

Országos Tudományos Diákköri Konferencia 2015

Debreceni Egyetem

Immunológiai Intézet

Dendritikus sejt funkciók módosítása mesenchymális stroma sejtek által

Miltner Noémi

Molekuláris biológia MSc. II.évf.

Témavezetők:

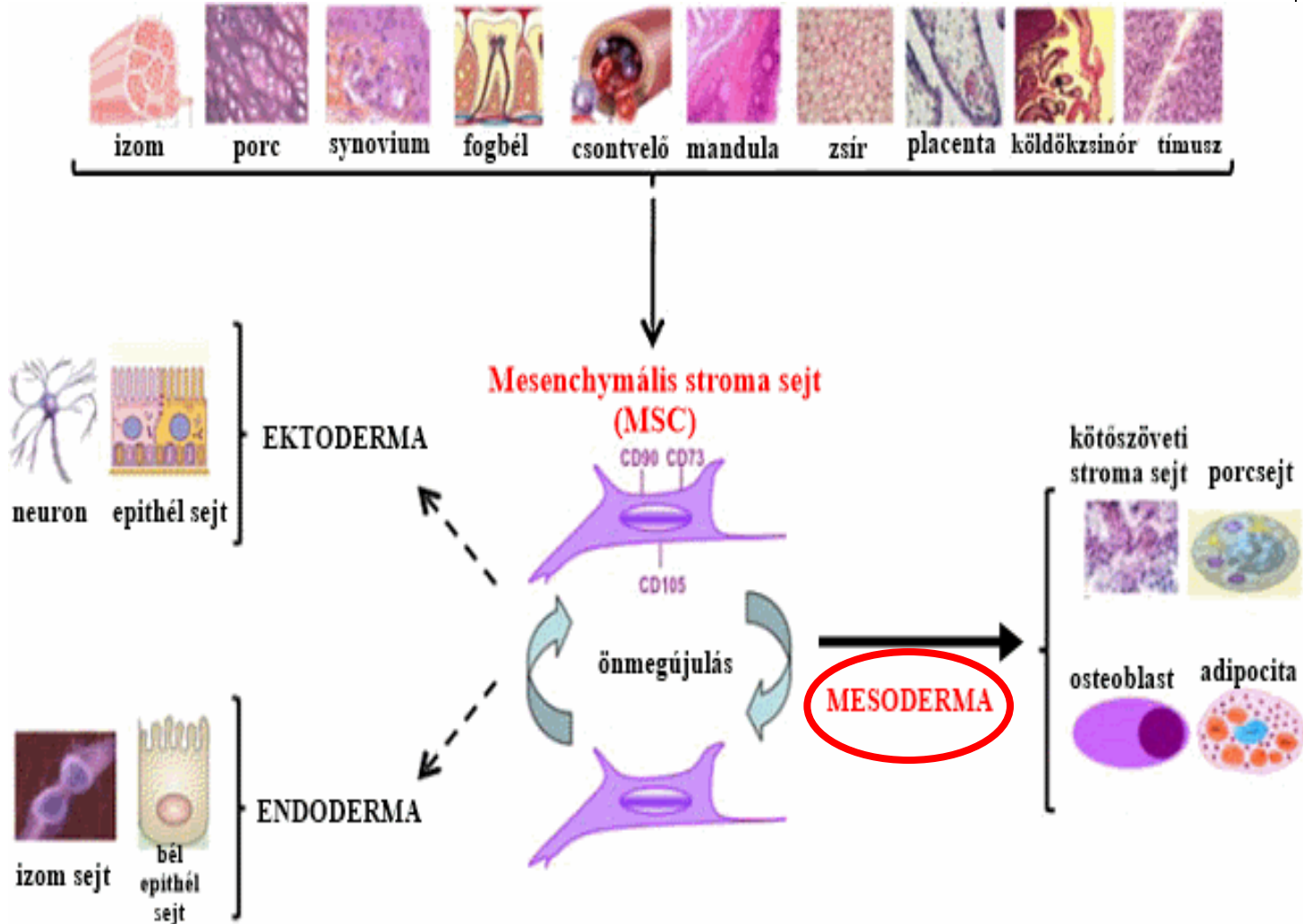
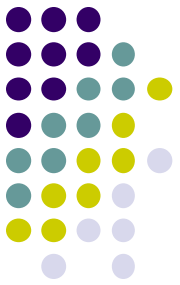
Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva
egyetemi tanár

Mázló Anett
PhD hallgató

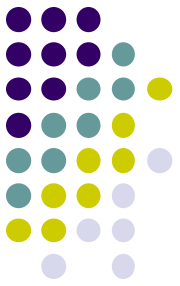
Budapest, 2015.04.01.



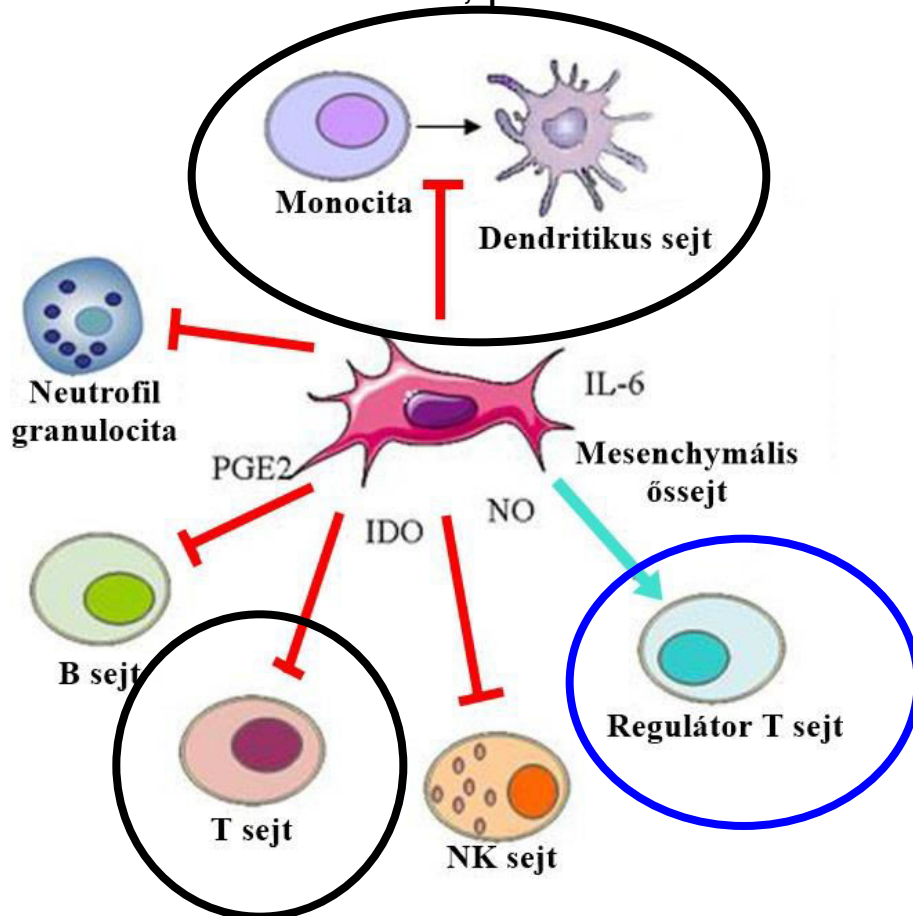
Mesenchymális stroma sejtek (MSC)



