

**CIGARETTAFÜST-INDUKÁLTA GYULLADÁSOS FOLYAMATOK
COPD-BEN – SZISZTÉMÁS GYULLADÁS KIALAKULÁSA A WNT5A
ÉS A GYULLADÁSOS CITOKIN TARTALMÚ EXTRACELLULÁRIS
VEZIKULÁK ÁLTAL**

Doktori (PhD) értekezés tézisei



FELLER DIÁNA

**Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Az Immunológia Alapjai Program**

**Témavezetők: Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, egyetemi tanár
Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna, egyetemi tanár**

**Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár**

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pécs, 2019.**

BEVEZETÉS

A dohányzás és a tüdő gyulladós folyamatai

A dohányfüst krónikus inhalációjának egyik súlyos következménye az immunológiai funkciók változása, amely folyamatokban az immunrendszer csökkent működése figyelhető meg, beleértve az immunsejtek fejlődésében és termelésében bekövetkező változásokat. A cigarettában található dohány elégetésével több, mint 8000 olyan komponens szabadul fel, melyek gyulladást indukálnak. Főbb összetevői közé tartozik a szén-monoxid, az akrolein, a nikotin és a reaktív oxigén származékok (ROS). Emellett további 73 olyan összetevőt is tartalmaz, melyek karcinogén tulajdonsággal rendelkeznek, mint pl. a kadmium, az arzén és a formaldehid. Kutatások bizonyítják, hogy a tüdő gyulladós megbetegedéseiért legnagyobb részben az aktív és a passzív dohányzás felelős. A dohányzás okozta leggyakoribb megbetegedések közül első helyen állnak a kardiovaszkuláris rendellenességek, ezt követik a daganatos megbetegedések, melyekből első helyen a tüődaganatok állnak, majd további légzőszervi rendellenességek, mint pl. a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD - Chronic Obstructive Pulmonary Disease). COPD-ben és tüődaganatban szenvedő betegek egyaránt csökkent tüdőfunkcióval és krónikus gyulladás kialakulásával jellemezhetőek. A tüdőrákos esetek 50-70%-ban COPD-vel társulnak, mely utalhat a két kórkép közötti szoros összefüggésre. Legújabb tanulmányok szerint a krónikus gyulladás központi szerepet játszik ezen kórképek patogenezisében. Emellett megfigyelhetőek immunológiai diszfunkciók, mint az IL-1 β és TNF- α termelésének hatására a nukleáris faktor kappab (NF κ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) transzkripciós faktor rendellenes aktivációja, epithelialis-mezenchimális átalakulás (EMT - *epithelial mesenchymal transition*), megváltozott adhéziós jelátviteli útvonalak, illetve az extracelluláris mátrix lebomlása is.

COPD

Jelenleg a COPD az ötödik vezető morbiditású és mortalitású betegségek közé tartozik. Kialakulásáért felelősek lehetnek a foglalkozási inhalációs károsító anyagok, fertőzések, a légköri szennyezés, genetikai predispozíció és az öregedés is, de a leggyakoribb kiváltó oknak a dohányzást tartjuk számon. A COPD a tüdő szöveti destrukciójával és légúti obstrukciójával járó betegség, melyet a légúti áramlás ellenállás fokozódása jellemez. Morfológiailag a COPD-beteg tüdejében az emfizéma és a krónikus bronchitis kombinációja ismerhető fel. A betegség tünetei közé tartozik a krónikus produktív köhögés, fokozott nyáktermelés, köpetürítés, nehézlégzés és a fizikai terhelésre jelentkező légszomj. A tünetek háttérben álló egyik

jellegzetes folyamat a tüdő krónikus gyulladós folyamata, mely progresszív, visszafordíthatatlan légúti obstrukciót eredményez. A COPD progressziójában szerepet játszó dohányfüst mediálta gyulladós válasz egy rendkívül komplex hálózaton keresztül, különböző immunsejtek, molekuláris mediátorok aktív részvételével és azok felhalmozódásával indukálódik. A betegség során akkumulálódnak makrofágok, neutrofilek, dendritikus sejtek és T-limfociták, míg gyulladós mediátorokként a citokinek, kemokinek, proteázok említhetők meg. Emellett a tüdőt felépítő epiteliális sejtek is képesek az immunfolyamatok befolyásolására. A fent említett résztvevők mindegyike aktiválódhat cigarettafüst hatására is. Funkciójuk külön-külön jól ismert, de a COPD kialakulásában résztvevő immunsejtek és mediátorok interakcióját kevésbé ismerjük.

A COPD gyógyszeres kezelésében a hörgőtágítók inhalációban történő alkalmazása, bár a betegség enyhébb szakaszában gyors hatású muszkarin receptor antagonistákat és β_2 -adrenerg receptor agonistákat, illetve ezek kombinációit alkalmazzák hörgőtágítóként. A szisztémás gyulladás csökkentésére az inhalációs kortikoszteroidok bevezetése kritikus, amikor az akut exacerbáció kezelése szükségessé válik. Jelenleg a kezelések hatékonysága limitált, illetve a nem kívánt mellékhatások is gyakoriak.

