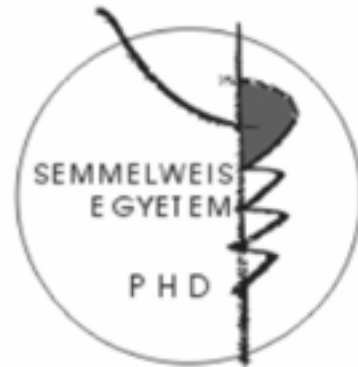


Humán szubmandibuláris nyálmirigy-eredetű primer sejtek és immortalizált sejtvonal differenciálódásának *in vitro* vizsgálata

Doktori tézisek

Szlávik Vanda

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Varga Gábor egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Kovács Attila kandidátus, egyetemi docens
Dr. Darvas Zsuzsa kandidátus, egyetemi docens

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Falus András, egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Tagok: Dr. Tóth Sára, kandidátus, egyetemi docens

Dr. Réz Gábor, kandidátus, egyetemi docens

Budapest
2008

Bevezetés

A nyáleválasztásnak mennyisége és minősége lényeges a szájhigiéncia és a gyomornyálkahártya épségének szempontjából. A nyáltermelés csökkenése, illetve elvesztése mind az egészségre, mind az életminőségre rendkívül rossz hatással van. A nyálmirigy hypofunkciónak több oka lehet: a szájszárazságot, vagy *xerostomiát* leggyakrabban az egyik autoimmun kórkép, a *Sjögren-szindróma*, illetve a *terápiás besugárzás* váltja ki. A kórfolyamatokban elsősorban a nyál-termelésért felelős acinussejtek károsodnak lényegesen. A nyálmirigy funkcionális szövetének helyreállítása a patológiás folyamatok gyógyítását követő fontos lépés lehet, mely javítja a szájüreg egészségét és az életminőséget. Pluripotens progenitorsejtek implantációja megoldást jelenthet a károsodott acinussejtek pótlására. Egyre több bizonyíték van arra, hogy a szubmandibuláris nyálmirigy interkaláris duktuszaiban széles fejlődési potenciálú, multipotens progenitorsejtek találhatók.

A nyálmirigyek organogenezisében a proliferáció, az apoptózis és a cytodifferenciálódás együttesen jelenlévő, összehangolt folyamatok, amelyeket térben és időben differenciálisan expresszáldó és ható faktorok irányítanak. A részleteiben csak rágcslóknál ismert morfogenezis összes stádiumára intenzív epitéliális proliferáció jellemző, apoptózis csak a lumenképződésnél jelentkezik.

A nyálmirigyekkel kapcsolatos *in vitro* differenciációs vizsgálatok egyik széleskörben alkalmazott modellje a **HSG** (Human Salivary Gland) sejtvonala, mely egy irradiált szubmandibuláris nyálmirigy interkaláris duktuszaiból származik. *In vitro* kísérletes rendszerekben a **HSG** sejtek differenciálódnak bazális membrán-extraktum, Matrigel®, vagy laminin hatására. A folyamatot kísérő morfológiai átalakulás és a differenciált sejtalakokra jellemző szekretoros fehérjék expressziós változásai is nyomonkövethetők.

A tenyésztés körülményeitől függően a **HSG** sejtek különböző morfológiai változásokat mutatnak: tiszta laminin aljzaton a sejtek diszkrét acinusokat formálnak, bazális membrán felületen nagy, duktális lumenű retikuláris hálózatot, acinotubuláris struktúrákat és acinusokat is képeznek.

Úgy tűnik, hogy a funkcionális differenciálódást jelző markerfehérjék expressziója nincs egyértelmű korrelációban a morfológiai változásokkal, pl. a laminin felületén morfológiailag acinussá alakult **HSG** sejtek a duktusz-sejtekre jellemző *cisztatint* termelik. A bazális membrán-extraktumok felületén kifejezettebb az *amiláz*-expresszió növekedése függetlenül a kialakult struktúrák morfológiájától.

