

Szakmai zárójelentés az "A parodontitist kísérő csontvesztés: a makrofágok szerepe és a génterápia lehetőségei" című, K-83915 azonosítójú kutatási pályázatról

"A parodontitist kísérő csontvesztés: a makrofágok szerepe és a génterápia lehetőségei" című kutatási projektünk célja az volt, hogy kísérletes parodontitisz-modellben vizsgáljuk a génterápia felhasználásának lehetőségét a csontvesztés gátlására, továbbá hogy vizsgáljuk a makrofágok szerepét a fogágygyulladás kialakulásában szelektív depléciónak segítségével.

A kísérletes parodontitisz modell beállítása

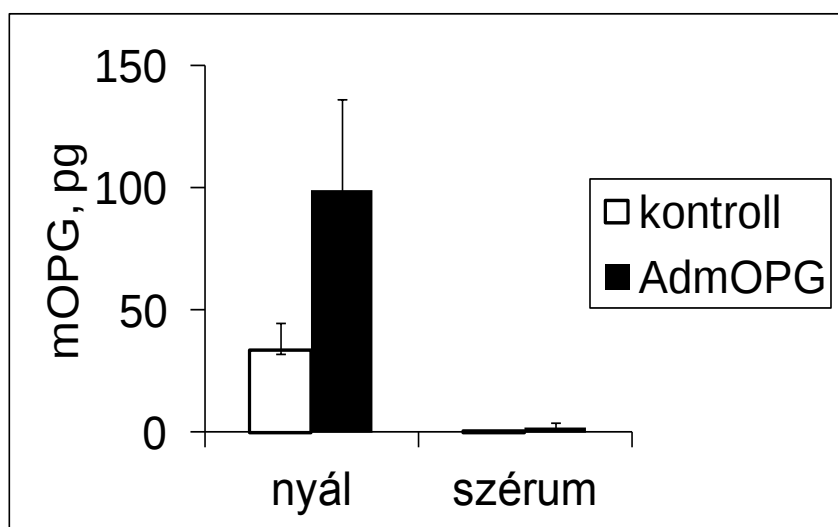
Első feladatunk a vizsgálatainkban alkalmazni kívánt parodontitisz modell beállítása volt a szakirodalomban leírtak alapján [1, 2], *Porphyromonas gingivalis* lipopoliszacharid (PgLPS) felhasználásával. Mivel a modell beállításához szükséges W83 *P. gingivalis*-ből származó LPS [1] kereskedelmi forgalomban nem kapható, ezért az a LPS-t magunk állítottuk elő a Semmelweis Egyetem Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratóriumában tenyésztett W83 *P. gingivalis* törzsből (Dr. Kristóf Katalin és munkatársa). Az LPS preparálását a Darveau és mtsai által leírtak szerint végeztük [3], ilyen módon mind a sima, mind a durva felszínű telepekre jellemző ('smooth' és 'rough') LPS-t tartalmazta a preparátumunk. A kapott preparátum LPS tartalmát Lee és mtsainak módszere alapján [4] Purpald reagenssel mértük, *E. coli* LPS standard mellett. A lipopoliszacharidot hetente háromszor a kísérleti állatok fogínyébe fecskendeztük, míg a kontroll állatok fogínyébe az LPS készítmény oldószerét fecskendeztük [1]. Az eredményeket mikrokompütertomográfiával elemezve azt találtuk, hogy az oldószerrel kezelt, azaz „egészséges kontroll” állatokban jelentős csontvesztés volt tapasztalható. A csontvesztés mértéke nem tért el az LPS-sel kezelt állatokban megfigyelttől. Ennek oka lehetett, hogy az ínybe, a csont szomszédságába adott heti háromszori injekció már önmagában is fizikai irritációt, valamint ennek következtében kialakuló gyulladást és csontvesztést okozott, függetlenül a kezeléstől. Ezért egy másik, az irodalomban gyakran használt modell [5] beállítása mellett döntöttünk. Sebészfonálból készült ligatúrát hurkoltunk a patkány egyik őrlőfogára (az egyik oldali alsó első molárisra) közvetlenül a fogíny fölé. Ez plakkretenciós hatású, így egy-két héten belül reprodukálhatóan ínygyulladást, négy hét alatt pedig mérhető csontvesztést okoz. Ebben a modellben **szignifikáns csontvesztést mértünk a ligatúrával kezelt oldalon** az érintetlen oldalhoz képest.

