

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Biokémia, Biofizika, Molekuláris és Sejtbiológia PhD Program



Ph.D. Tézis

**Immensejt populációk vizsgálata: egy lektin-alapú
szkennelési módszer**

Faragó Anna

Témavezetők:
Dr. Szebeni Gábor János
Dr. habil. Puskás László Géza
2024.

PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

A doktori disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

- I. Farago, A., A. Zvara, L. Tiszlavicz, E. Hunyadi-Gulyas, Z. Darula, Z. Hegedus, E. Szabo, S. E. Surguta, J. Tovari, L. G. Puskas and G. J. Szebeni (2024). "Lectin-Based Immunophenotyping and Whole Proteomic Profiling of CT-26 Colon Carcinoma Murine Model." *Int J Mol Sci* 25(7).
IF: 5.6 (Q1)

- II. Szabó, E., A. Faragó, G. Bodor, N. Gémes, L. G. Puskás, L. Kovács and G. J. Szebeni (2024). "Identification of immune subsets with distinct lectin binding signatures using multi-parameter flow cytometry: correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus." *Frontiers in Immunology* 15.
IF: 7.3 (Q1)

A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikáció:

- I. Szabo, E., S. Modok, B. Ronaszeki, A. Farago, N. Gemes, L. I. Nagy, L. Hackler, Jr., K. Farkas, P. Neuperger, J. A. Balog, A. Balog, L. G. Puskas and G. J. Szebeni (2023). "Comparison of humoral and cellular immune responses in hematologic diseases following completed vaccination protocol with BBIBP-CorV, or AZD1222, or BNT162b2 vaccines against SARS-CoV-2." *Front Med (Lausanne)* 10: 1176168.
IF: 3.9 (Q1)

RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

AAL	<i>Aurelia aurentia</i> lektin
ACA	<i>Amaranthus caudatus</i> agglutinin
AHA	<i>Arachis hypogea</i> agglutinin
AFP-L3	alfa-fetoprotein-L3
AIA	<i>Artocarpus integrifolia</i> agglutinin
Asn	aszparagin
BCR	B-sejt receptor
Gal	galektin
CA125	szénhidrát antigén 125
CRC	vastagbélrák
DNT	duplán negatív T-sejtek
DolP	dolichol foszfát
DPT	duplán pozitív T-sejtek
ER -	endoplazmatikus retikulum
Gal -	galaktóz
GalNAc -	N-acetil-galaktózamin
Glc -	glükóz
GlcNAc -	N-acetil-glükózamin
GPI -	glikozil-foszfatidil-inozitol
GSA I -	<i>Griffonia simplicifolia</i> agglutinin I
HC -	egészséges kontroll
HCC -	hepatocelluláris karcinóma
HE4 -	emberi mellékhere fehérje 4
IdoA -	iduronsav
LacNAc -	N-acetil-laktózamin
LCA -	<i>Lens culinaris</i> lektin
MAA -	<i>Maackia amurensis</i> lektin
Man -	manóz
MO -	monociták
NKT -	természetes ölősejtek
NSCLC -	nem kissejtes tüdőrák
OST -	oligoszacharil-transzferáz
PBMC -	perifériás vér mononukleáris sejtek
PD-1 -	programozott sejthalál receptor-1
Pro -	prolin
PSA -	<i>Pisum sativum</i> lektin
PWM -	<i>Phytolacca americana</i> lektin
SNA -	<i>Sambucus nigra</i> lektin
Gal1 -	galektin-1
Gal3 -	galektin-3
RBC -	vörösvérsejt
FUT -	fukozil-transzferáz
Ser -	szerin
SigI -	Siglec-1
SLE -	szisztémás lupus erythematosus
STn -	szialil-Thomsen-nouveau antigén
TCR -	T-sejt receptor
Tg -	tiroglobulin
Thr -	treonin
Tn -	Thomsen-nouveau antigén
UEA I -	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin I
WFA -	<i>Wisteria floribunda</i> agglutinin
Xyl -	xilóz

BEVEZETÉS

A glikoziláció során cukormolekulák, mint például az összetett glikán láncok vagy az egyedi cukor molekulák kovalensen kapcsolódnak különböző szerves molekulákhoz. Ezek a szénhidrát-láncok összetételükben és mennyiségükben is különbözőek lehetnek, létrehozva így az egyedi sejt- és szövet-specifikus glikán kódot. Az összetett glikán kód felépülését az intracelluláris környezet befolyásolja. Mivel a glikoziláció fontos szerepet játszik az alapvető biológiai folyamatokban, így a glikán kód megváltozása modulálhatja az egyes immunválaszokat. A glikozilációs mintázatok tanulmányozása fontos információkat nyújthat a betegségek molekuláris mechanizmusairól, illetve potenciális célpontokat kínálhat terápiás beavatkozásokhoz. Hozzájárulhat különböző diagnosztikai eszközök fejlesztéséhez és a személyre szabott orvoslás kialakításához. Az különböző betegségekben bekövetkező glikozilációs változások minél szélesebb körű ismerete emiatt kiemelten fontos.