Mesenchymális stroma-szerű sejtek (Mesenchymal stem cell like cells ~ MSCi)



- **származás:** humán embrionális őssejt (hESC) vonal
- **morfológia:** fibroblaszt- szerű
- **adherencia**
- **differenciáció:** csont-, porc- és zsírszövet



- *in vivo* és *in vitro* immunmoduláló hatás
- **sejtfelszíni markerek:** CD44, CD73, CD90, CD105
- **nem expresszál:** CD34, CD45, CD14, CD133, HLA-DR, Okt4, Nanog, ABCG2, PODXL, SSEA4

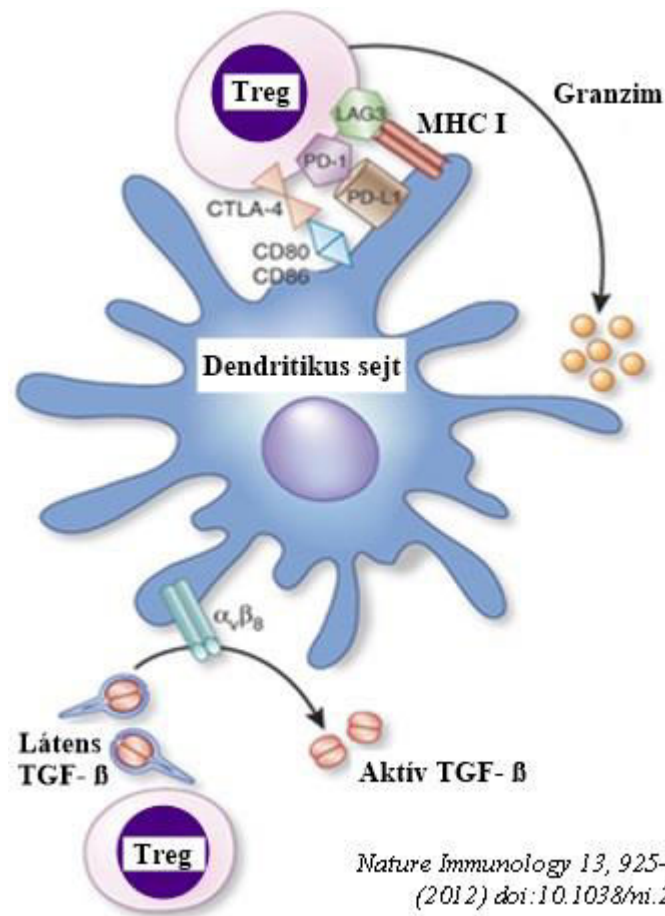
Humán MSC modell

Célkitűzés



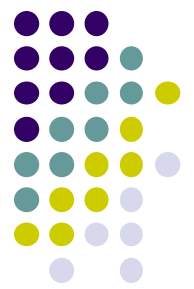
Okt4, Nanog, ABCG2 , PODXL, SSEA4
CD34, CD45, CD14, CD133, HLA – DR } -

CD44, CD73, CD90, CD105 +

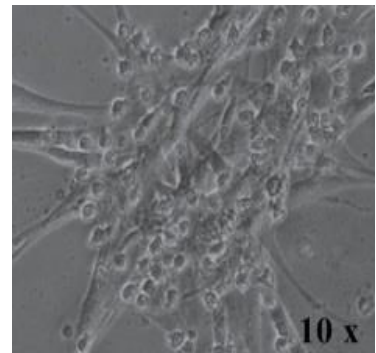
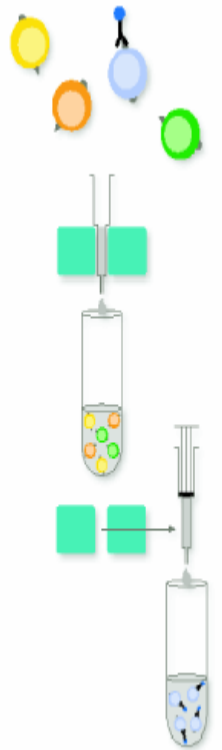