Terápiás fehérjék termelése rekombináns vírusok segítségével végzett géntranszferrel

Vizsgálatainkban az egyik alkalmazni kívánt génterápiás célszerv a nyálmirigy volt. A nyálmirigy géntranszfer technikájának beállításához a Par-C10 patkány nyálmirigy sejtvonalon végeztünk in vitro transzdukciós kísérleteket. A sárga fluoreszcens proteint (EYFP) kódoló cDNS-t adenovírus (Ad) vektorplazmidba klónoztuk. Ezt helper plazmiddal csomagolósejtekbe juttattuk

kotranszfekcióval, majd az AdEYFP vírust a sejtekből tisztítottuk. Az AdEYFP-vel történő transzdukcióhoz a vírussal a Par-C10 sejteket éjszakán át inkubáltuk, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a fertőzött sejteket. Azt tapasztaltuk, hogy AdEYFP-vel a patkány nyálmirigy Par-C10 sejtvonalat nagy hatékonysággal lehet fertőzni.

A következőkben azt kívántuk vizsgálni, lehet-e a csontfalósejteket szabályozó RANK (Receptor Activator of NFkB) ligandját (RANKL) kötő, és ezzel a RANK és a csontfalósejtek aktiválódását gátló oszteoprotegerint (OPG) termeltetni nyálmirigy génterápiával adenovirális géntranszfert követően; ha igen, milyen mennyiségben, és a termelt OPG hova választódik el a nyálmirigyből. Egér OPG-t kódoló adenovírus vektort (AdmOPG) készítettünk, és azt kanülözéssel patkányok szubmandibuláris nyálmirigyébe juttattuk. Két nap múlva az állatoktól nyálat, vért és nyálmirigyet gyűjtöttünk. Azt találtuk, hogy 2×10^9 AdmOPG partikulum egyik mirigybe injektálását követően összesen $33,4 \pm 8,8$ ng mOPG termelődött, amelyből kizárólag a nyálba történt szekréció, szérumba nem (1. ábra).



1. ábra: OPG szekréció patkány szubmandibuláris nyálmirigyéből AdmOPG géntranszfert, ill. sóoldat injektálását követően (kontroll). A kontroll állatokban elhanyagolható mennyiségű OPG termelődött. Az AdmOPG-t kapott állatok nyálmirigyéből az mOPG kizárólag a nyálba szekretálódott.

Az általunk tervezett génterápiás beavatkozásokhoz adeno-asszociált vírusokat (AAV) is alkalmazni kívántunk, mivel azok az adenovírusoktól eltérően akár több hónapos transzgénexpressziót is lehetővé tesznek a kezelt szövetben. Ezért laborunkban beállítottuk, optimalizáltuk a vírus termelésének és tisztításának metodikáját. A vírusokat a kétplazmidos kotranszfekciós rendszerrel készítettük, a cézium-kloridos grádiensen történő ultracentrifugálással tisztítottuk [6]. Ilyen módon az AAV2 és AAV6 vírusokból $1-5 \times 10^{13}$ víruspartikulumot tudtunk előállítani.

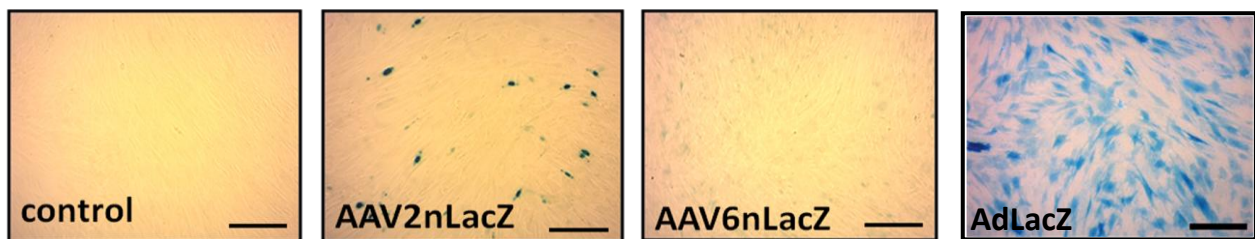
A gyulladáscsökkentő hatású interleukin-4-et (IL4) kódoló AAV2 partikulummal (sejtenként 30 ezer partikulum) fertőzött HEK293T sejtek 2 nap alatt tenyészfelszín cm^2 -enként 80 pg IL4-et

