

PÁZMÁNY Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai és Bionikai Kar

ROSKA Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori
Iskola



Hajdara Anna

Melanóma-asszociált fibroblasztok interakciói
makrofágokkal és gamma delta T-sejtekkel

Doktori disszertáció

Témavezető:

Dr. Mayer Balázs

Társ-témavezető:

Dr. Gyöngy Miklós

2023

1. Bevezetés

A rosszindulatú daganatképződésben szerepet játszó folyamatok tanulmányozása és terápiás célpont keresése kezdetben magán a transzformált sejten belül lezajló genetikai, molekuláris biológiai és metabolikus eseményekre irányult. A legújabb ismeretek szerint a daganatsejtek osztódásához és a tumorok növekedéséhez azonban számos egyéb nem malignus sejt is hozzájárulhat a tumor mikrokörnyezetén belül. A tumor mikrokörnyezet nem malignus sejtjei a stromális sejtek és a különböző immunsejtek. A stromális sejtek közé tartoznak a tumor-asszociált fibroblasztok, tumor asszociált adipociták, tumor endothél sejtek, és a periciták, az immunsejtekhez pedig a tumor asszociált makrofágok, tumor asszociált neutrofil sejtek, NK sejtek, dendritikus sejtek, mieloid eredetű szuppresszor sejtek, és a különféle T és B sejt populációk [1]

A legnagyobb mortalitással bíró bőrrák típus a melanóma, melynek esetszáma évről évre növekszik. Melanómában, a tumor mikrokörnyezetben szintén megtalálhatók tumor-asszociált fibroblasztok, ezek a melanóma-asszociált fibroblasztok (MAF). Az általuk termelt struktúrfehérjék térbeli támasztó szerkezetet és protektív hálózatot biztosítanak a melanóma sejteknek. A MAF-ok eredetét tekintve számos lehetséges prekuzorra lehet gondolni, mint a tumor környezetben rezidens fibroblasztokra, csontvelői eredetű mesenchymális stromasejtekre, hematopoetikus őssejtekre, endothél

sejtekre, vagy pedig helyi epitheliális sejtekre. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a MAF-ok olyan funkcionális hasonlóságokban osztoznak a mesenchymális stromasejtekkel, mint a citotoxikus T-limfociták aktivitásának gátlása. Továbbá elemeztük a MAF-ok differenciálódási potenciálját, immun-suppresszív hatásukat, valamint kolokalizációjukat más immunsejtekkel a tumor környezetben. Egyéni kutatómunkámat erre építve vizsgáltam a MAF-ok immunmoduláló hatását primer, humán monocita eredetű makrofágokon. Továbbá a MAF-ok citotoxikus CD8⁺ T-sejt aktivitásra kifejtett gátló hatásának kimutatását követően, önálló munkám arra irányult, hogy az immun-suppresszív hatású MAF-okat hogyan lehetne eliminálni, milyen egyéb immunsejtek felhasználásával lehetne azokban apoptózist kiváltani, citotoxikus hatást elérni. Ehhez egy nem-konvencionális, $\gamma\delta$ T-sejt recepttorral rendelkező T-sejt alpopulációt vizsgáltam. A $\gamma\delta$ T-sejtek a konvencionális $\alpha\beta$ T-sejtekkel szemben nem peptid természetű antigéneket ismernek fel a célsejtek sejtfelszíni fő hisztokompatibilitási komplexeihez (MHC) kötve, hanem antigén felismerésük MHC független módon történik. Jelenleg a $\gamma\delta$ T-sejteket alkalmazó tumorellenes terápiás eljárások változó eredményekkel bírnak. Ebből kifolyólag kutatásom során $\gamma\delta$ T-sejtek biológiájának megértése volt a cél melanómában, fókuszba helyezve a $\gamma\delta$ T-sejtek és a MAF-ok kölcsönhatását.

2. Célkitűzések

A melanómával kapcsolatos jelenlegi kutatások jelentős része a tumor sejtekre irányul. Ezzel szemben a doktori dolgozatom célja nem a tumorsejtek, hanem a tumor mikrokörnyezet egyéb sejtjeinek tanulmányozása, ezen belül a tumor stromát képező MAF-ok és egyes immunsejtpopulációk kölcsönhatásának elemzése volt. Először a MAF-ok és primer makrofágok interakcióját vizsgáltam, a MAF-ok immunmoduláló, immunszuppresszív hatását tekintve. Ezt követően, a MAF-ok és egy sajátos tumorelleses hatású immunsejt populáció, a $\gamma\delta$ T-sejtek kölcsönhatását vizsgáltam abból a szempontból, hogy vajon képesek lehetnek-e a $\gamma\delta$ T-sejtek elpusztítani az immunszuppresszív MAF-okat. Kutatásomhoz az alábbi részletesebb célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. A mesenchymális stromasejtek egyik fő ismérve az immunmoduláció. Mivel a MAF-ok funkcionális hasonlóságot mutatnak az MSC-kkel, mint például a citotoxikus CD8⁺ T-sejtek aktivitásának gátlása, először arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a MAF-ok hogyan befolyásolják a makrofágok immunfunkcióit. Első célkitűzésem volt, hogy az immunmoduláció vizsgálatához primer monocitákból M1 és M2 makrofágokat hozzak létre egy *in vitro* differenciációs esszé kidolgozásával.
2. A második célkitűzésem során a monocitákból differenciáltatott M1 és M2 makrofágokat terveztem vizsgálni egy olyan

kokultúra esszében, amelyben a makrofágokat a már korábban izolált MAF sejtekkel együtt tartjuk, és a kokultúra LPS stimulálását követően az immunszuppresszív hatású IL-10 citokin mennyiségét mérjük a sejtes felülúszóból.

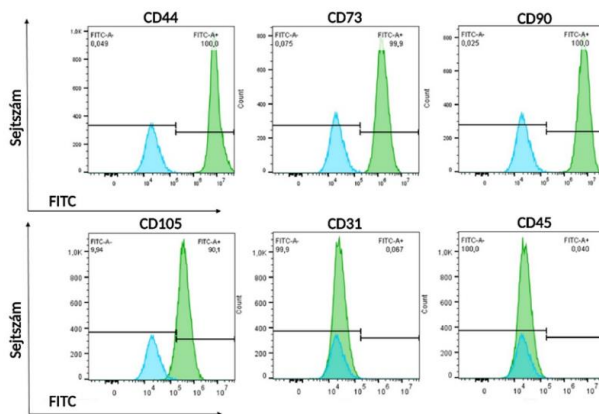
3. A $\gamma\delta$ T-sejtek felhasználása ígéretes terület a sejterápiás kutatásban és fejlesztésben. Mivel különböző daganattípusokban a tumorsejtek és $\gamma\delta$ T-sejtek interakciója extenzív módon vizsgált, a vizsgálataim a $\gamma\delta$ T-sejtek és MAF-ok interakciójára irányultak, abból a szempontból, hogy vajon az immunszuppresszív hatású MAF-ok elpusztíthatók-e az anti tumor hatású $\gamma\delta$ T-sejtekkel. Ehhez a harmadik kítűzött céloom a $\gamma\delta$ T-sejtek perifériás vérből való felszaporítása és izolálása volt.
4. A továbbiakban a negyedik céloom az volt, hogy az izolált $\gamma\delta$ T-sejtek és MAF-ok segítségével megállapítsam, hogy lehet-e olyan *in vitro* feltételeket teremteni, amelyek mellett képesek a $\gamma\delta$ T-sejtek a MAF-okban apoptózist indukálni.
5. A $\gamma\delta$ T-sejtek MHC-független antigén felismerő tulajdonsággal rendelkeznek. Ötödik célkitűzésként azt vizsgáltam, hogy a megfelelően beállított apoptózis esszében a melanóma kórtörténettel rendelkező páciensekből izolált $\gamma\delta$ T-sejtek képesek-e MHC független módon az azonos páciensből származó MAF-okban apoptózist indukálni.