Nature Immunology 13, 925–931
(2012) doi:10.1038/ni.2406

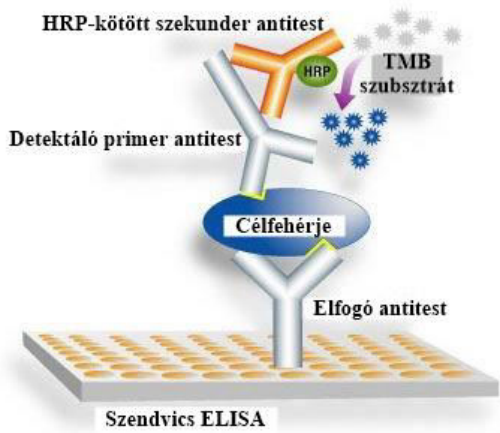
Anyagok és módszerek



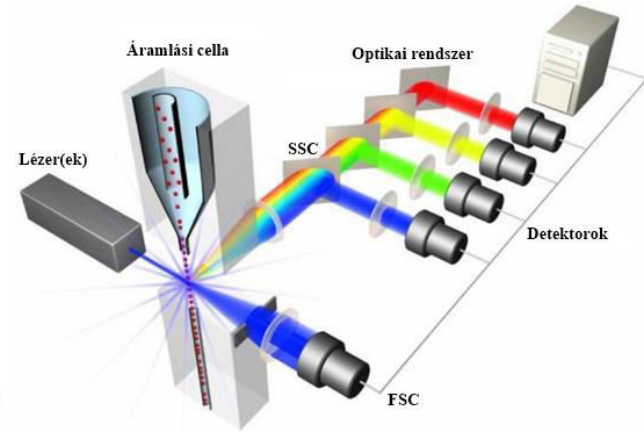
- Dendritikus sejtek életképességének vizsgálata 7AAD festéssel
- CD14+ monocita és CD4+ T-sejt szeparálása paramágnesesen jelölt bead-ek alkalmazásával, humán buffy coat-ból
- Monocita eredetű dendritikus sejtek (moDS) differenciáltatása, aktiválása
- MSCI sejtek tenyésztése és fenntartása
- Monocita/moDS-MSCI kokultúra készítése, aktiválása, szétszedése
- Áramlási citometria: CD1a/b/c, CD14, CD80, CD83, CD86, PD-L1, CTLA-4, IL-10 (intracelluláris festés)
- Enzim-kötött immunszorbens assay (ELISA): IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α
- Statisztikai analízis (GraphPad)



(Aldinucci et al., Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution *J Immunol.*, 185 (9), 5102-10)



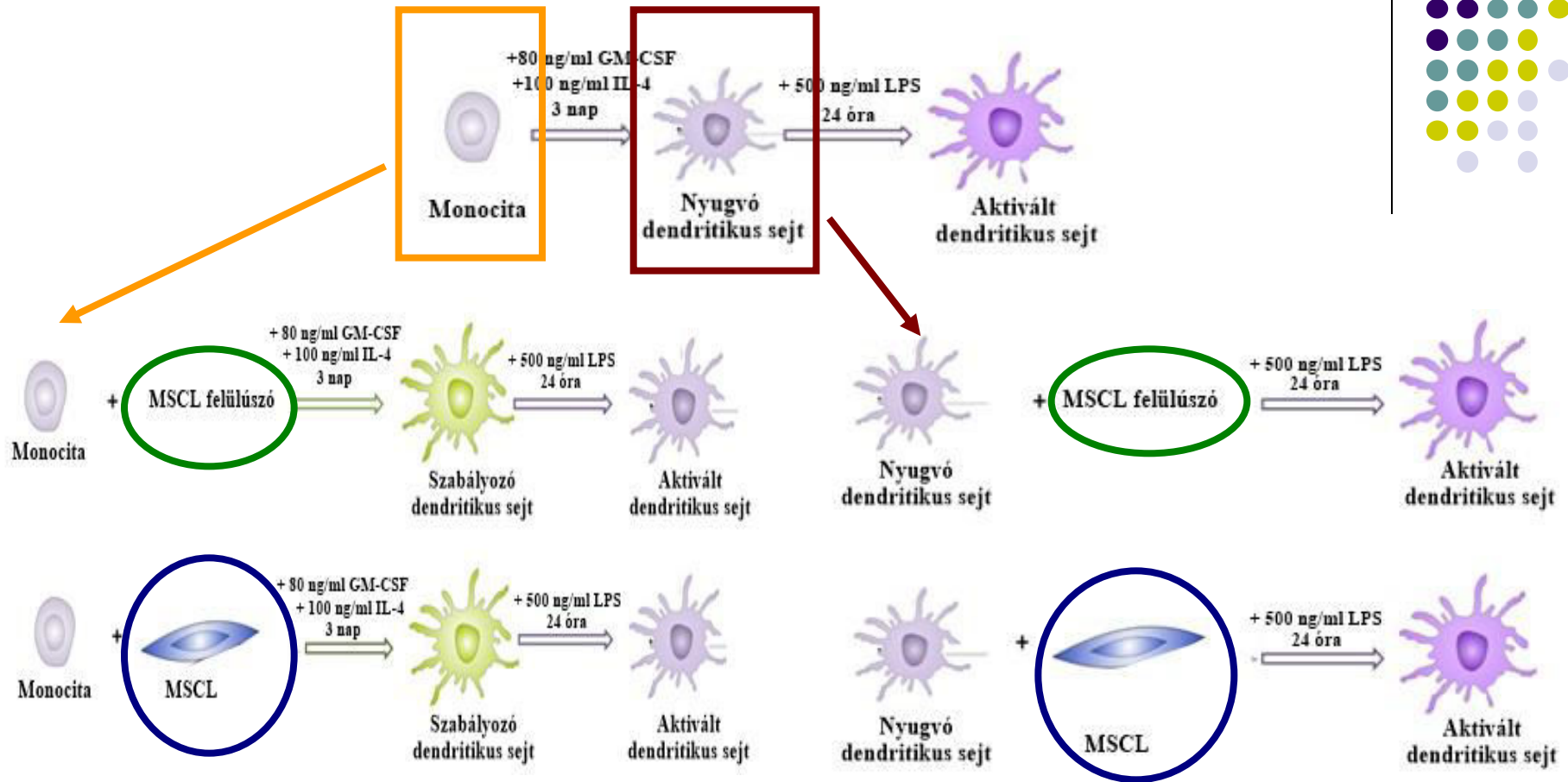
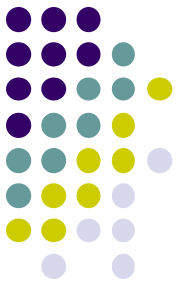
(<http://www.eiaab.com/info/type/160>)



(<http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>)

(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/hajkova-petra-2002-09-16/HTML/chapter3.html>)

Kísérleti modell



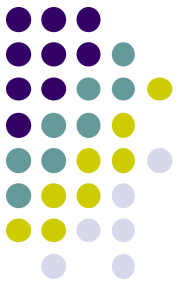
A monocita szeparálás napján (0. nap):

- **Monocita** + **MSCI felülűző** (M+MSCI fű)
- **Monocita** + **MSCI** sejtek kokultúrában (M+MSCI)