A Wnt5a és a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma (PPAR-gamma) szerepe a tüdő gyulladós folyamataiban

A Wnt jelátvitelben résztvevő Wnt fehérjék olyan szekretált glikoproteinek, melyek kanonikus és nem-kanonikus Wnt jelátviteli utakon keresztül kifejtve hatásukat jelentős szerepet játszanak az embrionális fejlődésben, a szövetek homeosztázisában, szabályozzák a sejtek osztódását, a sejtek sorsát, migrációját, adhézióját és polarizációját is. A jelátvitel útvonalak aktiválása alapján kanonikus és nem-kanonikus Wnt molekulákat különböztetünk meg. Korábbi kutatások alapján a karcinogenezisben, illetve a gyulladós folyamatokban a legjelentősebb szerepet a Wnt5a nem-kanonikus molekula, melyet humán karcinómákban, mint pl. melanómában, hasnyálmirigy daganatban is leírták, amelyekben fokozza a tumorsejtek invázióját és migrációját az aktin átrendeződésén, sejt adhéziós változásokon és az EMT folyamatán keresztül. A Wnt5a-t emellett egy pro-inflammatorikus molekulaként tartjuk számon, mely dohányfüst-indukálta gyulladós citokinek aktivátoraként játszik szerepet a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) és NF κ B kaskádokon keresztül, TNF α és IL-1 β inflammatorikus mediátorok termelődésének hatására. A dohányfüst a gyulladás indukálásával egy időben a makrofágok aktivációját, illetve a makrofágok polarizációját vonja maga után a klasszikus M1 és az alternatív M2 útvonalak irányába. Kutatások bizonyítják, hogy a makrofágokat pro-

inflammatorikus citokinek képesek indukálni a Wnt5a termelésére. Emellett a Wnt5a makrofág eredetű exoszómák, mikrovezikulák segítségével is szállítható egészen a recipiens sejtekig.

Korábbi tanulmányok leírták, hogy a PPAR-gamma szintén egy központi szereplője a gyulladás során lejátszódó folyamatoknak. A PPAR-gamma agonisták számos gyulladásos mediátor gátlásával képesek anti-inflammatorikus, anti-aterogénikus és anti-oxidáns faktorként viselkedni. Az eddigi megfigyelések alapján a PPAR-gamma anti-inflammatorikus aktivitását összefüggésbe hozhatjuk gyulladásos tüdőbetegségekkel, mely erősíti azt a hipotézist, hogy a PPAR-gamma agonisták képesek csökkenteni a gyulladást, illetve visszafordítani a cigarettafüst-indukálta emfizémát is. Továbbá gyulladáscsökkentő hatását bizonyítja az is, hogy makrofágokban PPAR-gamma deficiencia spontán gyulladás kialakulását eredményezi a tüdőbe, illetve a PPAR-gamma agonisták az M2 irányú makrofág differenciációt segítették elő, melynek ismert immunszuppresszív hatása.

Összességében a multifaktoriális folyamatok eredményeként kialakuló szisztémás gyulladás hátterében feltételezhetjük, hogy a dohányfüst expozíció-indukálta lokális gyulladás az expozíció helyétől különböző extracelluláris vezikulákba csomagolva, úgynevezett „gyulladásos üzenetek” révén válhat az egész szervezetet érintő komplex folyamattá.

Extracelluláris vezikulák szerepe a krónikus gyulladásban

A sejtek képesek membránba zárt partikulumok felszabadulásán keresztül a sejt-sejt közötti kommunikációra. A szállítódó partikulumok az úgynevezett extracelluláris vezikulák (EV), melyek kettős foszfolipid membránba csomagolva képesek az extracelluláris térbe felszabadulni. Méretük alapján megkülönböztetjük egymástól az exoszómákat, a mikrovezikulákat (MV) és az apoptotikus testeket vagy nagy onkoszómákat. Tartalmukat tekintve anyagcseréből származó fehérjéket, ribonukleinsavak többféle változatát tartalmazzák, főként mikroRNS-t. Termelésük helyétől az egész szervezetbe képesek eljutni, majd a célsejtekben internalizálódni endocitózis és membránfúzió segítségével. Az exoszómák, hasonlóan a nagyobb méretű EV-hoz, legtöbbször olyan sejtekből szabadulnak fel, melyek fontos szerepet töltenek be az immunreakciók kialakításában, mint pl. B-sejtekből, dendritikus sejtekből, T-sejtekből, hízósejtekből és epitel sejtekből. Az exoszómák lehetséges szerepét a COPD szisztémás gyulladásos folyamatainak kialakításában már korábban feltételezték COPD-betegek plazmájában mért emelkedett exoszómák mennyiségéből és ezzel korreláló szisztémás gyulladásos biomarkerek, mint C-reaktív protein (CRP) és IL-6 szintjének emelkedéséből.

Korábbi kísérletek során cigarettafüst extraktum (CFE) indukálta makrofágokból és epithel sejtekből, illetve dohányos humán BAL mintákból izolált EV-ban az IL-6 és IL-8 gyulladáscitokinek emelkedett szintjét már lemérték. Ezek alapján következtethetünk, hogy az extracelluláris vezikulák nagymértékben hozzájárulhatnak a gyulladás kialakulásához és szerepük lehet az immunsejtek toborzásában is.

Tüdő regenerációs folyamatai és a Wnt jelátvitel kapcsolata

COPD során a légzőfelület jelentős csökkenése figyelhető meg, mely a gázcsereben szerepet játszó alveolusok állapotát is nagymértékben érinti. Az alveolusokat felépítő ATI-es típusú sejteken keresztül megy végbe a gázcsere, míg az ATII-es típusú sejtek funkciója a szöveti regeneráció és a felületi feszültség csökkentése a szörfaktáns fehérjék termelésének segítségével. Az ATII-es sejtek őssejt funkcióval rendelkeznek, melyek megújítják saját magukat és sérülés esetén klonális proliferációra és migrációra képesek. Kísérleti rendszerekben bizonyították, hogy az ATII-es típusú sejtek transzdifferenciációval (TD) ATI-es sejtekké alakulhatnak.

A Wnt családdhoz tartozó ligandok a tüdő fejlődésének folyamata során szabályozzák a sejtproliferációt, differenciációt, polaritást, adhéziót és migrációt, amíg a Wnt β -katenin szignalizáció az alveoláris morfogenezishez szükséges. Emellett a Wnt ligandok, mint a Wnt5a, a Wnt7b és a legtöbb Frizzled (Fzd) receptor központi szerepet töltenek be a tüdő fejlődésében és regenerációjában. A Wnt jelátvitelnek a TD indukciójában és szabályozásában végzett szerepe azonban kevésbé ismert.

CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi kutatásaink és az irodalomban található eddigi eredmények alapján kutatómunkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Kiváltja-e a cigarettafüst a nem-kanonikus Wnt5a molekula szintjének emelkedését és a Wnt5a-val kapcsolatosan COPD-re jellemző gyulladáscitokinek emelkedését?
2. Kimutatható-e a Wnt5a emelkedett szintje COPD-betegek szérumban, amely magyarázhatja az emberre, de a kísérleti állatokra nem jellemző szisztémás gyulladás kialakulását?
3. Szabályozza-e, és ha igen, milyen módon a Wnt jelátviteli útvonal a pulmonális regenerációt és az epithelialis transzdifferenciációs folyamatokat?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

In vivo kísérleteinkhez C57BL/6 hím egereket használtunk, melyeket a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének állatházában tartottak. További kísérleteinkhez használt BALB/C hím egerek a PTE ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet állatházában voltak fenntartva.

In vivo dohányoztatás

A kísérleti állatok passzív dohányoztatása naponta 2 alkalommal 30 percig egy manuális, teljes test dohányoztató kamrában történt 2 hónapon keresztül, ahol a cigarettafüst (CF) expozícióhoz 3R4F típusú kísérleti cigarettákat használtunk.

Egértüdő sejtek izolálása

A kísérleti egerek tüdejéből történő sejtek izolálásához három C57BL/6 egeret használtunk fel csoportonként. Az egereken perfúziót végeztünk, majd a tüdőszövet teljes elemésztéséhez tripszint használtunk, amit PBS oldattal mostunk ki. A légcsövek feltöltéséhez kollagenáz-diszpázt, diszpázt és DNáz I-et használtunk. Ezután a tüdőlebenyeket kollagenáz-diszpáz oldatban mágneses kevergetés mellett 50 percig emésztettük, majd az elemésztett tüdőt átszűrtük.

Sejtszortolás

Az egértüdő egysejt szuszpenziót anti-egér CD45-FITC és anti-egér EpCAM1 (G8.8 anti-rat-PE) (40) antitesttel jelöltük meg, melyet a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében termeltek. A sejtszortolást a FACSAria III (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) szorterrel végeztük. A szortolás alapján a következő populációkat különítettük el: EpCAM⁻CD45⁻, EpCAM⁺CD45⁻, EpCAM⁺CD45⁺ és EpCAM⁺CD45⁻. A szortolás tisztasága 99% feletti volt. A humán tüdőből frissen izolált sejteket 0,1% BSA-t, 0.1% Na-Azidot tartalmazó PBS oldatban mostuk. A sejteket az antitestekkel 30 percig inkubáltuk.

Anyagok

A humán rekombináns Wnt5a, Wnt4 és Wnt7a fehérjéket in vitro kísérleteink során 1 µg/ml-es koncentrációban alkalmaztuk. A PPAR-gamma agonistát, roziglitazont (RSG) és antagonistát (GW9662) 10 µM koncentrációban használtuk fel kezeléseinkhez.

Humán vérminták gyűjtése

A humán vérmintákat az I. számú Belgyógyászati Klinika Pulmonológia Osztályáról (Általános Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem) gyűjtöttük. Összesen 5 COPD - beteg és 5 korban megegyező, egészséges kontroll szérum mintáját mértük. A mintákat 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd 1500 rpm-n 10 percig centrifugáltuk. További felhasználásig a szérum mintákat -80 °C tároltuk.

Cigarettafüst extraktum (CFE) elkészítése

A cigarettafüst extraktum oldat elkészítéséhez egy korábban már leírt módszert alkalmaztunk, amelyet módosítottunk. A 3R4F típusú kísérleti cigaretták füstjét 10 ml sejttenyésztő médiumba buborékolattuk perisztaltikus pumpa segítségével. Az átbuborékolatott CFE oldatot átszűrtek, majd további kísérleteinkben sejttenyésztő médiummal hígítva 0,5%-os koncentrációban használtuk fel kezeléseinkhez. A CFE oldatok pH értékeinek átlaga pH 7.28 volt. A CFE oldatokban beoldódott részecskék optikai denzitását 360 nm-en spektrofotometriásan határoztuk meg, melyet a CFE-al nem átbuborékolatott, kontroll oldatokhoz hasonlítottuk.

Sejtvonalak és primer sejtek

Kísérleteink során humán adenokarcinóma A549 sejtvonalat és lentivirális transzgenézissel előállított transzgenikus Wnt5a overexpresszáló-A549 sejtvonalat használtunk. Emellett primer kislégúti epitelsejtet (SAEC), normál tüdő fibroblaszt sejtet (NHLF), normál mikrovaskuláris endotelsejtet (HMVEC-L) alkalmaztunk még a kísérletek során. A sejtek tenyésztése során a gyártó által javasolt médiumokat használtuk és a sejteket standard sejttenyésztési körülmények között (37°C, 5% CO₂) tartottuk.

Primer humán monociták izolálása

A monociták izolálása 20 ml-es heparinizált csövekben gyűjtött egészséges donorok perifériás véréből történt. Fikoll grádiens centrifugálás segítségével perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk. A monocitákat mágneses aktivált sejtválogatással anti-humán CD14 antitesttel konjugáltatott mikrogyöngyök segítségével, pozitív szelekció útján nyertük ki. A makrofágok differenciációját 10 nM PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) kezeléssel indukáltuk 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett 5 órán keresztül.