6. Hatodik célkitűzésként azoknak a molekuláknak a felderítését terveztem, amelyek az *in vitro* esszékből a $\gamma\delta$ T-sejtek által indukált MAF apoptózis mechanizmusában szerepet játszanak.

3. Új tudományos eredmények

Tézis 1.a: A melanóma asszociált fibroblasztok funkcionális hasonlóságot mutatnak az MSC-kkel. Ennek egy kvalitatív mutatója a tradicionális összejt markerek expressziója a MAF sejtek felszínén.

Feltételezve a MAF-ok és MSC-k közötti funkcionális hasonlóságot, megvizsgáltam a sejt felszíni expresszióját az alábbi Nemzetközi Sejt-, és Génterápia Társaság (International Society for Cell and Gene Therapy, ISCT) által definiált MSC markereknek (**1. ábra**) A CD44, CD73, CD90 és CD105 markerek 90% feletti pozitivitást mutattak, míg a CD31 vérlemezke-endothél sejtadhéziós molekula (PECAM-1) markerre és a CD45 pán-leukocita markerre nézve az expresszió 1% alatt volt.



1. ábra: MSC markerek expressziója MAF sejteken. A hisztogramon a sejt felszíni antigén expresszióját mutatják zöld színnel a kék hisztogrammal ábrázolt (jelöletlen) kontroll mintához viszonyítva (n=3)

Tézis 1.b: A MAF-ok képesek a primer humán makrofág sejtek immunmodulálására. Az immunmoduláció anti-inflammatórikus irányú változását képesek vagyunk nyomon követni a prognosztikai jelentőséggel bíró IL-10 citokin mérésével in vitro MAF és makrofág kokultúrákban.

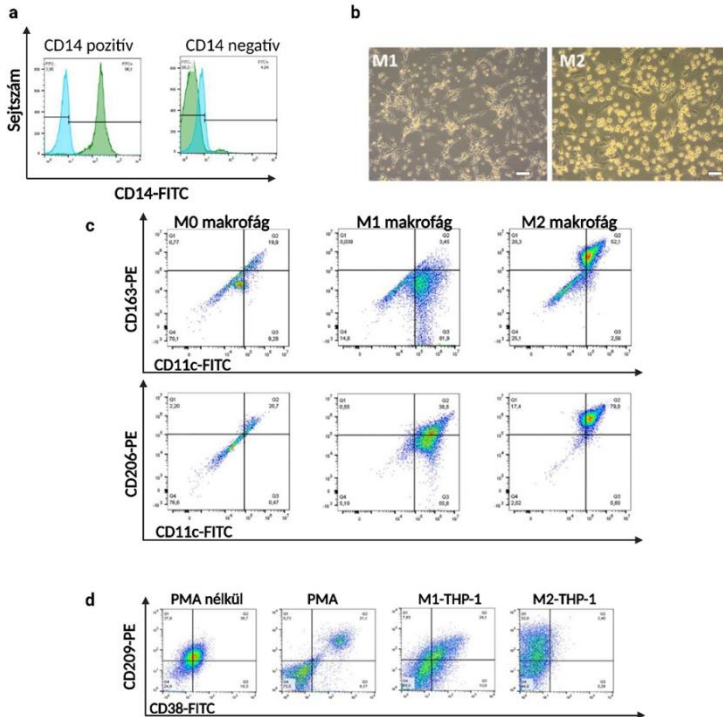
A makrofágok előállításához szükséges primer monociták izolálását egészséges önkéntesek perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből (PBMC) végeztem, úgy, hogy a heterogén immunsejtekből álló PBMC populációból a monocitákat azok sejtfelszínén található CD14 marker alapján szelektáltam. Ezt követően a monocita sejtek M1 és M2 irányú differenciációját különböző citokin milióben végeztem. A differenciációs protokollt a primer sejtek alkalmazását megelőzően THP-1 humán monocita sejtvonalon állítottam be.

A kilenc nap alatt differenciáltatott M1 makrofágok morfológia alapján kerek sejttesttel, valamint hosszabb, vékonyabb citoplazmikus nyúlványokkal rendelkeztek. Ezzel szemben az M2 makrofágok morfológiája rövidebb, vastagabb citoplazmikus nyúlványokat mutatott (**2. ábra** b rész).

Sejtfelszíni markereket tekintve az M1 specifikus CD11c marker 85% felett jelen volt az általunk M1 irányba differenciáltatott makrofágokon, azonban az M2 makrofágok is 50% feletti pozitivitást mutattak rá (**2. ábra** c rész). Az M2 specifikus CD163 marker 70% feletti pozitivitást mutatott, míg a szintén M2 specifikus CD206 marker 90% felett volt jelen az M2 irányba differenciáltatott makrofágokon (**2. ábra** c rész). Az M2 makrofágokra jellemző markerek esetén is igaz az, hogy kisebb mértékben, de jelen voltak az M1 irányban differenciáltatott

makrofágokon is. Ez az eredmény arra utal, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények (citokinek) mellett az M1-M2 immunfenotípus makrofágoknál nem különíthető el két homogén csoportra. M1-M2 kevert immunfenotípusú csoportok alakulnak ki, amelyek funkcionális tulajdonságait feltehetően az adott citokin környezet határozza meg.

Ugyanígy a THP-1-makrofág sejtek esetén is hasonló tapasztaltunk sejtfelszíni marker expressziója terén: az M1-specifikus marker 35%-ban volt jelen az M1-THP-1, míg 2% körül az M2-THP-1 sejteken is (**2. ábra** d rész). Az M2-specifikus CD209 50% feletti pozitivitást mutatott M2-THP-1 sejteken, de 30%-ban az M1-THP-1 sejteken is jelen volt (**2. ábra** d rész).