A lektinek olyan fehérjék, amelyek képesek szelektíven felismerni a szénhidrát-láncokat és reverzibilisen megkötni azokat. A magas szelektív kötődési képességüknek köszönhetően a lektinek alkalmazhatók egyedi szénhidrát-láncok vizsgálatához. Munkánk során egy fluoreszcens festékkel jelölt lektin alapú többparaméteres áramlási citometriás panelt állítottunk össze az immunsejtek glikán kódjának megismeréséhez. Az egyedi szénhidrát kötő lektineket különböző fluoreszcens festékekkel jelöltük, lehetővé téve ezzel többféle glikozilációs mintázat párhuzamos vizsgálatát.

A glikán kódban történő változások kifejezetten jelentősek azokban a betegségekben, ahol az immunrendszer túlzottan aktív, vagy pedig nagymértékben elnyomott. Így egyes autoimmun betegségek, illetve tumor-asszociált állapotok segíthetnek a megváltozott glikozilációs mintázatok szerepének megértésében. A CT26 egy mutációkban gazdag egér vastagbélrák sejtvonala, amely egy gyakran használt preklinikai modell. Jelenlegi munkánk során CT26 sejteket oltottunk BALB/c egerek lépébe egy vastagbélrák modell létrehozásához. A másik betegség, amit a glikozilációs mintázat vizsgálatához választottunk a humán szisztémás lupus erythematosus (SLE) amely egy az immunrendszer rendkívül túlzott aktivitásával jellemző autoimmun betegség.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során célom az volt, hogy a daganatokhoz kapcsolódó és autoimmun állapotokban bekövetkező glikozilációs változásokat vizsgáljam egy glikán kód mintázaton alapuló technológiát felhasználva. Ennek érdekében különböző fluoreszcens festékekkel jelölt lektin alapú többszínű áramlási citometriai protokoll kidolgozása volt a célom.

1. cél: A lektinek specifikus felismerési és kötődési képességeit kihasználva megismerni az egyes sejtek felszíni glikozilációs mintázatát, így

- **létrehozni egy fluoreszcens festékkel jelölt lektin alapú többszínű áramlási citometriás panelt, és optimalizálni azt.**

2. cél: Az immunrendszer működésében bekövetkező változások fontos szerepet játszanak a rák előrehaladásában, azonban az immunsejtek felszíni glikozilációs szerepe még nem teljesen tisztázott a tumoros állapotokban. Ezért célom volt

- **megvizsgálni a különböző immunsejt populációk felszíni glikozilációs változásait az egér CT26 által kiváltott vastagbélrák modellben, különös tekintettel a szialilációra és fukozilációra.**

3. cél: Azok az enzimek, amelyek felelősek a glikozilációs mintázatok kialakításáért fontos szerepet játszhatnak a rákkal kapcsolatos immunrendszeri folyamatokban is, ezért további célom volt

- **teljes proteomikai analízist végezni a vastagbélrák által kiváltott primer lép és áttétes máj tumorokon, különös figyelmet szentelve a glikozilációban részt vevő enzimekre.**

4. cél: Az autoimmun betegségek az immunrendszer szabályozásának ellenkező végét képviselik, ahol az immunrendszer inkább túlreagál a szupresszió helyett. Így célom volt

- **megvizsgálni szisztémás lupus erythematosusban szenvedő páciensek immunsejt populációinak glikozilációs mintázatát a kifejlesztett lektin alapú áramlási citometriai panel segítségével.**

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok

Az egereket steril körülmények között tartottuk Makrolon® ketrecekben 22–24 °C-on (40–50% páratartalom), 12/12 óra világosság/sötétség szabályozással. Az állatoknak szabad hozzáférésük volt a vízhez és a sterilizált standard ételhez (VRF1, autoklávozható, Akronom Kft., Budapest, Magyarország). A vizsgálatban felhasznált állatokat a „Guiding Principles for the Care and Use of Animals” alapján gondozták, amelyek a Helsinki Nyilatkozatra épülnek, és jóváhagyásra kerültek az Országos Onkológiai Intézet etikai bizottsága által. Az állatok tartása az Európai Parlament és az Európai Unió Tanácsának 2010/63/EU irányelvének és ajánlásainak megfelelően történt az állatok védelméről tudományos célokra történő felhasználására vonatkozóan. A laboratóriumi állatok tenyésztéséhez és kísérletek végrehajtásához az engedélyszám: PEI/001/1738-3/2015 és PE/EA/1461-7/2020.