A **HSG** sejtek differenciálódását vizsgáló kísérletekből a legtöbb ismeretünk az első 72 óra morfológiai és génexpressziós változásairól vannak. Keveset tudunk arról, hogy meddig életképesek a kialakult, morfológiailag megváltozott struktúrák. Az embrionális élet organogenetikus folyamataiban teljesen differenciálatlan egyforma sejtekből strukturálisan és funkcionálisan érett szerv jön létre, melynek élettani működése a differenciálódott sejtalakok eltérő funkcióján alapszik. A **HSG** sejtvonalt, mint modellrendszer alkalmazásával továbbra is kérdés maradt, hogy a beindult morfológiai és funkcionális változások elérnek-e egy terminálisan differenciálódottnak tekinthető állapotot. A **HSG** sejtek immortálisak, differenciálatlan populációik folyamatos sejtosztódásra képesek. Bár többen beszámoltak az acináris differenciálódás következtében mérséklődő proliferációról, arról kevés ismeretünk van, hogy az előrehaladó folyamatban vajon megmarad-e a sejtvonalt halhatatlansága.

Az **HSG** sejtvonalt differenciálódása, bár modellértékű, terápiás jelentősége azonban kevés a sejtvonalt immortális sajátosságai miatt. A károsodott nyálmirigyszövet regenerálásának egyik felmerülő lehetősége a kívülről bejuttatott szövetpótlás. Ez az igény indokolja a valódi nyálmirigyszövetekből nyert sejtek *in vitro* differenciációs sajátosságainak tanulmányozását.

Eddig kevés próbálkozás történt nem neoplasztikus eredetű humán szubmandibuláris nyálmirigy-sejtkultúra létrehozására. A Tran és munkatársai által létrehozott **huSMG** primer tenyészet, műtétileg eltávolított egészséges (nem daganatos, nem gyulladt és nem irradiált) emberi szubmandibuláris nyálmirigyből származik és hosszútávon fenntartható *in vitro* körülmények között. A **huSMG** sejtkultúra szövettani karakterüket tekintve duktális sejtekből áll, melyek epitéliális markerfehérjéket expresszálnak. Megfigyeléseink szerint a **huSMG** sejtek passzálhatósága nagyon kis hatásfokú és differenciációs kísérletekre kevésbé alkalmas. Érdemesnek tűnt kidolgozni egy olyan izolálási és tenyésztési eljárást, mely a **huSMG** sejtekhez hasonlóan egészséges humán nyálmirigyből indul ki, azonban passzálható és differenciálható sejteket eredményez. Ehhez célszerűnek láttuk -szemben a **huSMG** egyneműségével – egy heterogén összetételű primer tenyészet létrehozását: ez a **PTHSG** (Primary Total Human Salivary Gland).

Célkitűzések

Munkánkban a **HSG** sejtvonalt differenciálódását hosszútávon követtük nyomon; a sejtek sorsát az elköteleződéstől a terminális állapotig vizsgáltuk. Tanulmányoztuk a primer eredetű humán nyálmirigysejtek túlélését és differenciálódását plaztikon és bazális membrán extraktumok környezetében. Kísérleteinket az alábbi szempontok szerint terveztük:

1. A **HSG** sejtvonal morfológiailag legreprodukálhatóbb acinus-struktúrájának kialakítása Matrigel® környezetében
2. A kialakult **HSG** acinusok proliferációjának, túlélésének és apoptózisának vizsgálata
3. A differenciálódás időbeli és szerkezeti végpontjának meghatározása
4. A differenciációs folyamat reverzibilitásának tanulmányozása
5. A főbb jelátviteli utak aktiválásának, illetve gátlásának differenciálódásra gyakorolt hatásának vizsgálata
6. *In vitro* differenciációs modell kidolgozása humán szubmandibuláris nyálmirigy-szövetből (**PTHSG** sejt kultúra)
7. Az alap- és a differenciált **PTHSG** tenyészet proliferációs sajátosságainak vizsgálata
8. A morfológiai differenciálódás dinamikájának nyomonkövetése
9. A differenciált humán nyálmirigysejtek fehérje- és génexpressziójának tanulmányozása