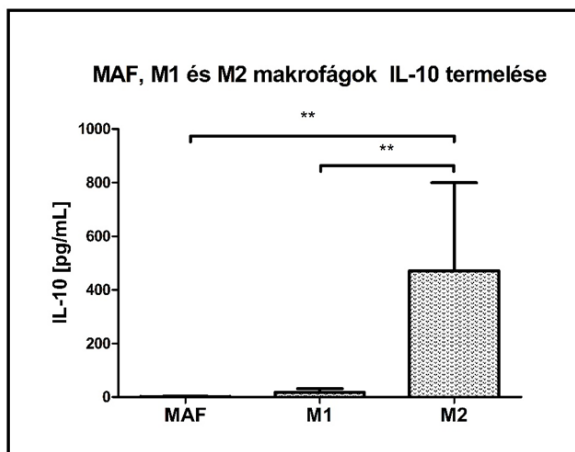


2. ábra: In vitro differenciált M1 és M2 immunfenotípusú makrofágok karakterizálása (a) CD14-pozitív (bal oldal) és -negatív (jobb oldal) PBMC frakciók mágneses szeparációt követően. (b) Monocitákból származó M1 (bal oldal) és M2 (jobb oldal) makrofágok morfológiája méretskála=20 μm . (c) CD163, CD206, CD11c sejtfelszíni markerek expressziója M0, M1 és M2 immunfenotípus-szerű makrofág sejteken (d) és CD209 sejtfelszíni markerek expressziója PMA nélküli, PMA-indukált, M1-szerű THP-1 és M2-szerű THP-1 sejteken.

A humán perifériás vérből származó monociták inflammatórikus M1 és M2 immunfenotípus irányukat a morfológia és sejtfelszíni markerek

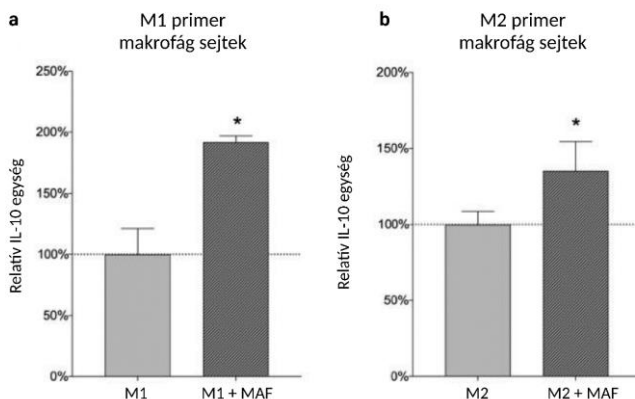
expressziója mellett IL-10 citokin szekréciójuk alapján is meg tudtam különböztetni.

Az immunszuppresszív tulajdonsággal rendelkező M2 makrofágok szignifikánsan magasabb IL-10 termelést mutattak az M1 makrofág sejtekhez képest (3. ábra). A MAF-ok önmagukban nem termelnek IL-10-et, ezért a továbbiakban azt vizsgáltam, hogy milyen módon képesek módosítani a makrofágok tulajdonságait az immunszuppresszív hatású IL-10 termelés elősegítésén keresztül .



3. ábra: M1 és M2 immunfenotípusú differenciált makrofágok és MAF-ok IL-10 szekréciója (n=3). A hibasávok az átlag értékeket és a standard hibát (SD) mutatják. *** p < 0.001

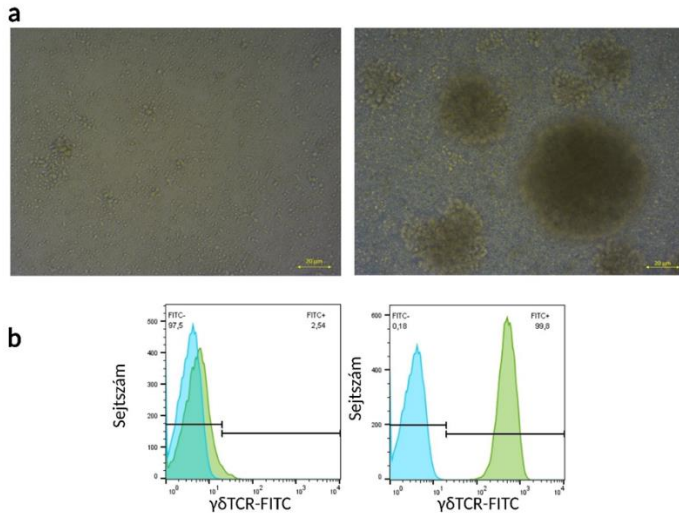
A MAF-ok jelenléte szignifikáns növekedést eredményezett a makrofágok IL-10 szekréciónjában beleértve a polarizált THP-1 sejteket és primer monocitákból differenciáltatott M1 és M2 típusú makrofágokat is. Ezen eredmények alapján igazoltam, hogy a MAF-ok más immunsejtek mellett a makrofágokat is befolyásolják, úgy, hogy azok immunszuppresszív hatású IL-10 termelését megnövelik.



4. ábra: A MAF-ok IL-10 citokin szekréciónra kifejtett hatása egészséges donorokból származó makrofág sejteken. A relatív IL-10 koncentráció MAF/M1 (a) és MAF/M2 (b) differenciált primer makrofág-MAF kokultúrákban makrofág monokultúrához képest (n=3). A hibasávok átlag értékeket és \pm az átlag standard hibáját (SEM) mutatják. * $p < 0.05$

Tézis 2a: A perifériás T-limfociták anti-tumor hatású $\gamma\delta$ T szubpopulációja humán perifériás vérből izolálható, és in vitro ko-kultúrában képes a primer, humán MAF-ok apoptózisát indukálni.

A perifériás vér $\gamma\delta$ T-sejtjeinek alacsony százalékos aránya miatt (1-5%) az *in vitro* kísérleteimhez zoledronsav hozzáadásával növeltem az arányukat egy korábban publikált protokoll alapján [2], [3]. A stimulus hozzáadását követő hetedik napon a PBMC-ket mágnesesen szeparáltam és a szeparációs folyamat két frakcióját áramlási citometriával ellenőriztem. A mágneses oszlop által megkötött, majd eluált frakció homogén $\gamma\delta$ T-sejteket tartalmazott (a sejtpopuláció tisztasága 99% körül volt) minden elválasztási lépésnél a kísérleteim során (5. ábra b rész).



5. ábra: Zoledronsav és IL-2 mediált PBMC proliferáció és mágneses $\gamma\delta$ T-sejt szeparáció (a) A nem-stimulált (bal oldal) és zoledronsav-IL-2 stimulált PBMC sejtek morfológiája 7 napos stimulációt követően. Méretskála=20 μm . (b) Reprezentatív áramlási citometriai hisztogramok a $\gamma\delta$ TCR-negatív (bal oldal) és -pozitív (jobb oldal) frakcióknak mágneses szeparációt követően. Kék szín: jelöletlen kontroll minta, zöld szín: $\gamma\delta$ TCR-FITC jelölt sejtek. A szeparációs tisztasága a sejteknek (n=4) 99.2 ± 0.43 % felett volt.