Szövetkultúra

A CT26 sejteket az ATCC-től szereztük be, és RPMI-1640 tápoldatban (BioSera, Boussens, Franciaország), 10% FBS szérummal (BioSera, Boussens, Franciaország) és 1% penicillin/streptomycin-el (BioSera, Boussens, Franciaország) kiegészítve T75 sejt kultúra palackokban szellőző sapkákkal (Sarstedt, Nümbrecht, Németország), szabályozott 5% CO² mellett 37 °C-on tartottuk. A sejteket legfeljebb 25 passzálsig vagy 60 napig tartottuk fent az olvasztást követően. A sejtek rendszeresen szűrve voltak mycoplasma fertőzésre.

Lépbeoltás

Az sejtuszpenziókat CT26 monolayer kultúrákból készítettük, PBS (BioSera, Boussens, Franciaország) oldattal mostuk le, majd Medium 199-ben (Lonza) hígítottuk. 2×10^3 tumorsejtet fecskendeztünk (50 μ L végtérfogatban) a felnőtt hím BALB/c egerek lépébe, ahonnan áttétes kolóniák alakultak ki a májban. Altatás után a bőrt leborotváltuk, majd etilalkoholos törülközővel megtisztítottuk. Ezután egy 6-8 mm-es bemetszést végeztünk a lép mellett (bal oldali bemetszés, kb. 2 cm-rel a hasi középvonal baloldalán). A lépét óvatosan kihúztuk a hasüregből, majd befecskendeztük a sejtuszpenziót a lép alsó harmadába. Ezután a lépét óvatosan visszahelyeztük, majd a hasfalat és a bőrt sebészi úton lezártuk. A kezelt állatokat a 22. napon dolgoztuk fel. A daganatokat makroszkópicusan értékeltük az immunhisztokémiai vizsgálat előtt.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiát (IHC) a korábban leírt módon, némi módosítással (Neuperger et al., 2021; Puskás et al., 2016) végeztük. Röviden, az egereket 22 napos feláldoztuk. A májakat és a lépeket eltávolították, majd 4%-os formalinban egy éjszakán át fixáltuk, ezután paraffinba ágyasztuk és 3 µm-es vastagságú szakaszokra vágtuk Rotary mikrotómmal (RM2235, Leica). Az IHC-t Leica BOND-MAX immunohisztokémiai gépen végezték. Az IHC-hez használt elsődleges antitestek a következők voltak: anti-argináz 1 (GenomeMe, IHC400-100, 1:800), anti-CD45 antitest (Biocare, CM016B, 1:200), anti-CDX2 antitest (Cellmarque, 235R-15, 1:200), anti-pan-cytokeratin antitest (Cellmarque, 313M-14, 1:600), anti-vimentin antitest (Novocastra, NCL-L-VIM-V9, 1:500) egy éjszakás inkubációval. A festékrendszerben (Bond Polymer Refine Detection, DS9800, Leica) a másodlagos antitestet, lóreték peroxidázzal volt jelölve (HRP), és DAB-3 (3'-diaminobenzidin) volt a kromogén a detektálásához. Hematoxilint (készletben kapható, Leica) használtunk kontrasztfestéshez. A Zeiss Axio Imager Z1 mikroszkópot (okulár 10×, objektívek 10×, 40×), a Zeiss AxioCam MRm kamerával és AzioVision SE64 4.9.1 szoftverrel (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) használtuk a vizualizációhoz.

Perifériás fehérvérsejt izoláció

A leukocitákat a korábban leírtak szerint izoláltuk (Balog et al., 2019). Röviden, a vért frissen vettük szívpunkcióval egerekből. A kezelt EDTA-tartalmú teljes vért 400 x g-on 10 percig centrifugáltuk, majd eltávolították a felülúszót. A vörösvérsejtek lizálását 5 ml ACK pufferrel (0,155 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,3, GIBCO, Cat. A1049201, Thermo Fischer Scientific, New York, USA) végeztük szobahőmérsékleten 5 percig. A mintákat 70 µm-es pórusméretű sejtszűrőre helyeztük, és kétszer 10 ml PBS-sel mostuk. Ezután a sejteket 12 × 75 mm-es FACS csövekbe pipettáztuk (VWR International, Pennsylvania, USA), majd 100 µL festéshez használt oldatba hígítottuk (PBS 1% FBS-sel, GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK, és 0,1% nátrium-azid, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