3-dimenziós (3D) humán tüdőmodell

A 3D tüdő aggregátumokhoz a normál humán primer sejteket (SAEC, NHLF, HMVEC-L), illetve a humán makrofágot használtunk fel. Miután a sejtek elérték a 80%-os konfluenciát,

tripszinnel történt emésztés után a sejteket lecentrifugáltuk, majd a háromféle primer sejttypusból, illetve a makrofágokból sejtszuspenziót készítettünk. Kezeléseink során kontrolloknak a makrofágot nem tartalmazó 3D tüdőaggregátumokat tekintettük. A sejtszuspenziót egy U-aljú 96-lyukú sejttenyésztő lemezre osztottuk szét, majd 10 percig 600 g-n centrifugáltuk. A lemezeket kezeléseink előtt standard sejttenyésztési körülmények között egy éjszakán keresztül inkubáltuk.

RNS izolálás, cDNS szintézis, valós idejű kvantitatív PCR (qPCR)

A 3D aggregátumokból RNS izolálást követően cDNS-t készítettünk. A génexpressziós változásokat valós idejű kvantitatív PCR-al, SensiFAST SYBR Green reagens segítségével detektáltuk (BioLine, London, UK), a génexpressziós analíziseket pedig ABI StepOne és StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) készülékkel végeztük. Az adatokat StepOne szoftverrel analizáltuk, az expressziós változásokat pedig β -aktin háztartási génhez normalizáltuk.

TaqMan Array

Humán CFE-al 48 óráig kezelt monocitákban a Wnt jelátviteli útvonalhoz tartozó molekulák mRNS szintű vizsgálatához 92 gént és 4 belső kontroll gént tartalmazó Wnt lemezt használtunk. A génexpressziókat ABI StepOnePlus rendszerrel analizáltuk.

Immunhisztokémiai és immunfluoreszcens festések

Az C57BL/6 egerek tüdőszövetének formaldehides fixálása után a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében paraffinba ágyazott metszeteket készítettünk mikrotóm segítségével. A metszeteket deparaffinizáltuk, majd rehidratáltuk. Citrát pufferrel antigén feltárást végeztünk. A fluoreszcens festéshez patkány anti-humán Wnt5a monoklonális antitestet (1:100, Clone 442625, R&D Systems, Minneapolis, USA), másodlagos antitestként Alexa Fluor 488 számban termeltetett anti-patkány IgG poliklonális antitestet (1:200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) használtunk. A sejtmagokat DAPI (1:1000, Serva, Heidelberg, Germany) magfestékkel vizualizáltuk. A képeket egy Olympus IX81 CCD kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal készítettük. A fluoreszcens képek szerkesztését és a fluoreszcens intenzitás mérését ImageJ képszerkesztő programmal végeztük. Az in vitro kísérleteink során a CFE kezelt 3D szferoidokat Cryomount beágyazó médiumba helyeztük és felhasználásig -80°C -on tároltuk. Fluoreszcens festésekhez 8 μm -es metszeteket készítettünk Leica kriosztáttal (CM1950, Leica, Wetzlar, Germany). A metszeteket szárítottuk, majd hideg acetonban (Molar Chemicals Kft., Hungary) 10 percig fixáltuk. A fixált metszeteket

20 percig 5% BSA-t (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) tartalmazó PBS-ben blokkoltuk. A fluoreszcens festéshez elsődleges ellenanyagként patkány elleni Wnt5a monoklonális antitestet (1:100, Clone 442625, R&D Systems, Minneapolis, USA) másodlagos ellenanyagként pedig Alexa Fluor 488 számarban termeltetett patkány elleni IgG poliklonális antitestet (1:200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) használtunk. A metszeteket Vectashield fedőoldattal (Vector Laboratories, Burlingame, USA) fedtük. A képeket konfokális mikroszkóppal készítettük (Zeiss LSM 710), a fluoreszcens képek szerkesztését és a festések intenzitás mérését ImageJ képszerkesztő programmal végeztük.

Áramlási citometriás gyöngy array (CBA)

A 3D tüdő aggregátumok által 48 órás kezelést követően a felülúszóba termelt proinflammatorikus citokinek termelődését multiplex áramlási citometriás gyöngy array (CBA – Cytometric Bead Array, Human Inflammatory Cytokines Kit, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) segítségével detektáltuk. A felülúszóból 50 µl-t gyűjtöttünk és a mintákat a kit által javasolt assay pufferrel hígítottuk. A hígított mintákhoz fluoreszcens citokin gyöngy szuszpenziót és humán gyulladáshoz citokin-fikoeritrin detekciós reagenst adtunk. A mintákat 3 órán keresztül sötétben inkubáltuk, majd mosó pufferben centrifugáltuk. A jelölt gyöngyöket BD FACS DIVA V6 szoftverrel ellátott FACS Canto II áramlási citométer készülékkel (BD Immunocytometry Systems, Erembodegen, Belgium) mértük és az adatokat FCS Express V3 szoftverrel értékeltük ki.

Extracelluláris vezikulák izolálása humán szérumból és A549 és Wnt5a-A549 sejtvonalakból

Az extracelluláris vezikulákat 5 COPD-s beteg és 5 egészséges donor szérumból felhasználva és a totál exoszóma izoláló kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) segítségével izoláltuk. A mintákat 300 g-n 30 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót 2000 g-n 4°C-on 30 percig ismét lecentrifugáltuk és a kapott onkoszómákat 200 µl PBS-ben vettük fel, felhasználásig -80°C-on tároltuk. A felülúszóhoz totál exoszóma izoláló reagenst adtunk, majd 4°C-on 30 percig inkubáltuk, utána 14000 g-n 10 percig centrifugáltuk. Az exoszómákat tartalmazó pelletet extracelluláris vezikula szuszpenziós pufferben szuszpendáltuk és további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Extracelluláris vezikulákat A549 és Wnt5a-A549 sejtvonalak felülúszójából izoláltunk a totál exoszóma izoláló kit – sejtkultúra médiumból (Invitrogen, Cat. number: 4478359) protokollját követve. A sejteket felnevelés után FBS mentes médiumban tenyésztettük 2 napig. A felülúszót 2000 g-n 4°C-on 30 percig centrifugáltuk a megaszómák/onkoszómák összegyűjtése

