. A Gal-1 laktózzal „lemosható” az őt termelő sejtek felszínéről, ezáltal jelentősen csökkent a hMSC Jurkat sejtekre gyakorolt, valamint az eMSC ConA aktivált egér lépsejtekre kifejtett apoptotikus hatása. Ez arra utal, hogy az MSC által termelt Gal-1 jelentős mértékben hozzájárul az MSC citotoxikus funkciójához.

- Az siRNS-sel csendesített vagy Gal-1 KO MSC-vel végzett kísérleteink alapján további bizonyítást nyert, hogy a kokultúrás rendszerben valóban az MSC által termelt Gal-1 a felelős az aktivált T-sejtek apoptózisáért.



Kísérleteink azt mutatják, hogy a Gal-1 ugyan hozzájárul az MSC antiproliferatív hatásához, de hiányában más immunszuppresszív faktorok hasonlóan gátolják a T sejtek mitogén-indukálta osztódását. Eredményeink alapján sem a Gal-1, sem a PGE2, NO vagy IDO szerepe nem kizárólagos, együttes működésük eredője vezet a T sejtek szuppressziójához. Emellett az egér vagy humán MSC közvetlen sejt-sejt kapcsolatban az aktivált T sejtek apoptózisát indukálja, és ezt az MSC által termelt Gal-1 váltja ki. Az MSC antiproliferatív és citotoxikus hatását kimutató munkánkat hazai konferenciákon mutattuk be. Az MSC által kiváltott Gal-1 függő apoptózis egy szabadalmi eljárás része (Monostori É; Szebeni GJ; Blaskó A; Gercsó AT; Kovács-Sólyom F; Fajka-Boja R; Uher F; Krenács L; Joó G; Tubak V; Martinek T: Preparations for delivery of agents to solid tumours, Magyar Szabadalmi Hivatal P0900502, 2009).

3/ A rekombináns és az MSC által termelt Gal-1 által indukált T sejt apoptotikus mechanizmusának összehasonlítása.

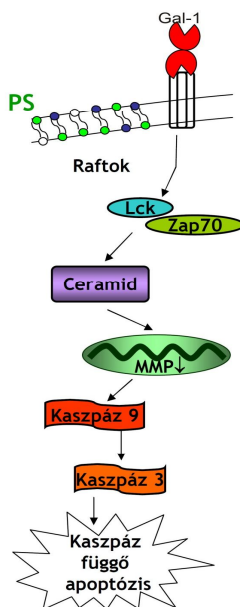
Az MSC által termelt Gal-1 abban az esetben tölti be apoptotikus funkcióját, amennyiben szekretálódik és visszakötődik az őt termelő sejtek felszínéhez. Az apoptózis kiváltásához szükséges Gal-1 koncentráció ebben a rendszerben gyakorlatilag nem mérhető. Számtalan tanulmány foglalkozik a szolubilis formában a T sejtekhez hozzáadott rekombináns Gal-1 által kiváltott apoptózis mechanizmusával, azonban az

alkalmazott koncentrációk és az apoptotikus lépések is eltérnek, és nem adnak választ arra, hogy mi zajlik *in vivo* körülmények között. Erre a következő szisztematikus kísérletsorozatot végeztük:

- A rekombináns Gal-1-et különböző koncentrációkban használva összehasonlítottuk a Jurkat T sejtekben indukált sejthalál mechanizmusát, és azt tapasztaltuk, hogy alacsony koncentrációban ($1.8\mu\text{M}$) alkalmazva kaszpáz-függő, míg egy nagyságrenddel magasabb dózisban ($18\mu\text{M}$) kaszpáz-független útvonalon megy végbe (kapcsolódó publikáció: *Blaskó A, Fajka-Boja R et al. Acta Biologica Hungarica 62(1), pp. 114–119 (2011)*). Az alacsony koncentrációjú Gal-1 kötődése a T sejtekhez raft-átrendeződést indukál, az Lck és ZAP70 tirozin kinázok aktivációját igényeli a további apoptotikus lépésekhez, amelyekben ceramid szabadul fel, csökken a mitokondriális membrán potenciál, végül a kaszpáz-9 és kaszpáz-3 aktivációjával bekövetkezik a DNS degradáció.