Anyagok és módszerek

- A kísérletekhez használt sejtenyészetek (**PTHSG**, **HSG**) létrehozása és fenntartása
- **HSG** és **PTHSG** sejtek differenciáltatása extracelluláris mátrix komponenseket tartalmazó közegben (Matrigel®, Basal Membrane Extract)
- Proliferációs aktivitás mérése (³H-timidin-inkorporáció, MTT- és XTT redukció)
- Apoptózis-detektálás (annexin V-flow (áramlási) cytometria és kaspáz-3 aktivitásmérés)
- RNS izolálás, cDNS készítés, real time (valós idejű) PCR
- Immunhisztokémiai festések (fluoreszcens, konfokális, fénymikroszkópos)
- Videómikroszkópia
- Sejtek jelátviteli útjainak farmakológiai gátlása
- Statisztikai elemzés

Eredmények

I. A HSG sejtek vizsgálatainak eredményei

A HSG sejtek morfológiai változásai és sorsa plasztikon és Matrigel®-ben

A humán szubmandibuláris nyálmirigy eredetű **HSG** (Human Salivary Gland) sejtek plasztikon aljzaton epitéliális monolayeret alkotnak és folyamatosan proliferálnak. Növekedési faktor-csökkentett Matrigel®-be helyezve a **HSG** sejtek 24 órán belül gömbszerű struktúrákat formálnak, a sejtek felszínén mikrovillusok jelennek meg. A szférikus struktúrák a tenyésztés 4. napjára 10-12 granulált sejtből állnak, acinus-szerű morfológiát mutatnak, a sejthalmazokban lumen képződik. A Matrigel®-ben kialakult acinusokat konfokális mikroszkóppal vizsgálva amiláz-expressziót tapasztaltunk. A tenyésztés 5. napján az acináris struktúrák szétesnek, a sejtek összezsugorodnak. A propidium-jodiddal jelölt sejtmagok konfokális mikroszkópos felvételei fragmentált kromatin-állományt mutatnak, szemben az azonos ideig plasztikon tenyésztett **HSG** sejtek homogén magállományával.

A 3 napig Matrigel®-ben növesztett **HSG** sejteket az acináris struktúrák épségének megőrzésére ügyelve izoláltuk a Matrigel®-ből, majd az acinusokat friss Matrigel®-be keverve új tenyészeteket hoztunk létre. A friss Matrigel®-ben az acinusok 2-3 nap múltán szintén szétesnek, hasonlóan az átültetés nélkül 5-6 napig Matrigel®-ben tenyésztett testvérkultúrákhoz. Amennyiben nemcsak a Matrigel®-t emésztettük el az acinusok környezetéből, hanem magukat az acinusokat is sejtjeikre izoláltuk, majd az így nyert egyedi sejtekből álló szuszpenziót plasztikon aljzatra szélesztettük, a **HSG** sejtek eltérően viselkedtek attól függően, hogy előzőleg mennyi időt töltöttek Matrigel®-ben. A megelőzően 3 napig Matrigel®-ben nevelt sejtek egysejt-rétegben (monolayerben) letapadtak a plasztikon aljzatra, újra differenciálatlan, epitéliális morfológiát mutattak, míg a 6 napos acinusokból származó **HSG** sejtek nem proliferáltak tovább, a tenyésztőfolyadékban lebegő, elpusztult sejteket találtunk.

A HSG sejtek proliferációs dinamikája plasztikon és Matrigel®-ben

A plasztikon és Matrigel®-ben nevelt sejt-kultúrák proliferációs dinamikáját XTT-életképességi teszttel követtük. A plasztikon-kultúrák növekedési görbéje az immortalis sejt-vonalakra jellemző lefutást mutatta; a sejtszám gyorsan növekedve eléri a konfluens (egybefüggő) tenyészetekre jellemző értéket, majd a növekedés a kontakt-gátlás következtében mérséklődik, ezt követően pedig kissé visszaesik. A Matrigel®-ben tenyésztett **HSG** kultúrák proliferációs dinamikája ettől nagyon különböző. A tenyésztés első három

napján a sejtszám-növekedés hasonló mértékű, bár mérsékeltebb, mint a plasztikon nevelt testvértenyészeteké, tehát a sejtek proliferációs fázisban vannak. A 4. napon a növekedés észrevehetően lelassul, majd a sejtszám erőteljesen visszaesik az 5. illetve a 6. napra. Megfigyeléseink a fentebb tárgyalt morfológiai változásokkal egybevetve valószínűsítik, hogy a **HSG** sejtek a Matrigel®-ben előbb proliferálnak és differenciálódnak, majd ezt gyors sejthalál követi.