érdekében, majd totál exoszóma izoláló reagenst adtunk hozzá. A mintákat 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, utána 1000 g-n 4°C-on 1 órán keresztül centrifugáltuk. Az extracelluláris vezikulákat tartalmazó pelletet hideg PBS-ben gyűjtöttük össze és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Mikrovezikula/Exoszóma homing, az exoszómák lokalizációjának fluoreszcens analízise

Az A549 és Wnt5a-A549 sejtvonalakból izolált mikrovezikulákat/exoszómákat lecentrifugáltuk, majd a pelletet Dil fluoreszcens festékkel (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) PBS-ben oldottuk be. Inkubálás után a szuszpenziót lecentrifugáltuk, felülúszót eltávolítottuk, a pelletet pedig PBS-ben feloldottuk és BALB/C egerek farokvénájába injektáltuk. A kontroll egerek injektálása jelöletlen exoszómákkal történt. Az injektálást követően 20 órával az egereket feláldoztuk és a tüdőt, májat, tímuszt és lépét eltávolítottuk, majd Living Image szoftverrel felszerelt IVIS Lumina III In Vivo Imaging rendszer segítségével (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) a fluoreszcensen jelölt exoszómák detektálását végeztük. Az egerek szerveiben felhalmozódott exoszómák fluoreszcens intenzitását a festetlen, kontroll szervekhez viszonyítottuk.

Mikrovezikulák (exoszómák) elektronmikroszkópos detektálása

A sejtvonalakból izolált mikrovezikulák elektronmikroszkópos detektálásához az exoszómákat PBS-ben szuszpendáltuk, majd glutáraldehid vizes oldatában fixáltuk. A fixált exoszómákat átmostuk és 24 óráig hagytuk száradni, majd az elektronmikroszkópos hálóra mértük. A mintákat 5%-os uranil-acetáttal kezeltük. Az elektronmikroszkópos hálót 80Kv-on MorgagniD transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium, Általános Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem). A mikroszkóppal készített képeket integrált MegaView III digitális kamerával (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH; Munster, Germany) készítettük.

Enzim kapcsolt szendvics immunoszorbens vizsgálat (ELISA)

Izolált humán onkoszóma és exoszóma mintákat Wnt5a antitesttel előkezelt ELISA lemezre mértünk. A mintákat biotinilált Wnt5a specifikus detektor antitesttel, majd Avidin-HRP konjugátummal inkubáltuk. Ezután a mintákhoz TMB szubsztrátot adtunk, amelyet sötétben inkubáltuk. A színreakciót 450 nm-en detektáltuk, az eredményeket a standard görbéhez viszonyítva számoltuk.

Tüdő epiteliális sejtek izolálása primer humán tüdőszövetből

Humán primer tüdő epiteliális sejteket izoláltunk lobektomián átesett, normál tüdőfunkcióval rendelkező betegekből. A sejtek izolálását egy korábbi protokollt követve végeztük. A szöveti mintákat sós oldatba tettük, majd emésztettük tripszin, DNáz és magzati borjúsérum jelenlétében. Az izolált sejteket fluoreszcencia aktivált sejtválogatásra (FACS) és in vitro kultúrában való fenntartásra használtuk fel.

Primer tüdő epiteliális sejtek in vitro transzdifferentiációja (TD)

Tüdő epiteliális sejteket kollagénnel bevont sejttenyésztő edényekre ültettünk ki és DCCM-1 médiumban 3-6 napig tartottuk őket kultúrában. További kísérletekben a sejteket mikroarray és kvantitatív valós idejű PCR analízisekre használtuk.

Mikroarray analízis

A betegekből (n=3) származó, 3 és 6 napig in vitro körülmények között kultúrában fenntartott primer sejtekből cDNA-t fragmentáltunk és fluoreszcensen jelöltük GeneChip WT terminális jelölő Kit (Affymetrix, Santa Clara, USA) segítségével. A fragmentált cDNA-t a Humán Gén 1.0 ST array-hez (Affymetrix, Santa Clara, USA) hibridizáltuk. A mikroarray-ből a próba sejt intenzitási adatokat (CEL, cell intensity data) analizáltuk Expressziós Console szoftver segítségével.

Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER)

A PANTHER klasszifikációs rendszert a fehérjék (és azok génjeinek) klasszifikálására tervezték a high throughput analízisek elősegítésére. A módszer részletes leírása korábbi publikációkban elérhető.

Mesterséges neuronális hálózatok analízise (ANN)

A Wnt jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó ATII-ATI TD folyamatának vizsgálatához mesterséges neuronális hálózatok (ANN) (NeuroSolutions 6, NeuroDimension Inc.) szoftvert használtunk (103) (104). A génexpressziós változásokat Affymetrix array segítségével határoztuk meg ATII-es sejtekből, melyeket kontrolloknak és ATI-es sejtekből, melyeket a kezelt mintáknak tekintettünk. Egy átlag szenzitivitást határoztunk meg, mint 1.0 és minden más szenzitivitás értéket is eszerint ábrázoltunk hőtérképen.

Statisztikai analízisek

A statisztikai elemzés GraphPad 6 szoftverrel történt, független mintás T-próba és egy-utas ANOVA (Bonferroni post hoc) tesztek segítségével. Az adatokat minden esetben átlag \pm standard hiba (SEM) ábrázoltuk és a $p < 0.05$ értékeket tekintettük szignifikáns eredménynek.