Lépejst izoláció

A lépeket frissen dolgoztuk fel a korábban már leírt protokoll szerint, kisebb módosításokkal (Kotogány et al., 2020). Röviden, miután a lépét homogenizáltuk és egy 100 µm-es sejtszűrőn átszűrtük (VWR, Radnoe, PA, USA) mostuk steril PBS-sel. Ezután 1400 rpm, 5 percig centrifugáltuk, majd a pelletet steril PBS-ben felszuszpendáltuk. A vörösvérsejt lizálást 5 ml ACK (0,155 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂ EDTA, pH 7,3, GIBCO, Cat. A1049201, Thermo Fischer Scientific, New York, USA) oldattal szobahőmérsékleten 5 percig végeztük. A mintákat 70 µm-es pórusméretű

sejtszűrőn újra átszűrtük és kétszer 20 ml PBS-sel mostuk. Ezután a sejteket 12 × 75 mm-es FACS csövekbe (VWR International, Pennsylvania, USA) pipettáztuk, majd 100 µL festésre használt oldatba (PBS 1% FBS-sel, GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK, és 0,1% nátrium-azid, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) hígítottuk.

Lectin labeling

For fluorescent labeling of lectins, conjugation kits (Lightning-Link, Abcam, Cambridge, US) were used according to the manufacturer's instructions. *Aleuria Aurantia* lectin (AAL, Cat. L-1390-2, Vector Laboratories, Newark, USA) was labeled with APC (ab201807, Lot.GR3388854-1), *Sambucus nigra* lectin (SNA, Cat. 21510104 Glycomatrix, Ohio, USA) was labeled with PE/Cy7 (ab102903, Lot. GR3390407-1), human sialoadhesin, Siglec-1/CD169 recombinant protein (Siglec-1, Cat. 5197SL050, Fischer Scientific, Massachusetts, USA) were labeled with PE/Texas Red (ab269899, Lot. GR3395603-2), galectin-1 (Gal1, Cat. 450-39, PreproTech, London, UK) was labeled with Alexa Fluor 488 (ab236553, Lot. GR3394511-1), galectin-3 (Gal3, 450-38, PreproTech, London, UK) was labeled with APC/Cy7 (ab102859, Lot. GR3396716-1), *Phytolacca americana* lectin (PWM, Cat. L8777, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) was labeled with Alexa Fluor 700 (ab269824, Lot. GR3393759-2) dye by the lectin amine groups. The list of the selected lectins for cytometry is listed in Table 3. Before experiments, we optimized the concentration of antibodies and labeled lectins by titration on a flow cytometer (C40313, CytoFLEX LX N3-V5-B3-Y5-R3-I0, Beckman Coulter, Indiana, USA).

Lectin jelölés

A lektinek fluoreszcens festékekkel való jelölése konjugáló kitékkel (Lightning-Link, Abcam, Cambridge, USA) történt a gyártó utasításai szerint. Az *Aleuria Aurantia* lektint (AAL, Cat. L-1390-2, Vector Laboratories, Newark, USA) APC-vel (ab201807, Lot.GR3388854-1) jelöltük, a *Sambucus nigra* lektint (SNA, Cat. 21510104 Glycomatrix, Ohio, USA) PE/Cy7-tel (ab102903, Lot. GR3390407-1) jelöltük, a humán sialoadhesin, Siglec-1/CD169 rekombináns fehérjét (Siglec-1, Cat. 5197SL050, Fischer Scientific, Massachusetts, USA) PE/Texas Red-del (ab269899, Lot. GR3395603-2) jelöltük, a galektin-1-et (Gal1, Cat. 450-39, PreproTech, London, UK) Alexa Fluor 488-al (ab236553, Lot. GR3394511-1) jelöltük, a galektin-3-at (Gal3, 450-38, PreproTech, London, UK) APC/Cy7-tel (ab102859, Lot. GR3396716-1) jelöltük, a *Phytolacca americana* lektint (PWM, Cat. L8777, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) pedig Alexa Fluor 700-zal (ab269824, Lot. GR3393759-2) jelölő fluoreszcens festékekkel jelöltük fel a fehérje amin-csoportjánál. A kísérletek

előtt antitestek és a jelölt lektinek koncentrációját titrációval optimalizáltuk áramlási citometriás készüléken (B75408, CytoFLEX S V4-B2-Y4-R3, Beckman Coulter, Indiana, USA).