A triciált timidin inkorporációs mérések eredményei azt mutatják, hogy a plasztikon és Matrigel®-ben nevelt **HSG** sejtek DNS szintézise az első sejtciklusban (20 órán belül) nem különbözik, viszont jelentősen kisebb mértékű az izotóppal jelölt timidin beépítése a Matrigel®-es kultúráknak a tenyésztés 26. órájában, 2., illetve 3. napján.

Vizsgáltuk a Matrigel®-ből egyedi sejtekre izolált és plasztik aljzatra visszaültetett **HSG** acinusok proliferációs aktivitását is. Azonos sejtszámmal kiültetett plasztik testvértenyészeteket létrehozva differenciálatlan **HSG** sejtekből (kontroll) és a 3 napos **HSG** acinusokból nyert egyedi sejtszuspenzióból, azt tapasztaltuk, hogy az előzőleg Matrigel®-ben nevelt sejtek DNS-szintézise $98,4 \pm 4,3$ %-a volt a kontrollnak. A 6 napig Matrigel®-ben növesztett **HSG** acinusokból származó egyedi **HSG** sejteknek nem volt mérhető DNS-szintézise plasztikra való kiültetés után.

Apoptózis detektálása a Matrigel®-ben tenyésztett HSG sejt kultúrákban

Annexin- V-FITC flow cytometria

Az apoptotikus sejtek membránján a foszfatidil-szerin externalizálódik, így a hozzá specifikusan kötődő fluoreszcensen jelölt annexint mérni tudjuk flow cytometria segítségével. A plasztikon nevelt **HSG** sejt kultúrák annexin kötődése nagyon alacsony volt a kultúra 5. és 6. napján is. A Matrigel®-es tenyészetekben az Annexin-V-FITC-pozitív sejtek aránya a tenyésztés idejével párhuzamosan nőtt. Ezekben a tenyészetekben az annexin pozitív sejtek között a magas fluoreszcencia-intenzitású populációt alkotó sejtek száma szintén jelentősen emelkedett a Matrigel®-ben töltött napokkal.

Survivin mRNS- és fehérje-szint változásának vizsgálata

Az antiapoptotikus fehérjék családjába tartozó survivin mRNS expresszió-változását kvantitatív RT-PCR-rel követtük nyomon. A 3 napos Matrigel®-ben differenciáltatott **HSG** tenyészetek survivin-mRNS szintje hasonlóan alakult az azonos korú plasztik-kultúrákéhoz. A Matrigel®-ben töltött 5 nap után a sejtek survivin-szintje szignifikánsan alacsonyabb volt,

mint az 5 napig plasztikon nevelt **HSG** sejteké. A fluoreszcens immunlokalizációs vizsgálataink szerint a differenciálatlan, plasztikon növesztett **HSG** sejtekben a survivin fehérje a sejtmagokban és a citoplazmában egyaránt megtalálható, ezért a zölddel jelölt survivin és a magok piros propidium-jodid festése együtt narancssárgán jelenik meg. A Matrigel®-ben differenciáltatott 4 napos **HSG** acinusokban a survivin fehérjét már csak a citoplazmában lehetett detektálni, míg a 6 napos széteső acinusok survivin-negatívak voltak

Kaspáz-3 aktivitás mérés

A programozott sejthalál egyik effektor enzime a kaspáz-3. A Matrigel®-ben differenciáltatott **HSG**-tenyészetekben mért kaspáz-3 enzimaktivitás a survivin-szint változással fordított arányban alakult. Az azonos korú plasztik-kultúrákkal összevetve (100±49 %) az 1 és 2 napos Matrigel®-es tenyészetek kaspáz-3 aktivitása nem változott jelentősen (rendre 79±5 % és 175±72 %); a 3 napig Matrigel®-ben tartott kultúráké viszont szignifikánsan nőtt (446±11 %, p<0,01, n=3-3), ami kaspáz-3 függő apoptózisra utal.