szekretáltak a tápfolyadékba in vitro. Vizsgáltuk az IL-4 expressziót különböző szerotípusú vektorok (AAV2 és AAV6), különböző promóterek (CMV és RSV) esetén. Az optimális bejuttatási mód meghatározásához kísérletek végeztünk intramuscularis (musculus gastrocnemius), intravénás beadással illetve a szubmandibuláris nyálmirigy retrográd feltöltésével is. A kísérletek jelenleg is folyamatban vannak, azonban mindeddig AAV közvetlen beadásával in vivo nem sikerült a fehérje terápiás szintű expresszióját elérni.

Terápiás fehérjék bejuttatása fogeredetű mezenchimális őssejt vektorokkal

Pályázatunk harmadik évében vektorként terápiás fehérjét kódoló rekombináns vírusokkal transzdukált humán fogeredetű mezenchimális őssejteket (parodontális ligamentum őssejt, PDLSC) alkalmaztunk. Az volt a célunk, hogy a fogeredetű őssejteket terápiás fehérjét kódoló rekombináns vírussal fertőzzük, hogy utána a sejt kísérleti állatba beadva termelje a fehérjét, amely akár szisztémásan, akár lokálisan kifejtheti a hatását.

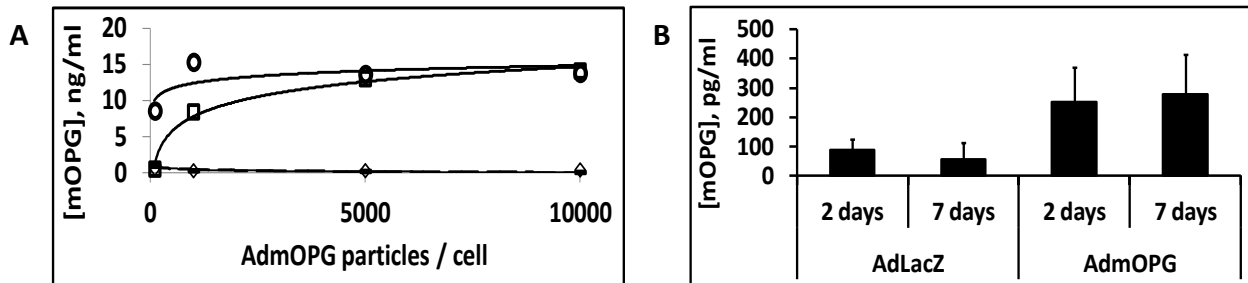
A vírusok és a hPDLSC-k kompatibilitását vizsgálva azt találtuk, hogy a humán parodontális ligamentum őssejtek (PDLSC) ex vivo transzdukciójára az általunk használt vírusok a következő sorrendben alkalmasak: Ad5>>AAV2>AAV6 (2. ábra). Ezért további vizsgálatainkat adenovírus (Ad5) felhasználásával végeztük.



2. ábra: Emberi parodontális ligamentum őssejtek (PDLSC) transzdukciója β -galaktozidázt kódoló különböző rekombináns vírusokkal. A 3. passázsszámú humán PDLSC sejteket 12 lyukú tálcába ültettük 53 000 sejt / cm^2 sűrűséggel. Másnap erre a célra kiültetett lyukakban megszámoltuk a sejteket, és a többi lyukban AAV2nLacZ-vel vagy AAV6nLacZ-vel (300 000 víruspartikulum / sejt), ill. Ad5LacZ-vel (5 000 víruspartikulum / sejt) fertőztük őket, kivéve a kontroll sejteket. Az AAV-vel fertőzött sejteket 3 nappal, az adenovírusal fertőzötteket 1 nappal fertőzés után festettük β -galaktozidázra. Eredményeink alapján a transzdukció hatékonysága: Ad5>>AAV2>AAV6. A mérce 200 μm -t jelöl.