Festés és áramlási citometria

A sejtfelszíni festés a csoportunk által már korábban leírt módon történt néhány módosítással (Honfi et al., 2022; Szebeni et al., 2022). Röviden, az extracelluláris festéshez az antitest- és lektin koktélt frissen izolált fehérvérsejtekhez adtuk 100 µL festéshez használt PBS oldatban (PBS, 1% FBS, Gibco, Life Technologies, Paisley, UK, 0,1% nátrium-azid, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). A fluoreszcens festékekkel jelölt lektinokat egészséges állatból származó leukocitákon 2,5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml és 0,1 µg/ml koncentrációban titráltuk. Az antitestkoktéll tartalmazta az eFluor 450 anti-egér CD3-at (Cat. 48-0032-82, Clone 17A2, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), a BV605 anti-egér CD11b-t (Cat. 101237, klón M1/70, BioLegend, San Diego, USA), a BV650 anti-egér CD19-et (Cat. 115541, klón 6D5, BioLegend, San Diego, USA), a PerCP/Cyanine5.5 anti-egér CD45-öt (Cat. 103132, Klón 30-F11) 80× hígításban, az AAL-t, Gall-et, Siglec-1-et 100× hígításban, az SNA-t 10× hígításban, a PWM-et, Gal3-at, HPA-t 5× hígításban és az életképességet biztosító eFluor 506-os festék 1000× hígításban (Cat. 65-0866-14, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). A sejteket 4°C-on 30 percig inkubáltuk. Minden antitestet a gyártó utasításai szerint használtunk. A sejteket 500 µL PBS-sel mostuk, majd 5 percig centrifugáltuk 500 g-vel. A sejteket 400 µL PEB-ben felfuszpendáltuk, és Cytoflex LX áramlási citométerrel (C40313, CytoFLEX LX N3-V5-B3-Y5-R3-I0, Beckman Coulter, Indiana, USA) vizsgáltuk, majd a CytExpert v.2.4.0.28 szoftverrel (Beckman Coulter, Indiana, USA) elemeztük a futásokat.

Proteomika

A proteomikai analízis a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, a HUN-REN SzBK és HCEMM kutató és szolgáltató proteomikai Kutatócsoportjában történt. A máj- és lépszövetmintákat 10% SDS/50 mM TEAB oldatban homogenizálták egy TissueLyser (Qiagen) segítségével. A kapott lizátumokat centrifugálták (14,000 fordulat percenként 10 percig), majd a felülúszó fehérjetartalmát a BCA koloriméteres módszerrel (Thermo Scientific) határozták meg, és 100 µg fehérjét emésztettek az S-Trap mini protokoll szerint (<https://protifi.com/pages/protocols>). Röviden, a fehérje diszulfid hidakat TCEP (Tris(2-karboxietil)foszfín) segítségével redukálták, és a szabad tiolszoportokat MMTS (S-metil metantioszulfonát) blokkolták, majd következett egy 2 órás emésztés tripszinnel (2,5 µg/minta) 47 °C-on. A kapott peptidkeverékeket leszárították, majd TMTpro 16plex izobarikus jelölőkkel (Thermo Scientific) látták el a gyártói protokoll szerint. A

mintákat 1:1 arányban kombinálták, majd a magas pH-jú fordított fázisú peptidfrakcionáló készlettel (Thermo Scientific) választották szét a gyártói protokoll szerint. A frakciókat összekeverték, hogy négy végső frakció (1+5, 2+6, 3+7, 4+8) keletkezzen, majd vákuumszártották és kb. 1 µg peptid mennyiséget töltöttek C18 EvoTips (Evosep) kromatográfiára LC-MS elemzéshez. A peptidjelek fordított fázisú szétválasztása egy Evosep One HPLC (Evosep) segítségével történt, alkalmazva a „15 SPD” 88 perces grádienset, majd SPS-MS3 adatgyűjtés történt egy Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Scientific) készülékkel, amely egy FAIMS Pro ionmobilitási eszközzel van felszerelve. Az adatokat két kompenzációs feszültséggel (-70 és -50 V) gyűjtötték az MS3 HCD spektrumokból. A magas felbontású MS3 adatok a legfeljebb 6 legnagyobb intenzitású töredékekből lettek generálva, amelyek egyszerre lettek izolálva minden CID MS2 töredékből, amelyet a lineáris ionsapban szereztek be.