Szignalizációs útvonalak farmakológiai gátlása a plasztikon és Matrigel®-ben tenyésztett HSG sejtekben

A főbb jelátviteli útvonalak blokkolásával a **HSG** sejteken a Matrigel® által kiváltott proliferációs és apoptotikus hatásokat próbáltuk befolyásolni. A különböző inhibitorokat 3 ill. 5 napig alkalmaztuk Matrigel®-es és plasztik **-HSG** tenyészeteken. A sejtek morfológiai változásait fénymikroszkóppal, a proliferációs aktivitásuk alakulását XTT-assay-vel követtük. Az egyes inhibitorok hatása a kezelési idő függvényében nem változott, 3 vagy 5 napig alkalmazva a gátlószereket, azok hasonlóan befolyásolták a **HSG** sejtek életműködéseit.

A PKC enzimek és NFκB gátlása jelentős csökkenést idézett elő mind a plasztikon, mind pedig a Matrigel®-ben nevelt **HSG** sejtek proliferációjában a kezeletlen kontroll-tenyészetekével összevetve. Az NFκB által kiváltott növekedés-gátlás sokkal hangsúlyosabb volt a Matrigel®-es kultúrákon, mint az azonos módon kezelt plasztik-tenyészeteken (interakció: p<0,001). PI3K-gátlás esetén a sejtszám-növekedés szignifikánsan visszaesett plasztikon, míg Matrigel®-ben nem változott. Az MMP-inhibitor jelenléte a plasztikon tenyésztett **HSG** sejtek osztódását nem befolyásolta, a Matrigel®-es kultúrákban viszont sejtszám-növekedést idézett elő. A tyrosin-kináz gátlószer alkalmazásakor a plasztik-kultúrákban mérsékelten csökkent a proliferáció, míg a Matrigel®-ben nevelt sejtek száma jelentősen nőtt, csillapítva a Matrigel® fentebb említett proliferáció-gátló hatását.

II. A PTHSG sejtek vizsgálatának eredményei

PTHSG (Primary Total Human Salivary Gland) tenyészet készítése

A **PTHSG** tenyészetek létrehozásához szájsebészeti műtéteken kiemelt egészséges (nem gyulladt, nem daganatos és nem besugarazott) humán szubmandibuláris nyálmirigy-szövetet használtunk. A szövetminták a mechanikus aprítása és az enzimatikus emésztés után több centrifugálás következett, majd tenyészeményekbe helyeztük a sejtszuspenziót, mely a kiültetés pillanatában főleg tápfolyadékban lebegő sejtaggregátumokból állt. Primer tenyészetekben (0. passzázsú, a továbbiakban: p0) az egyedi sejtek kitapadása után azok klonális elszaporodását figyeltük meg, terjeszkedő, kiterült epitéliális mezőket eredményezve. A sejt kultúra 4. napján a **PTHSG** sejtek diszkrét, összefüggő foltokat alkottak, melyben a sejtek macskakő-szerű, epitéliális karaktert mutattak, környezetükben gyakran elnyúlt, fibroblaszt-jellegű sejteket találtunk. A tenyésztés 7. napjára a **PTHSG** primer kultúrák kb. 70 %-os konfluenciát értek el; a tenyészetek elsősorban egy-sejtrétegűek voltak, elszórta 3-dimenziós sejthalmazok képződtek az epitéliális mezők felületén. A **PTHSG** sejtek 1. passzázsából származó kultúrák hasonló külső jegyeket mutattak mint a primer tenyészetek (p0), azonban 3-dimenziós sejthalmazokat már nem találtunk. A 2. és 3. passzázsú **PTHSG** kultúrákban a fibroblaszt-jellegű sejtek aránya megnőtt az epitéliális sejtekéhez képest. A **PTHSG** primer-és további szubkultúráinál is kb. 30 nap tenyésztési idő után a tenyészetek előregedését figyeltük meg, a sejtek elvesztették a kapcsolatot egymással és a letapadási felszínnel.