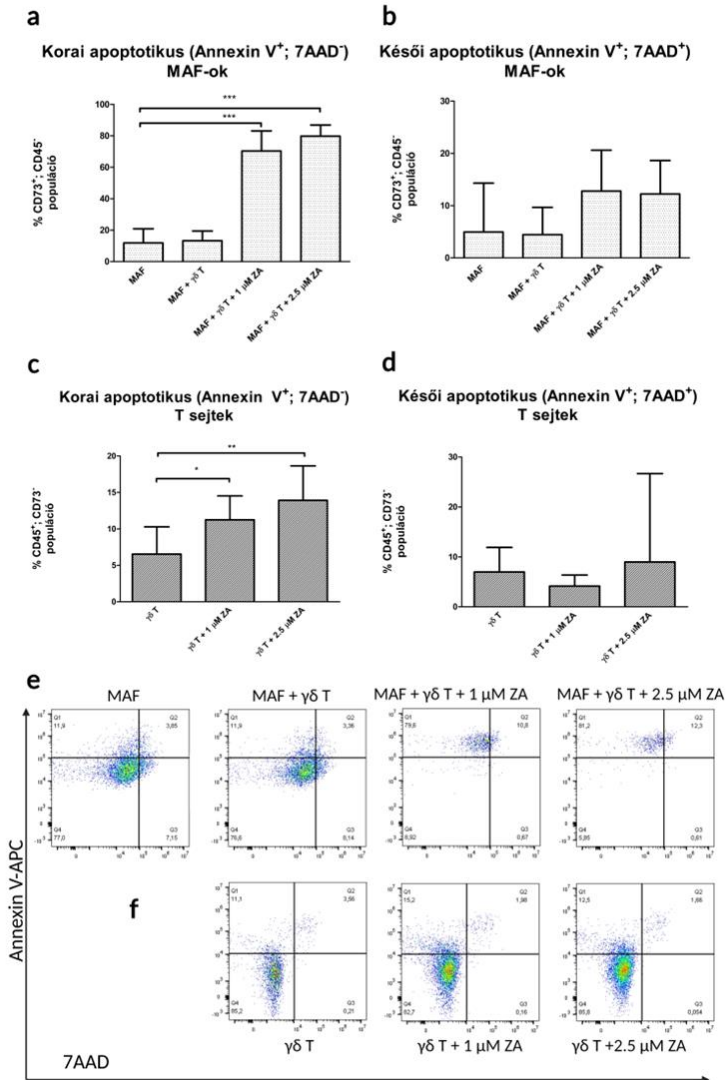
Megvizsgáltam azt, hogy a $\gamma\delta$ T-sejtek proliferációjához szükséges zoledronsav pre-stimulus önmagában képtessé teszi-e a $\gamma\delta$ T-sejteket, hogy citotoxikus hatást fejtsenek ki a MAF-okra.

Eredményeim azt mutatták, hogy a stimulus nélküli $\gamma\delta$ T sejt-MAF kokultúrában megegyezőek voltak az apoptotikus populációk az egyedüli MAF monokultúrákkal (6. ábra a rész), és további zoledronsav stimulusra van szükség a citotoxikus hatásuk növeléséhez.

Magát a kokultúra időtartamát és a hozzáadott zoledronsav koncentrációt előkísérletek elvégzése mellett optimalizáltam. Továbbá egy kontroll kísérletben vizsgáltam a zoledronsav hatását a MAF sejtekre annak érdekében, hogy megbizonyosodjak, hogy a megnövekedett apoptózis kizárólag a $\gamma\delta$ T-sejteknek köszönhető és ehhez nem járul hozzá önmagában a zoledronsav.

Az optimalizált öt napos $\gamma\delta$ T sejt-MAF kokultúra apoptózis esszét ezt követően elvégeztem különböző donorokból származó MAF sejtekkel (6. ábra). A $\gamma\delta$ T-sejtek ez esetben egyetlen egészséges donortól származtak, annak érdekében, hogy a MAF-ok apoptózisa közötti különbséget ne befolyásolja a $\gamma\delta$ T-sejtek donorok közötti eltérése. Egy-egy időpontban elvégzett esszében mindig csak egy donor $\gamma\delta$ T sejtjeit használtam fel, hogy csak a kokultúra MAF tagjai adhassanak donor különbségeket.

A zoledronsav stimulusból a kísérleti kondíciókban az 1 μM és 2,5 μM koncentrációkat hagytam meg. A korai apoptotikus populációk átlagosan 65 % felett voltak 1 μM , és közel 80%-ot értek el 2,5 μM zoledronsav mellett (6. ábra a rész) A késői apoptotikus populációk 10% körül voltak (6. ábra b rész) A MAF-ok mellett vizsgáltam a $\gamma\delta$ T-sejtek apoptózisát is korai és késői apoptotikus populációk elemzésével, melyek közül mindegyik 10% alatt volt (6. ábra c és d rész). A zoledronsavval stimulált kultúrákban szignifikánsan több korai apoptotikus $\gamma\delta$ T-sejtet detektáltam a nem-stimulált kontrollhoz képest.



6. ábra: Áramlási citometriai apoptózis esszé $\gamma\delta$ T-sejt-MAF kokultúrákban optimalizált kondíciókkal (5 nap kokultúra 1 μM és 2.5 μM zoledronsav stimulus mellett) (a) A korai apoptotikus (Annexin V+, 7AAD-) és (b) késői apoptotikus (Annexin V+, 7AAD+) MAF [CD73+; CD45-] százalékos értékei n=10. Kontrol: MAF monokultúra $\gamma\delta$ T-sejtek nélkül. (c) A korai apoptotikus (Annexin V+, 7AAD-) és késői apoptotikus (Annexin V+, 7AAD+) $\gamma\delta$ T-sejt populációk [CD45+; CD73-] százalékos értékei 5 nap MAF-okkal való kokultúrát követően. Kontrol: kokultúra stimulus nélküli $\gamma\delta$ T-sejtekkel. (e) Reprezentatív apoptotikus fibroblasztokat ábrázoló áramlási citometriai dot plotok (f) Reprezentatív apoptotikus $\gamma\delta$ T-sejteket ábrázoló áramlási citometriai dot plotok. A hibásávok az átlagokat \pm SD értékeket jelölik. . * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