A peptidazonosítást és a mennyiségi meghatározást a Proteome Discoverer szoftver (v3.0) segítségével végezték. A peptidjeleket és fehérjéket a Sequest HT keresőmotorral az UniProt fehérje adatbázis egér részének (v2023-08-07, 17734 sor) felhasználásával azonosították. A viszonylagos mennyiségi meghatározást a TMT (S/N) értékek alapján végezték el, amelyeket az MS3 HCD spektrumokból nyertek ki. Az egyedi és vágott peptidjeleket elfogadták a tumor és a kontroll mintacsoportok fehérje mennyiség alapú összehasonlításához (elfogadási paraméterek: Sequest HT Xcorr>1, előfutó ion együttes izolációs küszöb MS1-ben <50%, átlagos TMT jelentőségi S/N az MS3 HCD spektrumokban >10, SPS tömegmegfelelés az MS2-ben >50%. Magabiztosan azonosított fehérjéket elfogadták $|\log_2\text{FoldChange}|>1$ (beállított $p\text{-érték}\leq 0,05$), amelyek különbözően expresszálódtak.)

SLE betegek

Az SLE-betegeket az 2019-es Európai Reumatológiai Szövetség/Amerikai Reumatológiai Kollégium osztályozási kritériumainak megfelelően választottuk ki, ha aktív betegségük volt (legyen az újonnan diagnosztizált vagy visszaeső), ami legalább 6-os SLEDAI-2K pontszámot jelentett (Aringer et al., 2019; Gladman et al., 2002). Azokat a betegeket zárták ki, akiknél egyidejűleg más gyulladásozó állapot (pl. fertőzés) vagy átfedő rendszerbetegség, kivéve az antifoszfolipid szindrómát vagy a Sjögren-szindrómát klinikailag aktív glanduláris tünetekkel. Az újonnan diagnosztizált betegek kezeletlenek voltak, míg a visszaeső betegek fenntartó immunszuppresszív kezelés alatt álltak, de a kortikoszteroid dózis legalább 5 mg/nap prednizolon kizáró tényező volt.

Etikai nyilatkozat

A betegeket a Szegedi Tudományegyetem Reumatológiai és Immunológiai Intézetének vizitjeinek alkalmával toborozták. Az egészséges kontrollokat a BRC vagy a Szegedi Tudományegyetem önkéntes munkatársai alkották. A résztvevőket egy orvos tájékoztatta a kutatásról. Minden résztvevőtől írásbeli beleegyezésüket kérték, és a kutatást egyetemi független etikai bizottság felülvizsgálta és jóváhagyta. A tanulmány tervezetének részleteit és a biológiai anyagok kezelését az SZTE Emberi Vizsgálati Értékelő Bizottságához nyújtották be a 21/2011 és 149/2019-SZTE projektazonosító kódok alatt. A laboratóriumi vizsgálatokat és értékelésüket anonimizált módon végezték, személyes adatok nélkül. A vizsgálat Helsinki Nyilatkozat legújabb verziójának elveivel igazodott.

Perifériás fehérvérsejt izoláció SLE betegekből

A leukocitákat a csoportunk által korábban leírt módon (Gemes et al., 2023; Neuperger et al., 2023) izoláltuk. Röviden, 20 mL perifériás vért gyűjtöttünk egy EDTA vérvételi csőbe (Becton Dickinson, Franklin-Lakes, USA), majd a sejteket standard sűrűségi gradiens centrifugálással izoláltuk Leucosep csövekkel (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria). Az esetleges maradék vörösvérsejteket lizálaltuk, a leukocita-pelletet 2 mL ammónium-klorid-kálium lízis pufferben (ACK: 0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,3; Merck, Darmstadt, Németország) szuszpendáltuk, majd szobahőmérsékleten 2 percig inkubáltuk. A mintákat kétszer mostuk 10 ml foszfátos sóoldat PBS-el (Merck), majd meghatároztuk sejtszámot és a viabilitást trypan kék (Merck) teszttel. Az 4×10^6 sejtet aliquotokat fagyasztottunk FBS-t (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Németország) tartalmazó 10% (v/v) dimetil-szulfoxiddal (DMSO, Merck) folyékony nitrogénben (Messer, Bad Soden, Németország).

Adatok vizualizációja és statisztikai elemzése

A FACS adatok vizualizálásához a GraphPad Prism szoftvert használták (8.0.1-es verzió Windowshoz, GraphPad Software). A folyadékkromatográfiai statisztikai elemzéshez kétoldalas, heteroszkedasztikus Student t-próbát végeztünk az általános szignifikancia (beállítva * $p < 0,05$) értékelésére két adott kísérleti csoport között, páros összehasonlítással. Az ábrákat BioRender webes platform segítségével készítettük el.