PTHSG sejtek differenciálódása bazális membrán extraktumok (BME) felületén

A növekedési-faktor-csökkentett BME felületén az 1. passzázsából származó (továbbiakban p1) **PTHSG** sejtek gömbölyded, acino-tubuláris struktúrákat alkottak a kiültetést követő 24 órán belül. Videómikroszkópos kísérleteink megmutatták, hogy a sejtek a szélesztést követően sebesen migrálnak a BME aljzaton, gyorsan kis aggregátumokat formálnak, melyek acino-tubuláris alakzatokká fejlődnek. A következő napokban a **PTHSG** sejtek további mozgását lehetett megfigyelni. A sejtaggregátumok, függetlenül az alkalmazott BME koncentrációjától, hasonló struktúrát mutattak.

A paraffinos metszeteken hematoxilin-eozin festéssel lumennel rendelkező duktális hálózatokat és acináris struktúrákat láthattunk.

A PTHSG sejtek proliferációja plasztikon és BME-aljzaton

Öt különböző páciensből származó szövetmintán végrehajtott független kísérletek szerint a BME felületén 3 napos tenyésztés után a sejtek proliferációja jelentősen visszaesett a plasztikon nevelt testvérekultúrákéhoz képest.

Egy másik kísérleti felállásban közvetlen sejt számlálással hasonlítottuk össze a **PTHSG** sejtek 1. és 3. passzázsából származó plasztik-tenyészetek sejtosztódási aktivitását. Az 1. passzázsából származó **PTHSG** sejtek száma a tenyésztés 3. napjára 126 ± 12 %-kal nőtt, ehhez hasonló eredményt adtak a 3. passzázsából származó sejtek, ahol a sejtszám-növekedés 112 ± 13 % volt.

A PTHSG sejtek génexpressziója plasztikon és BME-aljzaton

Összehasonlítottuk 5 beteg szubmandibuláris nyálmirigy-szövetének, illetve az azokból készített **PTHSG** tenyészetek 1. passzázsú, plasztikon nevelt sejtjeinek amiláz mRNS expresszióját. A plasztikon tenyésztett **PTHSG** sejtek közül 4 minta amiláz expressziója jelentős mértékben csökkent az eredeti nyálmirigyekből mért expressziós szinthez képest, egy esetben viszont nem tapasztaltunk szignifikáns változást. A plasztikon nevelt **PTHSG** sejtek 1. passzázsú tenyészetek amiláz mRNS expressziója változatos képet mutatott, 2 nagyságrend eltérés volt a különböző betegekből származó mintákban.

További kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a BME felületén való tenyésztés az amiláz-, illetve egyéb nyálmirigyhez-kötődő gének (claudin1, claudin3, kallikrein, és a mezenchimális eredetű sejtekre jellemző vimentin) kifejeződését; és van-e ebben szerepe a felhasznált BME fehérje-koncentrációjának. Ehhez 1. passzázsú plasztikon, illetve BME-felületen tenyésztett **PTHSG** kultúrákat használtunk, melyek 13 különböző betegből származó nyálmirigyből készültek. A statisztikai elemzést ANOVA módszerrel végeztük.

Nem találtunk összefüggést a BME fehérje-koncentráció (9,1-17,1mg/ml) és a génexpressziós változások között ($P=0,9935$), ugyanakkor bizonyos mintákban erőteljes amiláz mRNS expressziós-szintnövekedést tapasztaltunk a BME-kezelés hatására. A többi gén expressziója széles határok közt változott a plasztikon és a BME felületen növesztett tenyészetekben. Ahhoz, hogy az egyes gének BME-kezelés hatására bekövetkező tendenciózus változásait elemezhessük, a különböző koncentrációjú BME típusokból és a különböző páciensekből nyert adatokat összevontuk, és az összes vizsgált génre megállapítottuk az expressziós-szint átlagos változását. Az amiláz expresszió szignifikánsan növekedett a BME felületen tenyésztett **PTHSG** sejtekben a plasztikon nevelt kultúrákéhoz képest, ugyanakkor nem

tapasztaltunk szignifikáns változást a többi vizsgált gén esetén (claudin1, claudin3, kallikrein és vimentin). A minták felében (azaz 6 különböző betegből előállított **PTHSG** sejt kultúrájánál) a BME kezelés hatására bekövetkező amiláz expresszió növekedésének nagyságrendje 1,5-nél kisebb volt, míg a többi 6 mintánál ez az érték 2,5-nél nagyobb. Ha ezt a két mintacsoportot elkülönítve vizsgáltuk a többi gén kifejeződésének mértékét, azt tapasztaltuk, hogy ahol az amiláz-szint fokozottabban növekedett, ott a claudin3-szint is megnőtt, a többi gén expressziós szintje viszont nem változott. Az amiláz-növekedésben kisebb értéket képviselő mintákban a claudin1 expressziós szintje lecsökkent, a többi gén kifejeződése változatlan maradt.