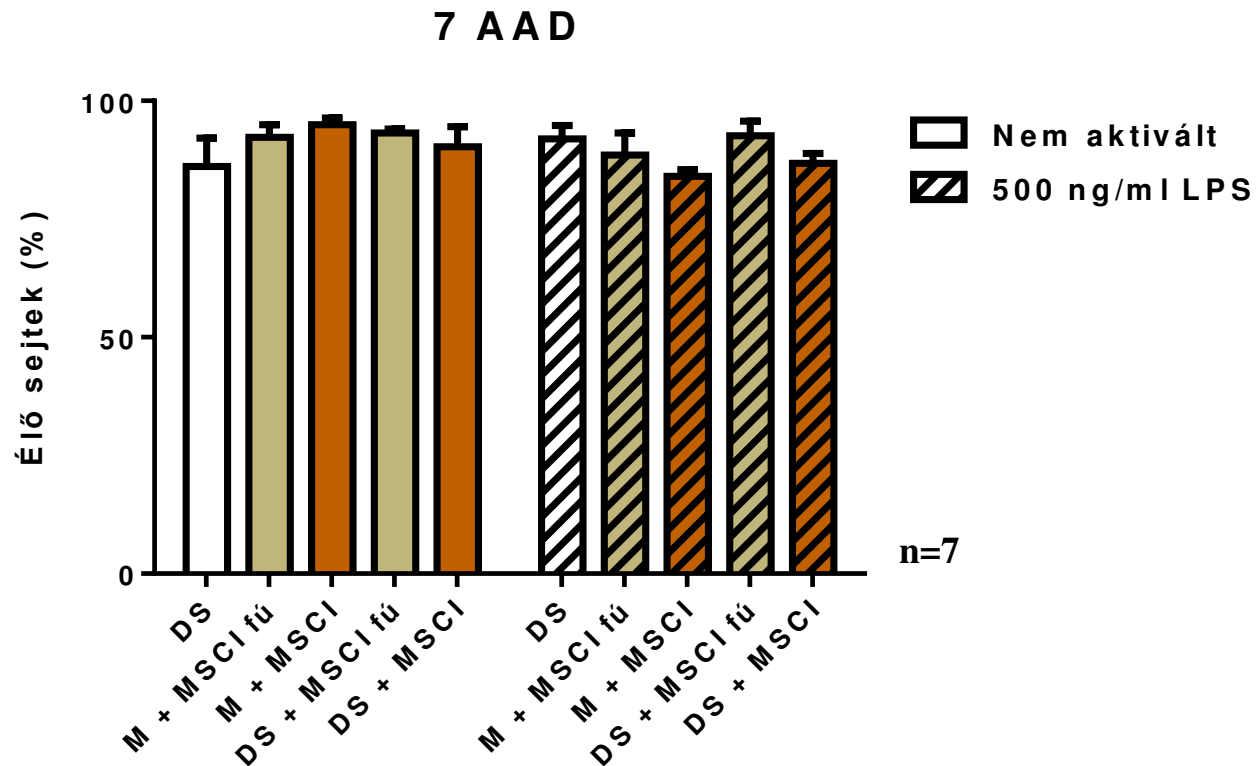
A monocita szeparálást követő 3. napon:

- **Monocitából differenciált dendritikus sejtek (moDS)** + **MSCI felülűző** (DC+MSCI fű)
- **Monocitából differenciált dendritikus sejtek (moDS)** + **MSCI** sejtek kokultúrában (DC+MSCI)

EREDMÉNYEK

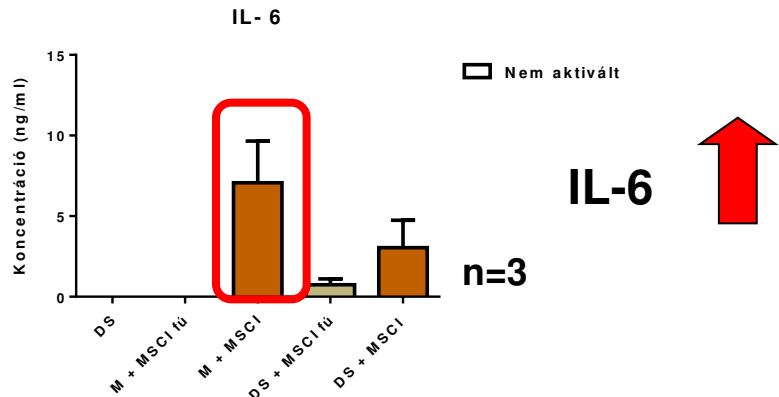


A monocita eredetű dendritikus sejtek (moDS) életképességének vizsgálata 7-amino-actinomycin D (7AAD) festéssel

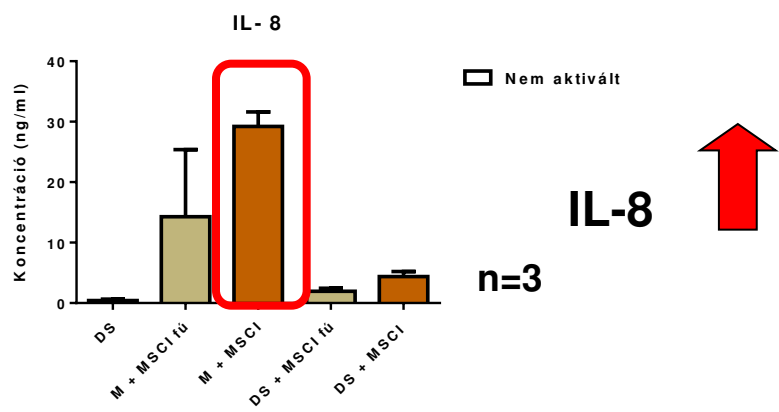


A moDS-ek életképességét vizsgálva **szignifikáns változás nem detektálható** sem MSC1 **felülűszó**, sem **MSC1** közvetlen jelenlétében.