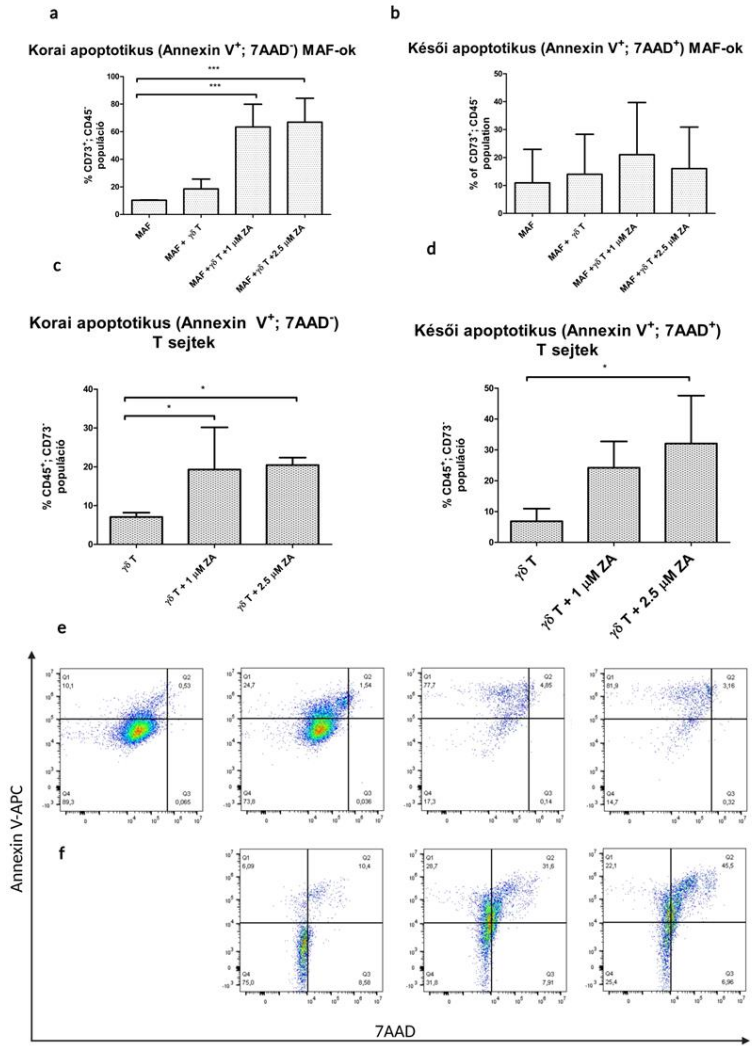
Tézis 2b: A $\gamma\delta$ T sejtek MHC-független módú target felismeréssel rendelkeznek. Ennek igazolásaképp melanóma kórtörténettel rendelkező páciensek perifériás $\gamma\delta$ T sejtjei szintén képesek a MAF-ok apoptózis indukciójára.

A $\gamma\delta$ T-sejtek MHC-független ligand felismerési tulajdonsága miatt potenciális eszközei lehetnek az autológ és allogén sejterápiáknak. Ezért kísérleteim nagy részében egészségesekből származó $\gamma\delta$ T-sejteket használtam. Azonban az autológ $\gamma\delta$ T sejtés terápia, illetve a zoledronsav terápia lehetőségét is szem előtt tartva, fontosnak tartottam megvizsgálni a melanómás páciensekből származó $\gamma\delta$ T-sejtek citotoxikus hatását. Korábban izolált és biobankunkban szereplő két donortól származó MAF sejteket használtam a $\gamma\delta$ T sejt-MAF kokultúra apoptózis esszé megismétlésére. A donorok esetében vénás vérből izoláltam PBMC-eket és zoledronsav segítségével expandáltam és szeparáltam a $\gamma\delta$ T-sejteket.

A stimulus nélkül a $\gamma\delta$ T-sejtek nem indukáltak apoptózist MAF-okban, azonban 1 és 2,5 μM zoledronsav és IL-2 stimulust követően szignifikánsan magasabb korai apoptotikus populációk voltak detektálhatóak (7. ábra a rész). Ezzel a kísérleti beállítással demonstráltam, hogy a $\gamma\delta$ T-sejtek citotoxikus hatása érvényesül MHC azonos target sejt esetén, tehát MHC független módon is.

A melanómás páciensektől származó $\gamma\delta$ T-sejt-MAF kokultúrában a $\gamma\delta$ T-sejtek nagyobb mértékben apoptotizáltak az egészséges önkéntesek $\gamma\delta$ T-sejtjei képest a MAF kokultúrákban. A proliferáltatott PBMC-ből való $\gamma\delta$ T-sejt izolálás során tapasztaltam, hogy kevesebb számú $\gamma\delta$ T-sejt volt

kinyerhető. Mivel a $\gamma\delta$ T-sejtek expansziós kapacitása nagymértékben függ a donorok egyéni tulajdonságaitól, a kisszámú melanómás $\gamma\delta$ T-sejt donor miatt ezt a megfigyelést egyelőre nem tudtuk további vizsgálatokkal megerősíteni [3], [4].



7. ábra: $\gamma\delta$ T-sejt és MAF interakció melanómás páciensekből származó sejtekkel. Az ábra kísérleti beállításában a biobankolt MAF sejteket páciensekből származó frissen izolált $\gamma\delta$ T-sejtekkel párosítottuk az apoptózis esszéiben. (a) Korai (Annexin V+; 7AAD-) és (b) késői apoptotikus MAF (Annexin V+ 7AAD+) [CD73+, CD45-] populációk. (c) Korai (Annexin V+; 7AAD-) és (d) késői (Annexin V+ 7AAD+) apoptotikus $\gamma\delta$ T-sejt [CD45+, CD73-] populációk. (e) Reprezentatív apoptotikus fibroblasztokat ábrázoló áramlási citometriai dot plotok (f) Reprezentatív apoptotikus $\gamma\delta$ T-sejteket ábrázoló áramlási citometriai dot plotok

Tézis 2c: A $\gamma\delta$ T sejtek és MAF-ok interakciójában hasonlóan azok a molekulák játszanak szerepet, melyeket korábban tumor sejt és $\gamma\delta$ T sejt interakciókban azonosítottak

A $\gamma\delta$ T-sejtek által a MAF-okra kifejtett citotoxikus hatás molekuláris hátterének vizsgálatához a $\gamma\delta$ T-sejt fő receptorainak ($\gamma\delta$ TCR, NKG2D) cél molekuláit mRNS szinten MAF-okban reverz transzkripció és kvantitatív PCR segítségével elemeztem. Ezt követően a génextpresszió mRNS szintjén vizsgált molekulák közül a BTN3A1 $\gamma\delta$ TCR targetet fehérje szinten is szerettem volna vizsgálni, illetve felderíteni, hogy milyen mértékben befolyásolja az apoptózist olyan sejtes kokultúrákban, ahol a BTN3A1 fehérje szintje alacsony, és ahol magas.