A primer (p0) **PTHSG** kultúrákban elszórva összejt-niche-ekre (összejt fészkek) emlékeztető sejthalmazok alakultak ki, melyekben a többi sejttől eltérően jellegzetesen kicsi és denz sejtmagú sejtek némelyike CD34, illetve C-kit immunreaktivitást mutatott.

A **PTHSG** primer tenyészetektől (p0) alkotó epiteliális sejteken erős amiláz-immunreaktivitást észleltünk, ugyanakkor egyazon kultúrában amiláz-negatív sejtcsoportokat is találtunk. Az 1. passzázsából származó **PTHSG** sejtek plasztik aljzaton csak elszórtan mutattak rendkívül gyenge amiláz-immunreaktivitást, míg a BME felületén növesztett **PTHSG** sejtekből kialakult acino-tubuláris struktúrák erősen amiláz-pozitívak voltak. Konfokális mikroszkóppal megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az egy-egy acináris struktúrát alkotó sejtek amiláz-expressziója nem egységes, az erősen festődőek mellett találhattunk amiláz-negatív sejteket is. A passzázs-szám növekedésével párhuzamosan az immunhisztokémiailag azonosítható amiláz expressziója csökkent.

A **PTHSG** sejtek 1. passzázsából származó BME- és plasztik aljzatú kultúrákon is kimutattuk az ocludin jelenlétét, mely az epiteliális sejtekre jellemző sejtkapcsoló struktúrák (tight junction) egyik alkotófehérjéje.

Az 1. passzázsú **PTHSG** sejtek plasztik aljzaton növe erős vimentin immunreaktivitást mutattak, míg a BME felületén kialakuló globuláris struktúrák vimentin-negatívak voltak.

A BME felületén acináris struktúrákká differenciálódott **PTHSG** sejtek némelyikén azonosítottuk az AQP5 fehérjét. A korábbi munkákkal megegyezően a humán nyálmirigy-acinusokon az AQP5 az apikális plazmamembránon lokalizálódik, míg a duktális struktúrákon nem tudtuk kimutatni.

Következtetések

Az immortális **HSG** sejtek (melyeket eddig az acináris differenciálódás *in vitro* modelljeként tartottak számon) Matrigel®-ben egyforma méretű és hasonló alakzatú diszkrét acinusokat formáltak. Proliferációjukban a plasztikon nevelt tenyészetekével összevetve először a sejtosztódás visszaesését, majd apoptózist tapasztaltunk, mely a tenyésztés 5.-6. napjára a sejtek összességét érintette. A programozott sejthalál folyamatában résztvevő szabályzó szerepű survivin és effektor-funkciójú kaszpáz-3 fehérjék mennyiségi változásait nyomon követtük. A **HSG** sejtekből kialakult acinusok apoptózisának reverzibilitása időhöz kötött; Matrigel®-ben töltött 3 nap után visszafordíthatatlan a sejtpusztulás. Eredményeink alapján a **HSG** sejtvonal csak korlátozott érvényű modell a nyálmirigysejtek differenciálódására. A szöveti specializálódás kezdeti lépéseit lehetővé teszi ugyan az extracelluláris mátrix-fehérjék környezete, viszont a tényleges szöveti strukturálódás nem következik be. A mutált p53 fehérjét tartalmazó **HSG** sejtek a körülményektől függően vagy a folyamatosan osztódó, elkötelezetlen állapotban vannak, vagy tömeges programozott sejthalált szenvednek el, ellentétben az *in vivo* nyálmirigyfejlődés során összehangoltan, időben és térben együttesen működő proliferációs és apoptotikus folyamatokkal. A valódi organogenezis sajátossága az egymás mellett létező eltérően specializálódó sejtek visszacsatoló kommunikációja, amely a monoklonális eredetű neoplasztikus **HSG** esetében nem valósul meg.