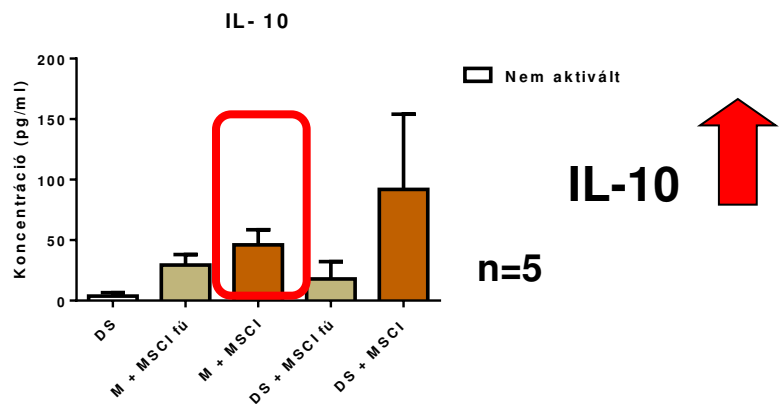
MSCI felülűszó, ill. MSCI sejtek jelenlétében tenyésztett dendritikus sejtek citokin szekréciónak vizsgálata ELISA-val



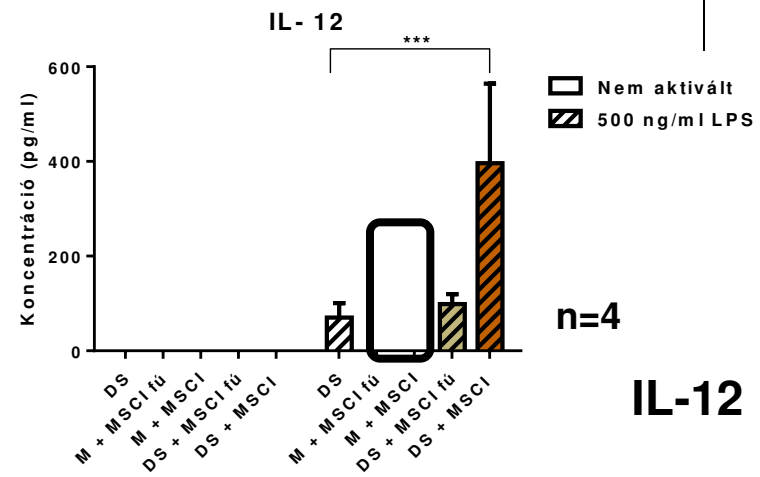
IL-6 ↑



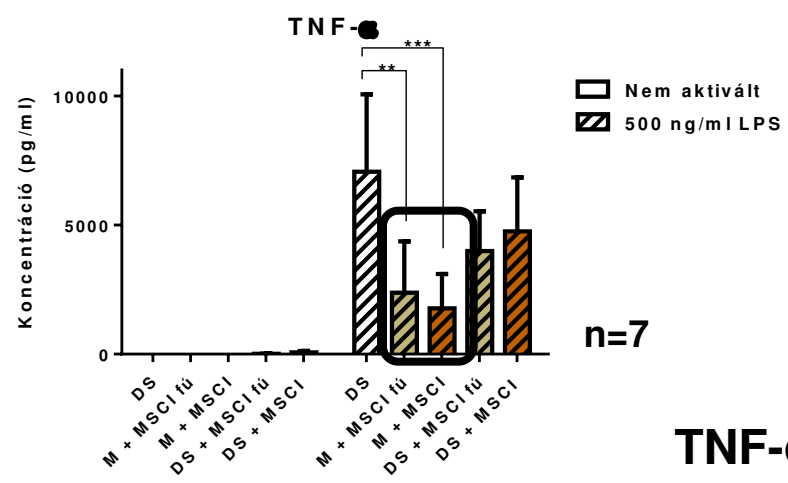
IL-8 ↑



IL-10 ↑



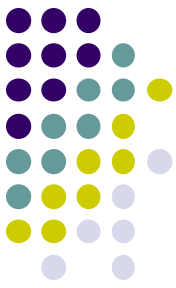
IL-12 ↓



TNF-α ↓

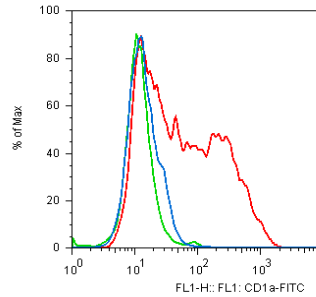
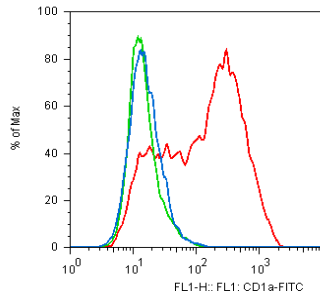
* p<0,1 ** p<0,05 *** p<0,001

MSCI felülűszó, ill. MSCI sejtekkel kokultúrában tenyészített moDS sejt felszíni markereinek vizsgálata áramlási citometriával

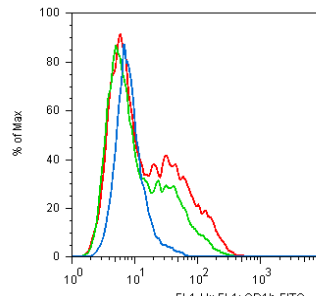
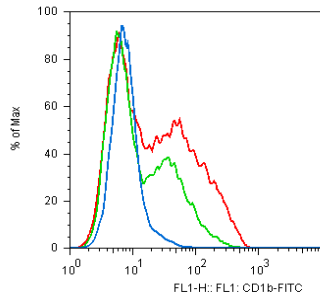


Aktiválatlan

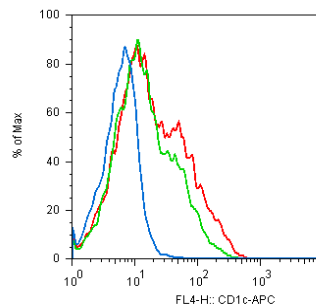
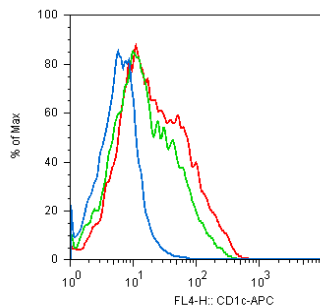
500 ng/ml LPS