EREDMÉNYEK

Glikán mintázat egér vastagbélrák modellen

A vastagbélrákos egerek három különböző típusú immunsejtjeinek felületén szignifikáns különbségeket találtunk a median fluoreszcencia intenzitásban (MFI) az egészséges kontrollokhöz viszonyítva. Az AAL lektin kötődése a fukóz/arabinóz szénhidrátokhoz jelentősen magasabb volt mindhárom immunsejt típus felületén a tumoros egerek lépsejtjeinél az egészséges kontroll sejtekhez képest. Ezzel szemben az AAL kötődése az leukociták esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a CD11⁺ mieloid sejtek esetében. Az SNA lektin kötődése a szialsav csoportokhoz szignifikánsan magasabb volt a CD3⁺ T-sejtek és a CD11b⁺ mieloid sejtek felszínén a tumort hordozó egerek esetében az egészséges kontrollokhöz képest. Az N-acetilglükózaminhoz kötődő PWM lektin is különbségeket mutatott a sejt felülethez való kötődésben. A PWM kötődése szignifikánsan magasabb volt a lépben és a vérben is a CD11b⁺ mieloid sejtek felszínén. A siglec-1 kötődése a szialsavhoz szignifikánsan alacsonyabb volt a CD11b⁺ mieloid sejtek felszínén és a CD19⁺ B-sejtek felszínén a lépből származó sejtek esetében az egészséges kontrollhoz képest. Az N-acetilaktóزامint felismerő galektin-1 kötődése szignifikánsan alacsonyabb volt a CD11b⁺ mieloid sejteken a leukocitáknál.

Mindemellett szignifikáns különbségeket találtunk a reaktív sejtek százalékában a vastagbélrákot hordozó egerek három különböző immunsejtpopulációjában egészséges kontrollokkal összehasonlítva. A siglec-1-hez kötődő sejtek száma jelentősen magasabb volt mindhárom típusú immunsejtben a lépből származó sejteken a kontrollokhöz képest. Továbbá az SNA-hoz kötődő sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a vastagbélrákot hordozó egerek lépének CD11b⁺ és CD19⁺ sejtjeiben az egészséges kontrollhoz képest, azonban a leukociták esetében az SNA reaktív sejtek száma szignifikánsan alacsonyabb volt a tumoros egerek CD3⁺ T-sejtjeinél az egészséges kontrollokhöz képest. A PWM lektin leukocitákhoz való kötődése szignifikánsan magasabb volt mind a CD11b⁺ mieloid sejtek mind pedig a CD19⁺ B-limfociták esetében az egészséges kontrollhoz képest. A Gal1 lépsejtekhez való kötődése szignifikánsan magasabb számot mutatott a CD3⁺ T-sejteknél, azonban a Gal3 kötődése alacsonyabb volt a leukocitákhoz CD3⁺ T-sejtek esetében a vastagbélrákos egerekben az egészséges kontrollokhöz képest.

Egér vastagbélrák proteomikai elemzése

A proteomikai elemzést a HUN-REN Biológiai Kutatóközpont Proteomikai Kutatólaboratóriumában végezték. A teljes proteom analíziséhez a Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) -et használták, és a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) útvonal elemzése kimutatta, hogy a vastagbélrákot leginkább érintő metabolikus tulajdonságok közé tartozik az aminosavak bioszintézise, a glikolízis/gluconeogenezis, a szénhidrát-anyagcsere, a komplement és a koagulációs kaskád. A metasztatikus májban összesen 2164 fehérjét érintő változásokat figyeltünk meg, ahol 730 szignifikánsan csökkent és 1434 pedig nőtt a kontroll májhoz viszonyítva. Ebből kiindulva olyan endogén lektineket gyűjtöttünk össze, amelyek a glikozilációban közvetlenül részt vesznek és szignifikáns változásokat mutattak az egészséges kontrollokhoz képest. A galectin-1, galectin-3 és a C-típusú mannóz receptor 2 mennyisége szignifikánsan megnőtt mind a májban, mind pedig a lépben, azonban a galectin-9 szignifikánsan csökkent mindkét szervben az egészséges kontrollhoz képest. A glikozilációban közvetlenül részt vevő enzimek, mint például a glükóziltranszferázok, galaktoziltranszferázok, manóziltranszferázok és fukoziltranszferázok szignifikánsan emelkedett szinteket mutattak.