EREDMÉNYEK

A dohányzás kiváltotta gyulladási folyamatok és a Wnt5a kapcsolata in vivo

In vivo modellünkben a 2 hónapig dohányoztatott C57BL/6 hím egerek tüdejében hematoxilín-eozin festéssel igazoltuk a dohányzás hatására kialakult emfizéma-szerű struktúrát a kitágult alveolusokkal és gyulladásra utaló limfocita beszűrődésekkel. Ezzel párhuzamosan az egerek tüdejében a gyulladásban szerepet játszó Wnt5a fehérje emelkedését detektáltuk Western-blot analízissel és immunfluoreszcens festés segítségével 2 hónapos cigarettafüst (CF) expozíció után a nem dohányoztatott egerek tüdejében mért Wnt5a szintjéhez viszonyítva.

További kísérleteinkben az egerek tüdejében nagy számban előforduló sejteket külön is vizsgáltuk dohányoztatás hatására, ahol a tüdőből tisztított epitél (EpCAM⁺) és leukocita (CD45⁺) sejtpopulációkban az epitelsejtek számának csökkenését, míg a CD45⁺ sejtek számának emelkedését detektáltuk a nem dohányoztatott csoporthoz képest. Az EpCAM⁺ és a CD45⁺ sejtpopulációban egyaránt kimutattuk a Wnt5a mRNS emelkedését valós idejű kvantitatív PCR segítségével.

A dohányoztatás kiváltotta gyulladás és a Wnt5a kapcsolata 3D humán tüdőmodellben

A CF Wnt5a indukáló hatását in vitro humán tüdőszöveteken is teszteltük, ahol a 3D tüdő aggregátumokon 48 óráig CFE kezelést végeztünk. Eredményeink azt mutatják, hogy a Wnt5a mRNS és fehérjeszinten is szignifikáns emelkedést mutat a makrofágot tartalmazó aggregátumokban, a makrofágot nem tartalmazó aggregátumokhoz képest. In vitro modellrendszerünkben CFE kezelés hatására az IL-6 gyulladási citokin mRNS szintű expressziója emelkedik, amely változást a makrofág jelenlétében és makrofágok hiányában is detektáltuk a kontroll, nem dohányoztatott szferoidokhoz képest. A dohányzás immunmoduláló hatásának humán rendszereken történő további teszteléséhez az aggregátum kultúrákon 48 óráig humán rekombináns Wnt5a kezelést (1 µg/ml) végeztünk, melynek hatására szignifikáns IL-6 és IL-8 emelkedést detektáltunk, kizárólag a makrofágot tartalmazó szferoidokban, melyből a Wnt5a-nak a proinflammatorikus folyamatok indukálásában játszott szerepére következtetünk.

A makrofágok polarizációja és a Wnt jelátvitel kapcsolata in vitro dohányoztatás hatására

Makrofág monokultúrákban a nem-kanonikus Wnt jelátviteli molekulák, mint a Wnt5a, Wnt5b, Wnt11, illetve a kanonikus Wnt jelátviteli út inhibitorának, a Dickkopf 2-nek emelkedését mértük 48 óráig CFE kezelés hatására. Kísérleteink során a PPAR-gamma antagonisták csökkentette az IL-10 expresszióját, amely az anti-inflammatorikus M2 fenotípus markere,

utalva ezzel a PPAR-gamma hiánya következtében kialakuló pro-inflammatorikus citokinek termelésében játszott szerepére. Emellett azt láttuk, hogy a PPAR-gamma expressziója szignifikánsan emelkedett makrofágokban 3 órás CFE kezelés hatására, ezzel szemben 48 óra után a kezeletlen minták szintjére csökkent, mely arra utal, hogy az anti-inflammatorikus PPAR-gamma expressziója önmagában nem tartaná fent az elnyújtott gyulladásos stimulust.

Az extracelluláris vezikulák és a gyulladásos citokinek szerepe a szisztémás gyulladás kialakulásában

A COPD-betegek szérumból izolált onkoszómákban az emelkedett Wnt5a fehérje mennyisége megegyezett a Wnt5a overexpresszáló A549 sejtvonalban mért Wnt5a mennyiségével. Emellett az onkoszómákban és az exoszómákban is kiemelkedően magas gyulladásos citokin szinteket mértünk. Wnt5a overexpresszáló A549 sejtek felülúszójából izolált, fluoreszcensen jelölt exoszómákat BALB/C egerek farokvénájába injektáltunk, amelynek eredményeként a jelölt exoszómákat legnagyobb mennyiségben a májban, a tímuszban és a tüdőben, kisebb mennyiségben pedig a lépben is vizualizáltuk.

Wnt jelátvitel aktiválódása az ATII-ATI transzdifferentiáció során in vitro

Betegekből izolált tüdő epiteliális Affymetrix array segítségével 1527 gént analizáltunk és a PANTHER program segítségével megállapítottuk, hogy ezek közül 73 gén a Wnt jelátviteli úthoz tartozik. A Wnt jelátvitelben a Wnt4, Wnt5a, Wnt7a ligandok és a Fzd 1, Fzd2 és Fzd7 receptorok mRNS szintjében detektáltunk szignifikáns változásokat az Affymetrix array segítségével. Az AQP5 és RAGE markereket használtuk az ATI-es sejtek karakterizálásához, az ATII-es típusú sejtek esetében differenciációs markerként a szőrfaktáns protein C (SFTPC) expresszióját mértük. Bár az SFTPC szintjében nem detektáltunk szignifikáns változást, az AQP5 és RAGE markerek szignifikáns emelkedést mutattak az ATI populációban az ATII-es populációhoz képest. A Wnt receptorok mRNS szintjeiben nem láttunk különbséget, míg a Wnt4, Wnt5a és Wnt7a ligandok expresszója szignifikánsan magasabb volt az ATI-es sejtekben, mint az ATII-es sejtpopulációban.