CD1a

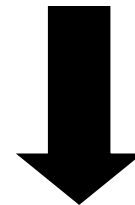


CD1b



CD1c

CD1a/b/c

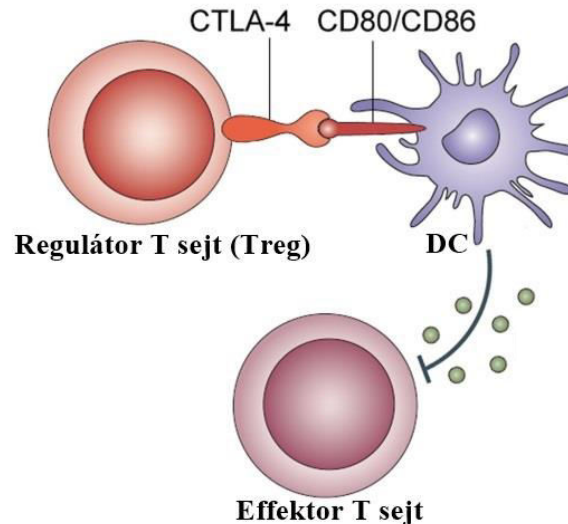
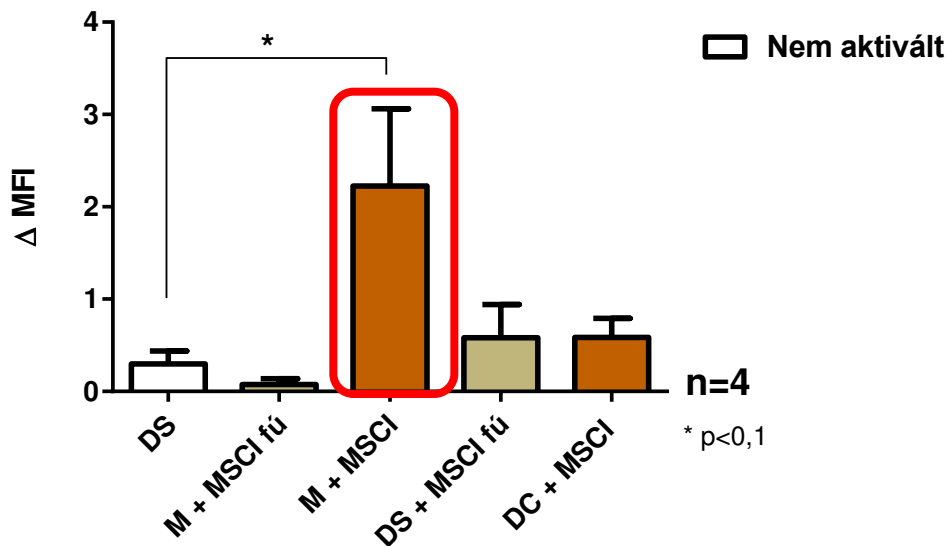


A hisztogramok egy reprezentatív donor adatait ábrázolják .