In vitro vizsgálatokhoz AdmOPG (egér oszteoprotegerint kódoló adenovírus, 5000 partikulum/sejt) segítségével fertőztünk humán PDLSC-eket. Eredményeink azt mutatják, hogy az AdmOPG transzdukció dózis- és időfüggő módon emeli az mOPG koncentrációt a sejt kultúra felülszóban (3A ábra).

AdmOPG-vel fertőzött (5000 partikulum/sejt) hPDLSC sejtek (4,15 millió sejt/állat) iv. retroorbitális szinuszba történő beadását követő 2. napon 251 ± 119 pg/ml, a 7. napon 278 ± 136 pg/ml mOPG koncentrációt mértünk, míg AdLacZ-vel fertőzött sejtek esetén a 2. napon 87 ± 39 pg/ml, a 7. napon pedig 57 ± 56 pg/ml értékeket kaptunk (3B ábra).

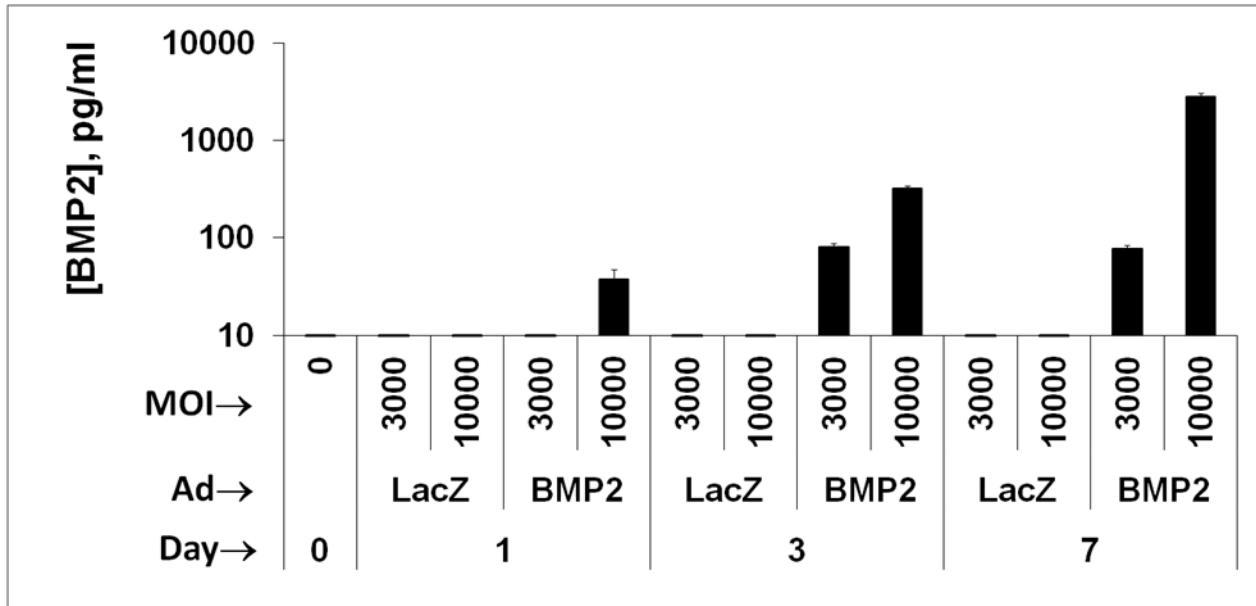


3. ábra: Transzgén mOPG termelése humán fogeredetű őssejtekben. **A:** A PDLSC-eket in vitro AdLacZ-vel fertőztük (rombusz, $\diamond$ és vonal, – jelölések) vagy AdmOPG-vel (négyzet, $\square$ és kör, $\circ$ jelölések) a vízszintes tengelyen jelzett víruspartikulum / sejt dózisokban egy ($\diamond$, $\square$) ill. négy (–, $\circ$) napon át. A sejtekről felülűszót gyűjtöttünk és ELISA kittel mértük az mOPG koncentrációját. **B:** mOPG termelése patkányokban szisztémásan in vivo MSC-mediált adenovírus génterápiával. A PDLSC-eket ex vivo fertőztük egy napon át 5000 víruspartikulum / sejt koncentrációban AdmOPG-vel. Másnap 4,3 millió sejtet adtunk 350–400 g közötti testtömegű patkányoknak szisztémásan retroorbitális injektálással. Kettő, majd hét nap után az állatoktól vért vettünk, és a szérumból ELISA kit segítségével határoztuk meg az mOPG koncentrációját.