További kísérleteinket primer humán kislégúti epiteliális sejtekből (SAEC), illetve primer humán tüdő fibroblasztokból (NHLEF) álló 3D aggregátumokon végeztük. Az aggregátum kultúrákon rhWnt4, rhWnt5a és rhWnt7a kezelést alkalmaztunk, hogy az SFTPC mRNS szintjének csökkenését indukáljuk, azonban eredményeink alapján kizárólag a rhWnt7a kezelés emelte az ATI marker, AQP5 mRNS és fehérjeszintjét. A Wnt7a indukálta intracelluláris jelátviteli folyamatokat tovább vizsgálva humán tüdő aggregátum kultúrákból készített

metszeteken Wnt7a kezelés hatására a β -katenin fehérjeszint emelkedését figyeltük meg, míg a β -katenin foszforilációja szignifikánsan csökkent, ezzel bizonyítva a TD folyamatban résztvevő intracelluláris folyamatok komplexitását.

Az ATII-ATI TD-ban szerepet játszó Wnt jelátviteli molekulák definiálása mikroarray adatok ANN analízisének segítségével

A megváltozott Wnt mikrokörnyezetben résztvevő molekuláris célpontok meghatározására ANN analízist végeztünk, amelynek eredményeként több molekulát azonosítottunk, mint pl. a trombospondin 1 (THBS1), transzglutamináz-2 (TGM2), integrin alfa V (ITGAV), epiteliális membrán fehérje 2 (EMP2), citokróm P450 család 4, alcsalád B, polipeptid 1 (CYP4B1) és ankyrin repeat domain 1 (ANKRD1), melyek a módosult Wnt jelátviteli útvonal célpontjai az ATII-ATI TD során. Az Affymetrix elemzés alapján a THBS1, EMP2, ITGAV, CYP4B1 és ANKRD1 mRNS szintjei szignifikánsan emelkedtek, míg a TGM2 szignifikánsan csökkent a TD során a kontrollhoz képest. Annak érdekében, hogy az ANN analízis során definiált gének funkcióját specifikus Wnt ligandokhoz kapcsolhassuk, 3D aggregátumokat 48 órán keresztül rhWnt4, rhWnt5a és rhWnt7a kezelést, majd qRT-PCR mérést végeztünk, ahol kizárólag a rhWnt5a kezelésnek láttuk hatását, amely az ITGAV mRNS expressziójának csökkenését eredményezte. Ebből következtethetünk, hogy a TD során egyes Wnt ligandok különböző célpontokkal rendelkeznek. Továbbá a 3D sejt aggregátumok metszetein végzett rhWnt5a kezelés sejtípus specifikus ITGAV fehérje expresszió emelkedést eredményezett, melyet az aggregátumokban centrálisan elhelyezkedő mezenhimális fibroblasztokban detektáltunk, míg az aggregátumok külső rétegében található epiteliális sejtekben az ITGAV fehérje expressziója szignifikánsan kevesebb volt.

ÚJ EREDMÉNYEK, ÖSSZEFOGLALÁS

Kiváltja-e a cigarettafüst a nem-kanonikus Wnt5a molekula szintjének emelkedését és a Wnt5a-val kapcsolatosan COPD-re jellemző gyulladós környezet kialakulását?

1. A cigarettafüst indukálja a nem-kanonikus Wnt5a emelkedését a tüdőben, párhuzamosan a kanonikus Wnt jelátviteli útvonal szupressziójával. Emellett megfigyelhető az EpCAM⁺ epiteliális sejtekkel dúsított sejtréteg szignifikáns hanyatlása, mely korrelál az emfizéma súlyosságával és a csökkent légzőfelülettel.
2. Dohányzás hatására a Wnt5a aktiválódásával párhuzamosan a gyulladós folyamatok is indukálódnak az M1 makrofág differenciáción keresztül, melyet az immunsejtek

CD45⁺ leukocita populációjának szaporulata jellemez, illetve ennek a folyamatnak a részeként az anti-inflammatorikus PPAR-gamma expressziója is redukálódik.

Kimutatható-e a Wnt5a emelkedett szintje COPD-betegek szérumában, amely magyarázhatja az emberre, de a kísérleti állatokra nem jellemző szisztémás gyulladás kialakulását?

3. Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy COPD betegek esetében a Wnt5a és pro-inflammatorikus citokinek becsomagolódhatnak és különböző extracelluláris vezikulákban szállíthatnak, melynek következtében a COPD során nem csak a gyulladás válhat szisztémás természetűvé, hanem ezzel egy időben az anti-inflammatorikus PPAR-gamma aktivitása is.

Szabályozza-e, és ha igen, milyen módon a Wnt jelátviteli útvonal a pulmonális regenerációt és az epitéliális transzdifferentiációs folyamatokat?

4. Az ATII-ATI TD folyamataiban eredményeink azt mutatták, hogy a Wnt4, Wnt5a és Wnt7a ligandok negatív szabályozóként működnek az SFTPC esetében, emellett a Wnt7a az AQP5 indukátoraként viselkedik. Összességében feltételezhetjük, hogy nem önmagában a Wnt ligandok, hanem egy közvetlenül Wnt ligand által érintett gén, az ITGAV felelős az SFTPC szintjének szabályozásáért.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőimnek Prof. Dr. Pongrácz Juditnak és Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának szeretnék köszönetet mondani, akiknek nagyon hálás vagyok, hogy a kezdetektől fogva sok éven át támogattak és kiemelkedő szakmai tudásukkal és tapasztalatukkal hozzásegítettek kutatómunkám elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom a Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet minden volt és jelenlegi dolgozójának, hogy az ott töltött éveim során mindig biztosították számomra a szakmai tudást és háttérrel, illetve a jó munka hangulatát. Nagy köszönettel tartozom Dr. Rapp Juditnak szakmai tanácsaiért, melyekkel az évek során ellátott és a kezdetektől rám fordított rendkívül sok időért, amit arra szánt, hogy a kísérletekhez szükséges technikákat maradéktalanul elsajátítsam. Rendkívül hálás vagyok továbbá kollégáimnak és egyben barátaimnak, Dr. Kovács Tamásnak és Ernszt Dávidnak, hogy a nehéz pillanatokban biztattak és szakmai tanácsaikkal mindig átlendítettek a nehézségeken és a hosszú szortolások alkalmával olyan sok időt szántak kísérleti mintáim elkészítésére. Emellett Steib Anitának és Bánfai Krisztinának tartozom köszönettel az exoszómás kísérletek során nyújtott hasznos szakmai tanácsokért.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet dolgozóinak, ahol külön szeretném megköszönni Dr. Kun Józsefnek a molekuláris biológiai technikákban nyújtott sok segítségét és Hírné Perkecz Anikónak a festésekben nyújtott segítségét.