A moDS-ek sejtfelszíni gátló molekuláinak vizsgálata

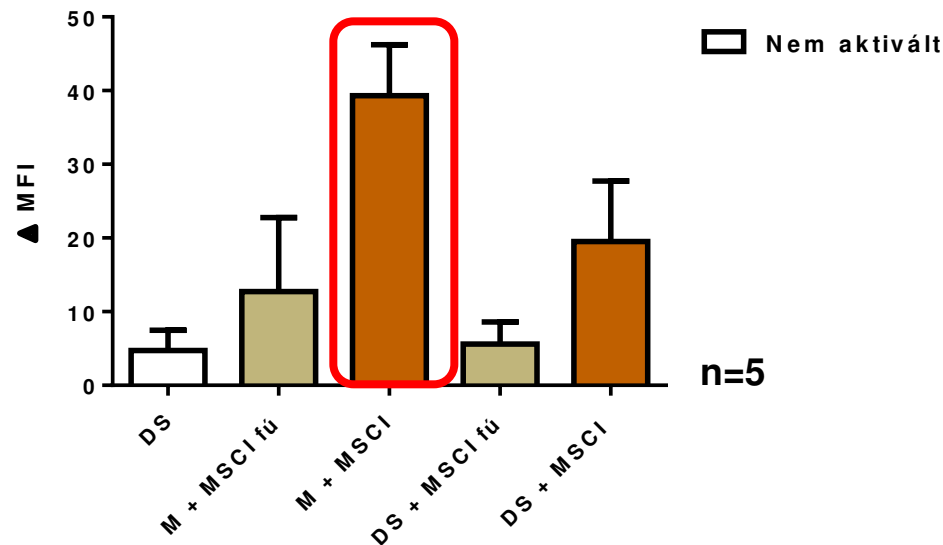


CTLA-4



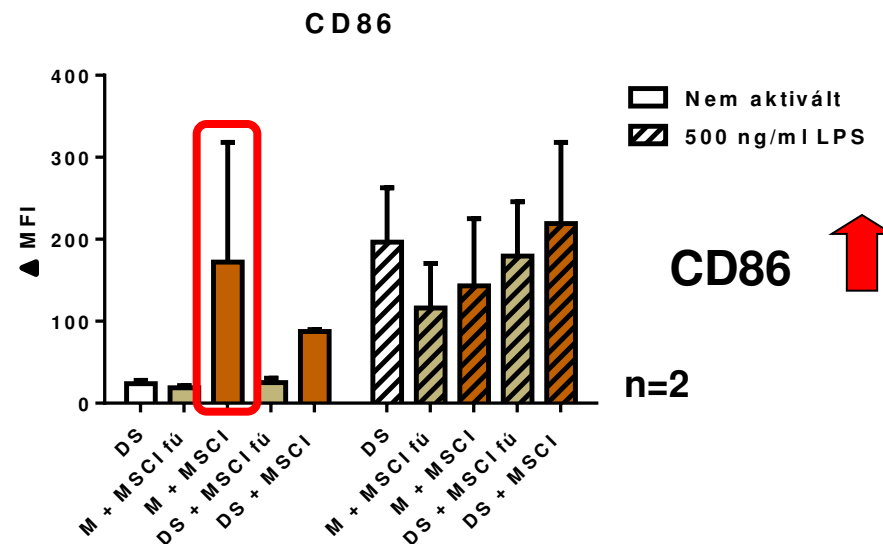
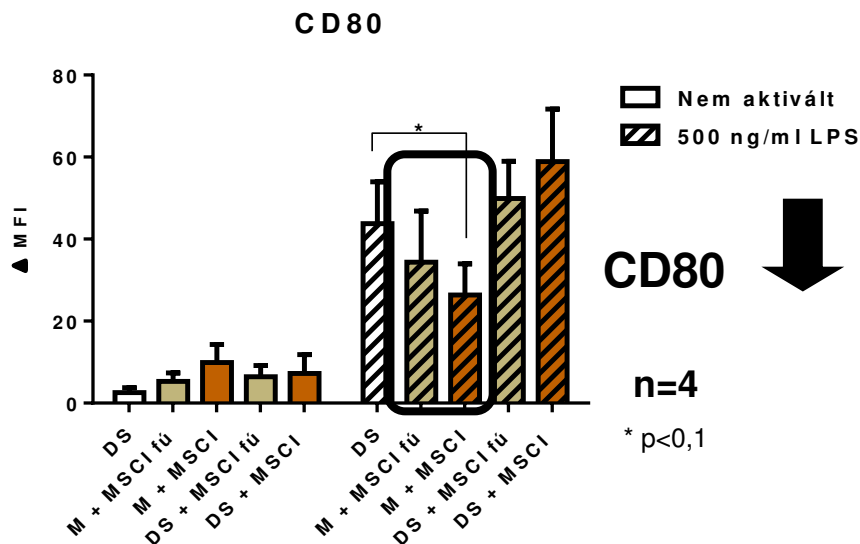
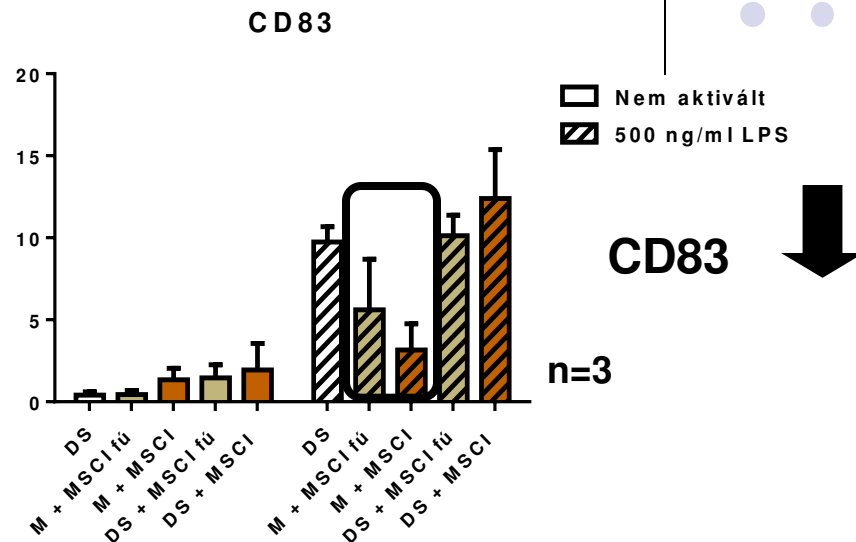
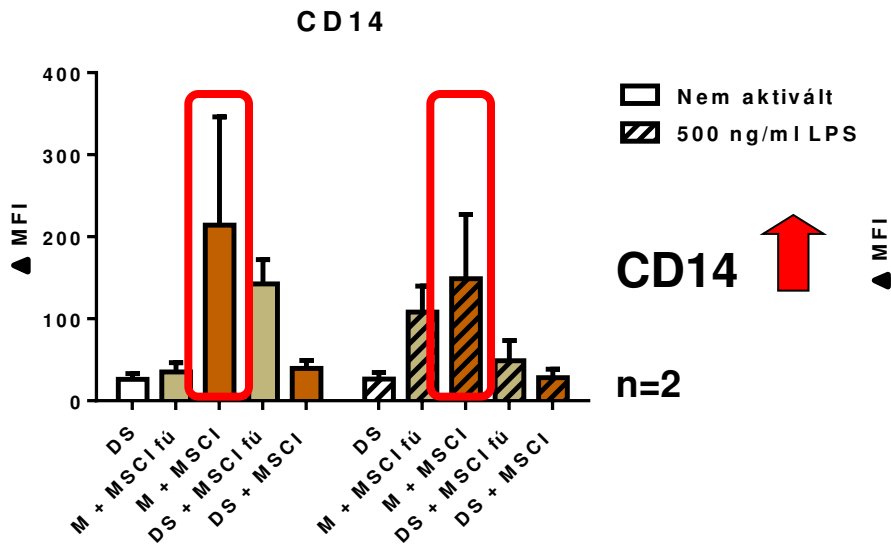
(DOI: 10.1002/hep.26694 *Hepatology*,
Volume 59, Issue 2, pages 567–579, February 2014)

PD-L1



MSCL sejtek jelenlétében a moDS-ek egy **CTLA-4 és PD-L1 molekulákat kifejező sajátos fenotípusú sejtípus**sá differenciálódnak.

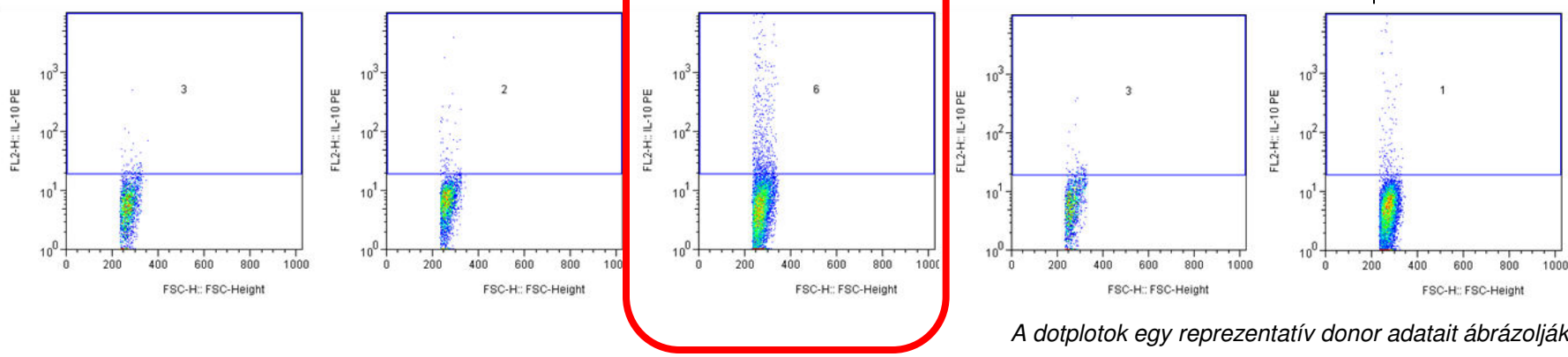
MSCI sejtekkel együtt, ill. MSCI felülűszó jelenlétében differenciáltatott moDS-ek sejt felszíni markereinek vizsgálata áramlási citometriával