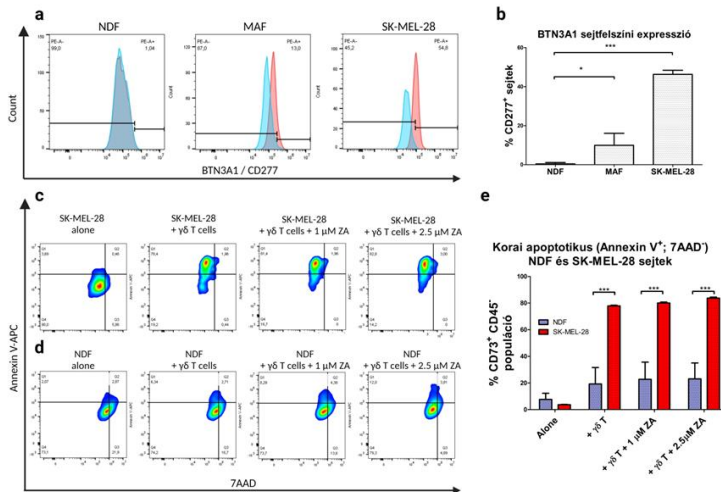
Fehérje szinten az SK-MEL-28 melanóma sejtek expresszálták a BTN3A1 molekulát a legnagyobb mértékben, az analizált populáció több, mint 50%-os pozitivitást mutatott a jelöletlen SK-MEL-28 kontrollhoz képest (8. ábra a rész). A MAF-ok átlagosan 10% feletti pozitivitást mutattak a jelöletlen MAF kontroll mintához képest (8. ábra a rész). Így mindkét sejttypusban szignifikánsan magasabb BTN3A1 expresszió volt detektálható az NDF sejtekhez képest, ahol alig volt detektálható a BTN3A1 sejtfelszíni jelenléte.

Az áramlási citometriai BTN3A1 sejtfelszíni mérések alapján az NDF sejteket nagyon alacsony, míg az SK-MEL-28 melanóma sejt vonalat magas BTN3A1 expressziójú kategóriába soroltam. Megismételtük az öt napos áramlási citometriai apoptózis esszét $\gamma\delta$ T-sejtekkel és SK-MEL-28, vagy NDF sejtekkel, ahol a kokultúra kondíciói megegyeztek a korábbi kondíciókkal.

NDF sejtek esetében a stimulus nélküli $\gamma\delta$ T-sejtek nem okoztak szignifikáns növekedést a korai apoptotikus (Annexin V+, 7AAD-) populációkban (8. ábra e rész). Továbbá az 1 és 2,5 μM zoledronsav és 100 IU/mL IL-2 nem indukált nagyobb mértékű apoptózist az NDF sejtek esetében, mint a $\gamma\delta$ T sejtek zoledronsav kezelés nélkül.

A MAF-okkal végzett apoptózis esszékkal szemben az SK-MEL-28- $\gamma\delta$ T kokultúrában a stimulus-nélküli $\gamma\delta$ T-sejt-SK-MEL-28 kísérleti beállításnál szignifikánsan magasabb volt a korai apoptotikus populáció az egyedüli SK-MEL-28 kontrollhoz képest (8. ábra e rész). Emellett az 1 és 2,5 μM zoledronsav nem növelte a korai apoptotikus populációkat SK-MEL-28 sejtek esetében, hanem hasonló módon 80% apoptotikus sejtet eredményezett. A MAF- $\gamma\delta$ T-sejt kokultúrában (6. ábra és 7. ábra) nem tapasztaltam azt, hogy a zoledronsav hozzáadása elhanyagolható lenne, így azt a következtetést vontuk le, hogy a magas BTN3A1 expressziójú sejtek esetében a $\gamma\delta$ T-sejtek potens citotoxikus hatással rendelkeznek.

Mivel a nagyon alacsony BTN3A1 szintet mutató NDF sejtekre nem volt szignifikáns hatással a $\gamma\delta$ T-sejtek citotoxikus aktivitása, ezzel szemben a magasabb BTN3A1 expressziójú MAF-okra és a melanóma sejtvonalra (SK-MEL-28) viszont igen, megerősítette azt, hogy minél nagyobb a BTN3A1 molekula sejtfelszíni expressziója a target sejten annál nagyobb az apoptózis mértéke.



8. ábra: BTN3A1 expresszió és $\gamma\delta$ T-sejt indukált apoptózis fibroblasztokban és SK-MEL-28 sejteken. (a) Repreratív histogramjai a BTN3A1 expresszióknak NDF (n=3), MAF (n=3) és SK-MEL-28 sejteken. (b) BTN3A1 expresszió fibroblasztokon és SK-MEL-28 sejtvonalon. (c) Korai (Annexin V⁺; 7AAD⁻) és késői (Annexin V⁺; 7AAD⁺) apoptotikus SK-MEL-28 populációk repreratív denzitás plotjai. (d) Korai (Annexin V⁺; 7AAD⁻) és késői (Annexin V⁺; 7AAD⁺) apoptotikus NDF populációk (n=3) repreratív denzitás plotjai. (e) Korai (Annexin V⁺; 7AAD⁻) és késői (Annexin V⁺; 7AAD⁺) apoptotikus NDF és SK-MEL-28 populációk [CD73⁺, CD45⁻] százalékos értékei 5 nap kokultúra után zoledronsav stimulált $\gamma\delta$ T-sejtekkel. A hibaszávok az átlag értékeket jelölik \pm SD. * p < 0.05 ** p < 0.01 and *** p < 0.001

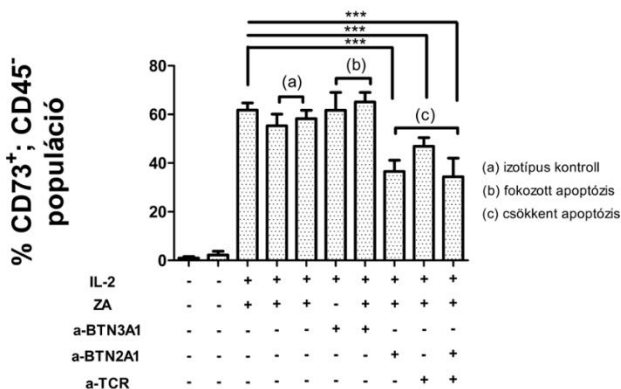
A $\gamma\delta$ T-sejt és MAF interakció részletesebb, molekuláris szintű megismeréséhez módosítva megismételtem az eredeti apoptózis esszétet. Feltételezéseim alapján a MAF-ok apoptózisához hozzájárulnak azok a molekulák, melyeket korábban a $\gamma\delta$ T-sejtek és tumorsejtek

interakciójában azonosítottak [5], [6]. Ehhez a stimulus nélküli és az 1-2,5 μM zoledronsavval stimulált $\gamma\delta$ T-sejt-MAF kondíciók mellett bevezettem olyan kísérleti beállításokat is, ahol a kokultúra butirofilineket és/vagy $\gamma\delta$ TCR-t célzó antitesteket is tartalmazott. Egy stimuláló hatású ($\gamma\delta$ T-sejt citotoxikus hatást növelő) anti-BTN3A1 (20.1 klón) antitestet alkalmaztam 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ koncentrációban zoledronsav nélkül és zoledronsav mellett, arra a kérdésre keresve a választ, hogy képes-e növelni a korai apoptotikus populációt MAF-okban [7]–[9].