- Az MSC-termelte Gal-1 által kiváltott apoptózis lépéseit az előző feladatnál bemutatott kokultúra rendszerben vizsgáltuk. Aktivált egér lépsejteket vad típusú vagy Gal-1 KO MSC-vel tenyésztettünk együtt és detektáltuk a foszfadil-szerin expozíciót, az intracelluláris ceramid mennyiségének növekedését, a mitokondriális membrán potenciál csökkenését, a kaszpáz 3 aktivációt, és a DNS fragmentációt. Megállapítottuk, hogy az MSC által kiváltott, Gal-1 függő T-sejt apoptózis azonos mechanizmussal zajlik, mint az alacsony koncentrációjú szolubilis rekombináns Gal-1 által indukált.

- Hasonló a mechanizmusa a patológiás tumorsejtek termelte Gal-1 által okozott T-sejt apoptózisnak is, tehát a Gal-1 mind fiziológiás (MSC), mind patológiás (tumor) esetben is azonos szerepet tölt be: kiváltja a velük sejt-sejt kapcsolatba lépő aktivált T-sejtek pusztulását (közlemény: *F. Kovács-Sólyom, A. Blaskó, R. Fajka-Boja et al. Immunology Letters 127 (2010) 108–118*). Fontos megjegyezni, hogy a tumor sejtek számos más faktort termelhetnek, amelyek apoptózist válthatnak ki az aktivált T sejtekben, ennek ellenére a Gal-1 siRNS csendesített tumorsejtek jelenlétében egyik apoptotikus lépés sem ment végbe a vizsgált körülmények között.



Összefoglalva az apoptózissal kapcsolatos eredményeinket elmondhatjuk, hogy az MSC a Gal-1 révén a közvetlen sejt-sejt kapcsolatba lépő aktivált T sejtekben sejthalált vált ki, amelynek lépései megegyeznek az alacsony dózisban alkalmazott rekombináns Gal-1 apoptotikus mechanizmusával.

4/ A Gal-1 szerepének vizsgálata az MSC indukált szövetregenerációban és immunszuppresszióban diabéteszes egerekben.

Az *in vitro* eredmények arra utalnak, hogy az MSC által termelt Gal-1 befolyásolja az aktivált T sejtek életképességét, és ezáltal az immunválasz kimenetelét. Ennek *in vivo* bizonyításához a pályázat benyújtásakor a streptozotocinnal (STZ)-indukált diabéteszes egérmodellt választottuk, amelyben a betegség klinikai tüneteit meggátolja, a betegséget visszafordítja az egerek csontvelői sejtekkel és MSC-vel való injektálása. Ennek ellenére nem tapasztaltunk különbséget a Gal-1 termelő és hiányos MSC hatása között: mindkettő a normális szintre csökkentette az állatok vércukorszintjét és segítette az állatok életben maradását.

Az MSC *in vivo* immunreguláló hatását más állatmodellben is vizsgáltuk. C57Bl6 egereket ovalbuminnal (OVA) érzékenyítettünk, ezzel egy időben vad típusú vagy Gal-1 KO MSC-vel oltottunk, majd a talppárnában anafilaxiás reakciót váltottunk ki. A vad típusú MSC-vel kezelt állatok reakciója szignifikánsan csökkent a csak ovalbuminnal oltottakéhoz képest, ezzel szemben a Gal-1 hiányos MSC nem csökkentette jelentősen a talppárna ödémáját. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az MSC *in vivo* gátolja az OVA-ra adott választ, ezt másodlagos immunizálás utáni *in vitro* tesztekben sikerült megerősítenünk: a vad típusú MSC, de nem a Gal-1 hiányos MSC gátolta a lépsejtek OVA-specifikus proliferációját, IFN- γ termelését, és a szérum immunglobulin OVA-specifikus szintjét.

Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy az MSC nem csak a T sejtek aktiválódását gátolja in vivo, de más sejtípusokra is hat, akár közvetlenül, akár a T sejteken keresztül, amint ezt a csökkent ellenanyag-termelésből látjuk. A továbbiakban részletesen kívánjuk vizsgálni az MSC B sejtek életképességére, aktivációjára és ellenanyag-termelésére gyakorolt hatását, erre a munkára új OTKA pályázatot nyújtottunk be (K105817). Mivel az új állatmodell bevezetése késéshez vezetett a munkatervben, ezeket az eredményeket összefoglaló kéziratot 2012 második felében tervezzük közzéadni. Előzetes eredményeinket hazai konferenciákon mutattuk be.