CD4+ T-limfociták intracelluláris IL-10 termelésének vizsgálata

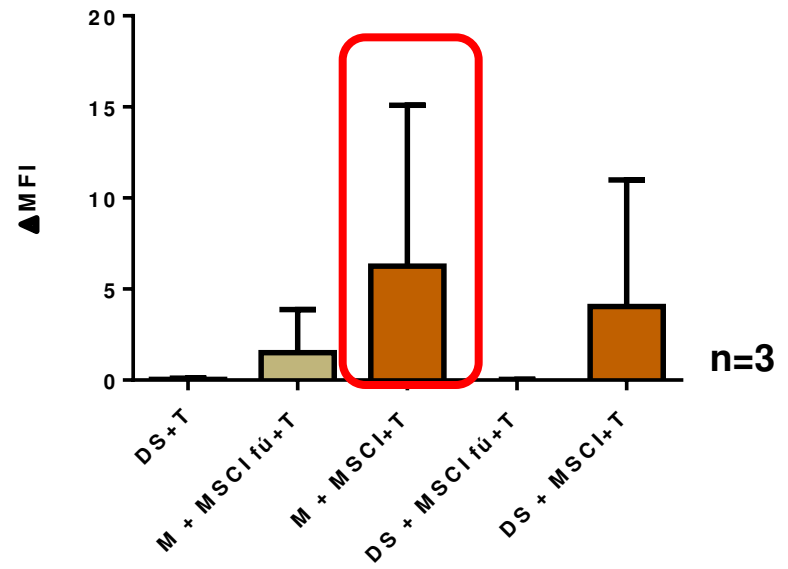


IL-10 ↑



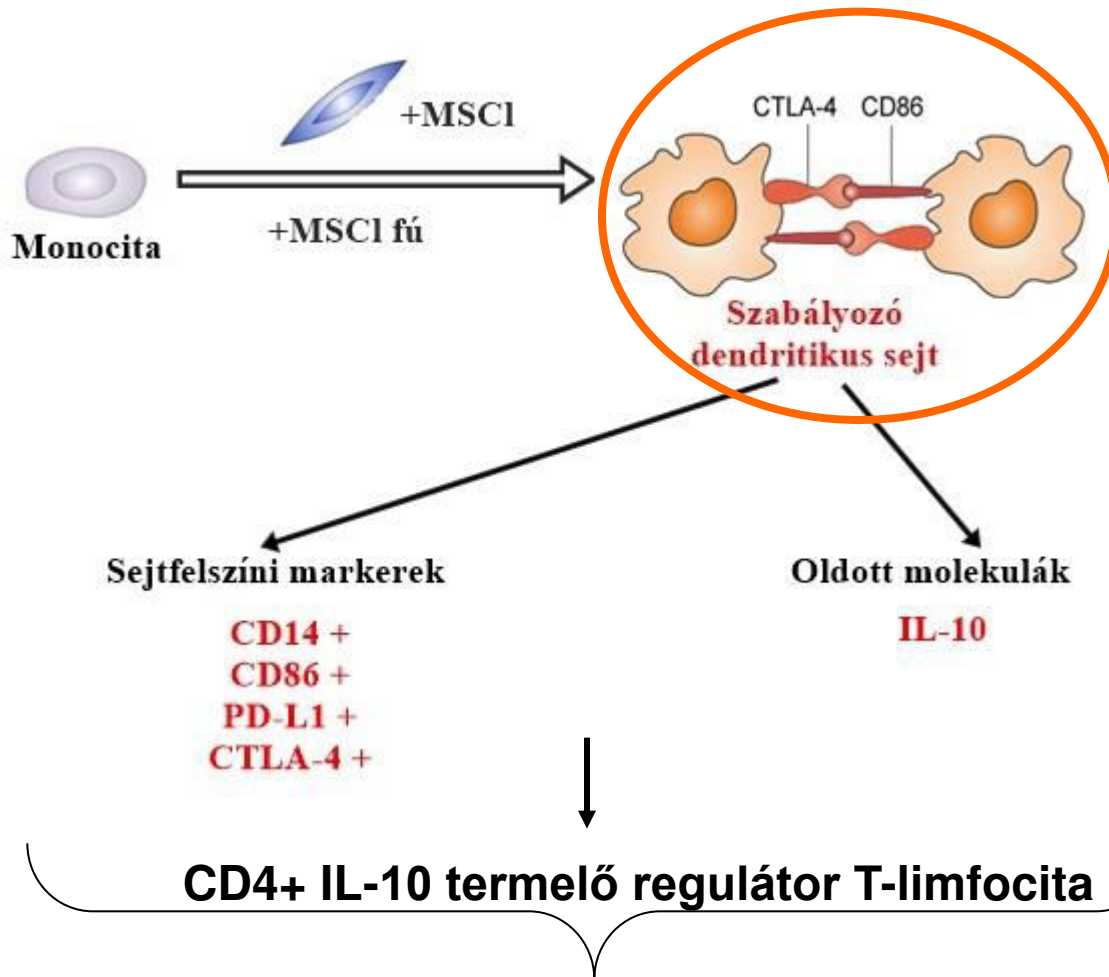
A dotplotok egy reprezentatív donor adatait ábrázolják.

Intracelluláris IL-10



IL-10 ↑

Összefoglalás



Immunszuppresszív mikrokörnyezet

Jövőbeli terveink: T-limfocita polarizáció vizsgálat (ELISPOT)
CTLA-4 gátlása neutralizáló antitest alkalmazásával

Köszönetnyilvánítás

Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva

Mázló Anett

Nagyné Kovács Erzsébet

Dr. Apáti Ágota



Köszönöm a figyelmet!

Függelék

- ❖ Monocita eredetű dendritikus sejtek (moDS) életképességének vizsgálata 7-amino-actinomycin D festéssel
- ❖ CD14+ monocita és CD4+ T-limfocita szeparálás humán vérkészítményből
- ❖ Monocita eredetű dendritikus sejtek (moDS) differenciálása és aktiválása
- ❖ MSC1 sejtek tenyésztése és fenntartása
- ❖ Monocita/moDS-MSC1 kokultúra készítése, aktiválása és szétszedése



- ❖ Áramlási citometria
(Kiértékelés: FlowJo szoftver)
- ❖ Enzim-kötött immunszorbens assay
(ELISA)
- ❖ Intracelluláris festés
- ❖ Statisztikai analízis (GraphPad szoftver)