Az apoptózis gátlása anti-TCR $\gamma\delta$ és anti-BTN2A1 antitestekkel és a korábbi BTN3A1 sejtfelszíni jelenléttel kapcsolatos eredményeim alátámasztották, hogy az apoptózis kiváltásában a $\gamma\delta\text{TCR}$ –BTN2A1–BTN3A1 tengely a fő faktor.

Az, hogy az apoptózis gátlása anti-TCR $\gamma\delta$ és anti-BTN2A1 antitestekkel csak részleges csökkenést eredményezett azt mutatja, hogy más molekuláknak is (pl: NKG2D-MICA/MICB/ULBP kapcsolat) szerepe lehet ebben az interakcióban.

Korai apoptotikus (Annexin V⁺; 7AAD⁻) MAF-ok



9. ábra: $\gamma\delta$ T-sejt és MAF interakció vizsgálata különböző $\gamma\delta$ TCR target molekulák célzó antitestek jelenléte mellett: BTN2A1 gátlás anti-BTN2A1 antitesttel, $\gamma\delta$ T-sejt receptor blokkolás anti- $\gamma\delta$ TCR (B1 klón) antitesttel, BTN3A1 stimuláció CD277/BTN3A1 monoklonális antitesttel (20.1 klón) egér IgGk1 isotipus kontroll és nyúl IgG isotipus kontroll mellett. A hibasávok az átlag értékeket mutatják \pm SD. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

A kísérleti eredményeim alapján feltehető, hogy a tumorsejtekben lezajló folyamathoz hasonlóan a zoledronsav hozzájárul az IPP felhalmozódáshoz MAF-okban, majd az IPP kötődik a BTN3A1 molekula intracelluláris részéhez. Ez konformációváltozást előidézve lehetővé teszi, hogy kapcsolódjon az intracelluláris B30.2 doménejeiken keresztül a BTN2A1 molekulához. Az aktív konformáció így közreműködik abban, hogy a $\gamma\delta$ T-sejt V γ 9 lánc (a CDR2 és CDR3 régiók között) kötődni tudjon a BTN2A1-hez, aktiválva így a $\gamma\delta$ T-sejt citotoxikus funkcióját, képessé téve a $\gamma\delta$ T-sejteket a MAF-ok apoptózisának indukálására. Fontos megjegyezni, hogy a BTN3A1 kötő partnerét a $\gamma\delta$ T-sejten nem ismerjük,

de feltételeznek egy ligandot, amely a $\gamma\delta$ TCR CDR3 régióját és a BTN3A1-et kapcsolja össze.

4. Következtetések

A melanóma tumor mikrokörnyezetében a MAF-oknak kitüntetett szerepe van a tumor növekedésének és az intratumorális immun mechanizmusok befolyásolásában, valamint a helyi áttétképződésben[10]. Mivel ismert, hogy a MAF-ok képesek gátolni a tumorba bejutó CD8 T-sejteket és NK-sejteket, a kutatásaim során egy másik immunsejt populációval a makrofágokkal való kölcsönhatásukat vizsgáltam. A klasszikus M1-M2 makrofág polarizáció régóta ismert jelenség [11]. A tumor mikrokörnyezetében azonban a két fenotípus homogén populációja ritkán figyelhető meg. Ehelyett a makrofágok heterogén populációinak keveréke található meg, folyamatos átmenetben az M1 és M2 állapotok között. A két makrofág típus citokin termelésének és együttes immunszuppresszív hatásának vizsgálata kihívást jelent, azonban egyes citokinek szintje utalhat a tumor azon tulajdonságára, hogy milyen mértékben befolyásolja az anti-tumor immunválaszt. Az IL-10 kiemelkedő jelentőséggel bír az immunszuppresszív citokinek közül [12]. Különböző daganatokban a TAM-ok IL-10 citokin termelése korrelál a betegség kedvezőtlen prognózisával és az alacsony túlélési aránnyal [13], [14]. Mindemellett a tumoron belüli IL-10 szekréció kapcsolatban áll a primer melanóma áttét képző képességével [13], [15]. Tekintettel a MAF-ok és MSC-k immunszuppresszív hasonlóságaira, vizsgálataim során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy, hogyan befolyásolják a MAF-ok a makrofágok IL-10 szekrécióját.

Kutatási célom továbbá annak a kérdésnek a megválaszolására irányult, hogy a már több, mint tizenöt éve gyógyszerként elfogadott, és egyébként a $\gamma\delta$ T-sejtek *ex vivo* proliferáltatására is használt zoledronsav alkalmazható-e *in vitro* modellben $\gamma\delta$ T-sejtek aktiválására, és a MAF-ok eliminálására. Kísérleteim során a MAF-ok apoptózisa $\gamma\delta$ T-sejteken

keresztül kimutatható volt, továbbá MAF-ok esetében is azonosítottuk azokat a butirofilin molekulákat, melyek korábban a $\gamma\delta$ T-sejtek és tumorsejtek interakciójában mutattak be.

Úgy vélem, hogy a kutatásaim adatai hozzájárulnak a melanóma TME részletesebb megismeréséhez, illetve további kutatások kezdeményezéséhez mind a MAF immunszuppresszív hatásának vizsgálata terén, mind a $\gamma\delta$ T-sejtek terápiás felhasználásának területén. Emellett ezeknek a stratégiáknak a továbbfejlesztése ígéretes eredményekkel szolgálhat az agresszív szolid tumorok gyógyításában.

5. Tézishez köthető publikációk és közlemények

Çakır Uğur, Hajdara Anna, Széky Balázs, Mayer Balázs, Kárpáti Sarolta, Mezey Éva, Silló Pálma, Szakács Gergely, Füredi András, Pócs Zoltán, Érsek Barbara, Sárdy Miklós, Németh Krisztián (2021) Mesenchymal-Stromal Cell-like Melanoma-Associated Fibroblasts Increase IL-10 Production by Macrophages in a Cyclooxygenase/Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent Manner, *Cancers*, 13 : 24 Paper: 6173 , 22 p (IF: 5,2)

Hajdara Anna, Çakır Uğur, Érsek Barbara, Silló Pálma, Széky Balázs, Barna Gábor, Shaaban Faqi, Gyöngy Miklós, Kárpáti Sarolta, Mayer Balázs (2023) Targeting Melanoma-Associated Fibroblasts (MAFs) with Activated $\gamma\delta$ (V δ 2) T Cells: An In Vitro Cytotoxicity Model, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 : 16 p. 12893 (IF: 5,6)