Indokoltnak láttuk tehát egy olyan *in vitro* modell kialakítását, amely egészséges nyálmirigyek sejtjeiből építkezik. Törekedtünk a szövettani heterogenitás megtartására már a primer tenyészet létrehozásában is. A fej-nyaksebészeti műtétek során eltávolított ép szubmandibuláris nyálmirigyszövetből heterogén sejtösszetételű primer kultúrát (**PTHSG**) hoztunk létre. Az *in vitro* sejtenyésztési körülmények csak közelíteni tudják az ép szervezet dinamikus változó körülményeit, ezért a heterogén sejtállományban inkább feltételezhető kompenzációs mechanizmusokat tartottuk a hosszútávon fenntartható differenciálódási folyamat kulcsának.

Bazális Membrán Exraktum (BME) felületén az izolált **PTHSG** sejtek 24 óra alatt migrációval acinotubuláris struktúrákká alakultak, melyek szerkezete 6 napig dinamikus változott. A BME környezetben tenyésztett sejtek proliferációja csökkent a plasztikon nevelt kultúrákéhoz képest. A **PTHSG** tenyészetek fehérje és génexpressziós változásait vizsgálva megállapítottuk, hogy progenitor sejtek és már differenciálódott epitéliális-, illetve mezenchimális sejtek is alkotják a kultúrát. Az extracelluláris mátrix-összetevők hatására kialakult acinotubuláris struktúrák elsősorban epitéliális sajátosságúak. A differenciált

nyálmirigyekre jellemző szervezettség és specifikus fehérjék (amiláz, cisztatin, klaudin1, klaudin3, vimentin) expressziója a BME felületén indukálódhat, de a mértéke a donor nyálmirigytől is függ.

Az extracelluláris mátrixfehérjék környezete valószínűleg a morfológiai szerveződés kezdeti lépéseit biztosítja. A heterogén sejtösszetétel ugyan lehetővé teszi a differenciálódott kultúra hosszútávú fenntartását, ugyanakkor megnehezíti az egyes sejtsorok nyomkövetését.

A **PTHSG** sejt kultúra tehát modellje lehet az acinotubuláris szerveződés tanulmányozásának, differenciációs kapacitásából adódóan pedig alkalmas lehet a sejtpótlás és szövetregeneráció vizsgálatára.

Kiterjedtebb mintagyűjtéssel és a donorok különböző paramétereinek figyelembevételével tisztázható lehet a regenerációs potenciál és a hosszútávú túlélés határa is.

Saját publikációk

Az értekezéshez felhasznált közlemények

Szlavik, V., J. Vág, K. Marko, K. Demeter, E. Madarasz, I. Olah, T. Zelles, B.C. O'Connell, and G. Varga, *Matrigel-induced acinar differentiation is followed by apoptosis in HSG cells*. J Cell Biochem, 2008. 103(1): p. 284-95. **IF: 3,075**

Szlávik, V., Szabó, B., Vicsek, T., Barabás, J., Bogdán, S., Gresz, V., Varga, G., O, Connell B.C. and Vág, J. *Differentiation of primary human submandibular gland cells cultured on basement membrane extract*. Tissue Eng., 2008 –elfogadva **IF: 3,725**

Egyéb közlemények

Kornyei, Z., V. Szlavik, B. Szabo, E. Gocza, A. Czirok, and E. Madarasz, *Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell co-cultures in the course of glia-induced neurogenesis*. Glia, 2005. 49(3): p. 430-44. **IF: 4,809**

Racz, G.Z., A. Szucs, V. Szlavik, J. Vág, B. Burghardt, A.C. Elliott, and G. Varga, *Possible role of duration of PKC-induced ERK activation in the effects of agonists and phorbol esters on DNA synthesis in Panc-1 cells*. J Cell Biochem, 2006. 98(6): p. **IF: 3,075**

Nagy, K., V. Szlavik, G. Racz, G. Ovari, J. Vág, and G. Varga, *Human submandibular gland (HSG) cell line as a model for studying salivary gland Ca²⁺ signalling mechanisms*. Acta Physiol Hung, 2007. 94(4): p. 301-13.