Nagyon köszönöm Dr. Meggyes Mátyásnak, a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet munkatársának az áramlási citometriás mérésekben vállalt sok segítségét.

Továbbá köszönettel tartozunk Dr. Pál Szilárdnak a Gyógyszertechnológiai és Biofarmáciai Intézetből a mesterséges neuronális hálózatok analízisében nyújtott segítségéért, illetve az Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumnak, hogy kísérleteink során rendelkezésünkre bocsátották az elektronmikroszkóp használatát.

Köszönet illeti a PTE Klinikai Központ I.sz. Belgyógyászati Klinika Pulmonológiai Osztályán dolgozó Dr. Sárosi Veronika osztályvezető főorvosnőt és Dr. Ruzsics Istvánt, hogy az osztályon fekvő betegekből származó mintákat biztosították számunkra.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni családomnak és páromnak, hogy mindig, minden pillanatban számíthattam támogatásukra.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK:

Összesített impakt faktor: **33,825**

Összes független citáció: **34**

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 5,511

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

FELLER D, KUN J, RUZSICS I, RAPP J, SAROSI V, KVELL K, HELYES Z, PONGRACZ JE. Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation Becomes Systemic by Circulating Extracellular Vesicles Containing Wnt5a and Inflammatory Cytokines. **Front Immunol.** 2018 Jul 25;9:1724. doi: 10.3389/fimmu.2018.01724. IF:5,511

Független citáció: 1

Egyéb publikációk:

SÜKÖSD AK, RAPP J, **FELLER D**, SÉTÁLÓ G JR, GÁSPÁR B, PONGRÁCZ JE, ÁBRAHÁM H, BIRÓ Z. Cell death and survival following manual and femtosecond laser-assisted capsulotomy in age-related cataract. **Int J Ophthalmol.** 2018 Sep 18;11(9):1440-1446. doi: 10.18240/ijo.2018.09.02. IF:1,166

FUREDI N, MIKO A, GASZNER B, **FELLER D**, ROSTAS I, TENK J, SOLYMAR M, BALASKO M, PETERVARI E. Activity of the hypothalamic melanocortin system decreases in middle-aged and increases in old rats. **Journals of gerontology series a-biological sciences and medical sciences** 2018 Mar 14;73(4):438-445. doi: 10.1093/gerona/glx213. IF:5.95

VESEL M, RAPP J, **FELLER D**, KISS E, JAROMI L, MEGGYES M, MISKEI G, DUGA B, SMUK G, LASZLO T, KARNER I, PONGRACZ JE. ABCB1 and ABCG2 drug transporters are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling. **Respir Research.** 2017 Mar 24;18(1):52. doi: 10.1186/s12931-017-0537-6. IF: 3,751

JUDIT RAPP; EDIT KISS; MATYAS MEGGYES; EDINA SZABO-MELEG; **DIANA FELLER**; GABOR SMUK; TEREZIA LASZLO; VERONIKA SAROSI; TAMAS MOLNAR; KRISZTIAN KVELL; JUDIT PONGRACZ, Wnt5a modifies angiogenesis in squamous cell lung cancer. **BMC Cancer.** 2016 Nov 23;16(1):915. IF: 3,265

TENK J, ROSTÁS I, FÜREDI N, MIKÓ A, SOLYMÁR M, SOÓS S, GASZNER B, **FELLER D**, SZÉKELY M, PÉTERVÁRI E, BALASKÓ M. Age-related changes in central effects of corticotropin-releasing factor (CRF) suggest a role for this mediator in aging anorexia and cachexia. **GeroScience.** 2017. Feb; 39(1):61-72. doi: 10.1007/s11357-017-9962-1. IF:2.123

NORA FUREDI, ALEXANDRA MIKO, BIANKA AUBRECHT, BALAZS GASZNER, **DIANA FELLER**, ILDIKO ROSTAS, JUDIT TENK, SZILVIA SOOS, MARTA BALASKO, ANDRAS BALOGH, MARIANNA PAP, ERIKA PETERVARI. Regulatory alterations of energy homeostasis in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Journal of Molecular Neuroscience**. 2016 Aug;59(4):521-30. doi: 10.1007/s12031-016-0771-2. IF: 2.229

ROSTAS I, TENK J, MIKO A, FUREDI N, SOOS S, SOLYMAR M, LENGYEL A, SZEKELY M, GASZNER B, **FELLER D**, PETERVARI E, BALASKO M. Age-related changes in acute central leptin effects on energy balance are promoted by obesity. **Experimental gerontology** **85**: pp. 118-127. (2016) IF: 3.49

KOVACS T, CSONGEI V, **FELLER D**, ERNSZT D, SMUK G, SAROSI V, JAKAB L, KVELL K, BARTIS D, PONGRACZ JE. Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence. **Aging Cell**. 2014 Oct;13(5):838-49. doi: 10.1111/acel.12240. IF: 6,340