Áramlási citometriás eredmények SLE-s betegeken

Szignifikáns növekedést tapasztaltunk az AAL és a Gal3 lektin kötődésében a CD3⁺ T-sejteken és a CD4⁺ T-sejteken. Ezen kívül az SLE CD8^{high} T-sejtek jelentősen megnövekedett Gal3 kötődést mutattak az egészséges kontrollokhoz képest. A CD3⁺ T-sejtek, beleértve a CD4⁺ T-sejteket is, szignifikánsan megnövekedett AAL, Gal1, SNA és Siglec-1 kötődést mutattak SLE-ben. A CD8⁺ T-sejtek, beleértve a főbb alcsoportot, a CD8^{high} T-sejteket is, jelentősen megnövekedett AAL, SNA és Siglec-1 kötődést mutattak SLE-ben, míg az SLE CD8^{dim} T-sejtek is jelentősen magasabb mennyiségben kötődtek az SNA-hoz és a Siglec-1-hez. Az DNT-sejtek csak a Siglec-1 kötődésében mutattak jelentős növekedést SLE-ben. A nyugalmi állapotban lévő NK-sejt alcsoportokban jelentős növekedést figyeltünk meg a Gal3 kötődésében mind a CD56 NK-sejtekben, mind a CD56^{high} NK-sejtekben. Az SLE betegek nyugalmi állapotban lévő klasszikus monocitáiban szignifikáns csökkenést tapasztaltak a Gal1, Gal3 és SNA kötődésben.

ÖSSZEFOGLALÁS

A glikán mintázatok változása képes módosítani a különböző betegségekben, például rákos állapotokban előforduló immunológiai válaszokat, gyulladást és az immunreakciókat. A lektinek szelektíven felismerik az egyedi szénhidrát-láncokat, és reverzibilisen kötődhetnek azokhoz. A szelektív specificitásuknak és kötési tulajdonságaiknak köszönhetően egyedi szénhidrát-láncok térképezésére használhatjuk fel őket. Munkám során sikeresen kifejlesztettem az immunsejtek glikán kódjának elemzéséhez egy fluoreszcens festékkel jelölt lektin-alapú multiparametrikus áramlási citometria panelt és sikeresen optimalizáltam azt. Egér vastagbélrák modellt hoztunk létre annak vizsgálatára, hogy a daganatban megváltozott glikozilációs mintázat hogyan hat az egyes immunsejtek populációkra. Az egyedi szénhidrát-kötő lektineket különböző fluoreszcens festékekkel láttuk el, lehetővé téve ezzel az összetett glikán kód párhuzamos térképezését. A korábban kiválasztott hat lektin kötődését vizsgáltuk a fehérvérsejtekhez, mint például a galectin-1 (Gal1), siglec-1 (Sig1), *Sambucus nigra* lectin (SNA), *Aleuria aurantia* lectin (AAL), *Phytolacca americana* lectin (PWM) és galectin-3 (Gal3). Az áramlási citometriás analízis a lépsejtek fokozott SNA és AAL kötődését mutatta a CD3⁺T-sejtekhez és CD11b⁺ mieloid sejtekhez, valamint a siglec-1 és AAL kötődésének növekedését a daganatos egerek CD19⁺ B-sejtjeihez. A tumoros egerek májának és lépének teljes proteomikai elemzése szignifikáns különbségeket mutatott az expresszálandó fehérjékben. Ezen belül a glikozilációban részt vevő enzimekre és endogén lektinre összpontosítottunk, és számos szignifikáns különbséget azonosítottunk a tumoros szövetekben az egészséges kontrollokhoz képest. Másrésztől sikeresen felhasználtuk a lektinen alapuló többszínű citometriás panelt az immunsejtek glikozilációs mintázatainak vizsgálatára olyan autoimmun betegekben, akik szisztémás lupusz eritematózusban szenvednek. Ez a vizsgálat azt mutatta, hogy a megváltozott sejtfelszíni fukoziláció kiemelkedő jellemzője a szisztémás lupusz eritematózusban szenvedő betegek immunsejt populációinak.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az alábbiakban szeretném kifejezni hálámat

témavezetőimnek,

Dr. Puskás Lászlónak, akinek hálás vagyok a kiemelkedő szakmai támogatásért és mert lehetőséget teremtett ennek a disszertációnak megvalósulásához.

Dr. Szebeni Gábornak, aki nemcsak szakmai irányítást nyújtott, hanem jelentős segítséget is a kutatás, az eredmények publikálása és a rengeteg problémamegoldás során. Hálás vagyok, hogy ilyen sokat tanulhattam tőle a közös munka során.

Külön köszönet illeti Dr. Szabó Enikőt, aki bevezetett a lektinek és a glikoziláció világába, és mindenben segített a munkám során.

Köszönetemet szeretném kifejezni kollégáimnak és egyben barátaimnak,

Huzián Orsolyának, Dr. Alföldi Róbertnek, Dr. Nagy Lajosnak, Dr. Fehér Liliánának és Dr. Hackler Lászlónak, akik mind személyes, mind pedig szakmai támogatást nyújtottak munkám során.

És természetesen köszönettel tartozom családomnak, szüleimnek és bátyámnak, akik mindig támogattak, valamint vőlegényemnek, Zentai Bencének, végtelen türelméért és mert hitt bennem.