Hajdara Anna, Çakır Uğur, Érsek Barbara, Silló Pálma, Széky Balázs, Barna Gábor, Faqi Shaaban, Kárpáti Sarolta, Németh Krisztián és Mayer Balázs (2023) Zoledronic acid activated Gamma Delta T cells Induce Apoptosis in Melanoma-Associated Fibroblasts; A Magyar Immunológiai Társaság 52. Vándorgyűlése, Kecskemét

6. A szerző egyéb publikáció és tudományos közleményei

Ren Jiaqiang, Szombath Gergely, Vitale-Cross Lynn, Stroncek F. David, Robey G. Pamela, Hajdara Anna, Szalayova Ildikó, Mayer Balázs, Martin Daniel, Mezey Éva, Németh Krisztián (2023) The Potential Use of THP-1, a Monocytic Leukemia Cell Line, to Predict Immune-Suppressive Potency of Human Bone-Marrow Stromal Cells (BMSCs) In Vitro: A Pilot Study, *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (17) : 13258 (IF: 5,6)

Széky Balázs, Mayer Balázs, Gyöngy Miklós, Hajdara Anna, Barsi Szilvia, Kárpáti Sarolta, Németh Krisztián (2021) Tri-Lineage Differentiation of NTERA2 Clone D1 Cells towards Neural, Hepatic and Osteogenic Lineages In Vitro, Folia Biologica 67 : 5-6 pp. 174-182. , 9 p (IF: 0,6)

Hajdara Anna, Megyeri Márton, Brunyánszki Attila, Szöőr Árpád, Hornyák Péter, Murányi József, Péterfi Zalán, Tóvári József, Farkas Sándor (2023) Chlorotoxin Analogue Targeted CAR-T Therapy Against Glioblastoma Multiforme; Immuno-Oncology Summit Europe, London

Brunyánszki Attila, Hajdara Anna, Szöőr Árpád, Hornyák Péter, Murányi József, Tóvári József, Péterfi Zalán, Farkas Sándor, Megyeri Márton (2023) Chlorotoxin Analogue Targeted CAR-T Therapy Against Glioblastoma Multiforme; Magyar Immunológiai Társaság 52. Vándorgyűlése, Kecskemét

Szekér Patrik, Hajdara Anna, Rácz Gábor, Murányi József, Csóti Ágota, Ngo Hanh Nikoletta, Megyeri Márton, Kitka Tamás, Kovács Péter, Brunyánszki Attila, Kemény Ágnes, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna, Gyöngyösi Norbert, Panyi György, Farkas Sándor, Péterfi Zalán, Hornyák Péter (2023) Developing Selective Kv1.3 Inhibitors for the Treatment of Autoimmune Diseases; Magyar Immunológiai Társaság 52. Vándorgyűlése, Kecskemét

7. Irodalomjegyzék

- [1] Y. Zhao *et al.*, “Stromal cells in the tumor microenvironment: accomplices of tumor progression?”, doi: 10.1038/s41419-023-06110-6.
- [2] M. M. Nielsen, D. A. Witherden, and W. L. Havran, “ $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues,” *Nat Rev Immunol*, vol. 17, no. 12, pp. 733–745, Dec. 2017, doi: 10.1038/NRI.2017.101.
- [3] H. C. Jonus *et al.*, “Dissecting the cellular components of ex vivo $\gamma\delta$ T cell expansions to optimize selection of potent cell therapy donors for neuroblastoma immunotherapy trials,” *Oncoimmunology*, vol. 11, no. 1, 2022, doi: 10.1080/2162402X.2022.2057012.
- [4] R. E. Burnham *et al.*, “Characterization of Donor Variability for $\gamma\delta$ T Cell ex vivo Expansion and Development of an Allogeneic $\gamma\delta$ T Cell Immunotherapy,” *Front Med (Lausanne)*, vol. 7, Nov. 2020, doi: 10.3389/FMED.2020.588453.
- [5] D. Okuno *et al.*, “Comparison of a Novel Bisphosphonate Prodrug and Zoledronic Acid in the Induction of Cytotoxicity in Human V γ 2V δ 2 T Cells,” *Front Immunol*, vol. 11, Jul. 2020, doi: 10.3389/FIMMU.2020.01405.
- [6] H. Mönkkönen, P. D. Ottewell, J. Kuokkanen, J. Mönkkönen, S. Auriola, and I. Holen, “Zoledronic acid-

- induced IPP/Apppl production in vivo," *Life Sci*, vol. 81, no. 13, pp. 1066–1070, Sep. 2007, doi: 10.1016/J.LFS.2007.08.007.
- [7] H. Wang *et al.*, "Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human V γ 2V δ 2 T cells," *J Immunol*, vol. 191, no. 3, pp. 1029–1042, Aug. 2013, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1300658.
- [8] C. Harly *et al.*, "Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset," *Blood*, vol. 120, no. 11, pp. 2269–2279, Sep. 2012, doi: 10.1182/BLOOD-2012-05-430470.
- [9] L. Starick *et al.*, "Butyrophilin 3A (BTN3A, CD277)-specific antibody 20.1 differentially activates V γ 9V δ 2 TCR clonotypes and interferes with phosphoantigen activation," *Eur J Immunol*, vol. 47, no. 6, pp. 982–992, Jun. 2017, doi: 10.1002/EJI.201646818.
- [10] V. Romano *et al.*, "Influence of Tumor Microenvironment and Fibroblast Population Plasticity on Melanoma Growth, Therapy Resistance and Immunoescape," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 10, May 2021, doi: 10.3390/IJMS22105283.
- [11] M. A, S. A, and L. M, "Macrophage polarization comes of age," *Immunity*, vol. 23, no. 4, pp. 344–346, Oct. 2005, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2005.10.001.

- [12] E. Itakura, R. R. Huang, D. R. Wen, E. Paul, P. H. Wünsch, and A. J. Cochran, "IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence," *Modern Pathology*, vol. 24, no. 6, pp. 801–809, Jun. 2011, doi: 10.1038/modpathol.2011.5.
- [13] J. Nemunaitis, T. Fong, P. Shabe, D. Martineau, and D. Ando, "Comparison of serum interleukin-10 (il-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma," *Cancer Invest*, vol. 19, no. 3, pp. 239–247, 2001, doi: 10.1081/CNV-100102550.
- [14] S. S *et al.*, "Regulation of TNFalpha and interleukin-10 production by prostaglandins I(2) and E(2): studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists," *Biochem Pharmacol*, vol. 61, no. 9, pp. 1153–1160, May 2001, doi: 10.1016/S0006-2952(01)00586-X.
- [15] W. Dummer, J. C. Becker, A. Schwaaf, M. Leverkus, T. Moll, and E. B. Bröcker, "Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma," *Melanoma Res*, vol. 5, no. 1, pp. 67–68, 1995, doi: 10.1097/00008390-199502000-00008.