Vizsgáltuk humán fogpulpa eredetű őssejtek (DPSC) BMP2-t kódoló adenovírral történő in vitro fertőzhetőségét is, valamint az így nyert, BMP2-t termelő sejtek alkalmazhatóságát in vivo osseointegrációs kísérletekben. Azt találtuk, hogy az adenovírral történő fertőzés akár 7 napon át alkalmazott 10 ezer partikulum/sejt vírusedózis sem csökkentette a DPSC-k életképességét számottevő mértékben, ugyanakkor az AdBMP2 vírussal történő fertőzés dózis- és időfüggő módon indukálta a sejtek BMP2 termelését in vitro (4. ábra). 10 ezer partikulum/sejt dózissal fertőzve 7 nap elteltével 2,8 ng/ml BMP2 koncentrációt mértünk a sejtek felülűszójában. Ez azt mutatja, hogy az AdBMP2 fertőzés segítségével genetikailag módosított DPSC-k terápiásan releváns mennyiségben választanak el BMP2-t a környezetükben. In vivo osseointegrációs kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy vírusedőzéstől függetlenül a DPSC-k behelyezése farokcsigolyába helyezett implantátum mellé rontja az osseointegrációt, ennek alapján felmerül, hogy a terápiás hatásának szánt őssejtek bejuttatására más módot kell választani.

Fent leírt kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy rekombináns vírusokkal ex vivo kezelt mezenchimális őssejtek génterápiás vektorként alkalmazhatók. Az őssejtek alkalmazása a krónikus gyulladásos folyamatokban, mint pl. a parodontitis, azért is előnyös, mivel ismert, hogy

in vivo beadva immunszuppresszív hatással is rendelkeznek, így alkalmasak lehetnek terápiás fehérjék célzott, lokális bejuttatására, emellett a sejtek önmagukban is képesek lehetnek a gyulladásos folyamat kedvező irányba történő befolyásolására. Az immunszuppresszív hatás a megfelelően megválasztott fehérjék expressziója segítségével célzottabbá is tehető, az adott betegségnek megfelelően modulálható is lehet.



4. ábra: A fogeredetű mezenchimális őssejtek adenovirális transzdukciójával hatékonyan termeltethető BMP-2 e sejtekben, ígéretes módját biztosítva a csontregeneráció serkentésének. A jelölt módon a DPSC-eket vagy AdLacZ, vagy AdBMP-2 vírussal fertőztük különböző koncentrációkban (víruspartikulum / sejt, MOI) és időtartamokon keresztül. A BMP-2 koncentrációt a sejt kultúra felülúszókból mértük ELISA kittel.

Kísérletek a makrofágok szerepének vizsgálatára szelektív makrofágdepléción révén

Ismert, hogy a makrofágok egyrészt gyulladásos és egyéb citokinek termelése révén, másrészt pedig a csontfalósejtek előalakjaiként kulcsszerepet játszanak a fogágygyulladásban és az ahhoz kapcsolódó csontvesztésben. Ezért vizsgálni kívántuk, hogy van-e sajátos szerepük a gyulladásos folyamatok modulációjában. Ennek in vivo vizsgálatához tartósan depletálni kell a makrofágokat. Ehhez olyan transzgénikus egérmodellt választottunk, amelyben az emberi diftéria toxin receptor (DTR) expresszióját az Integrin α M (ITGAM, makrofágok felszínén megtalálható fehérje) promótere szabályozza. Mivel az egér diftériatoxin-receptor gyengén, míg az emberi DTR jól köti a diftériatoxint (DT), az emberek érzékenyek a DT-ra, míg az egerek nem. Transzgénikus egerekbe sejt-specifikus promóter szabályozása alatt bevitt emberi DTR esetében az egérnek azon sejtjei lesznek érzékenyek a DT-ra, amelyekben az adott promóter aktív, és így

az emberi DTR kifejeződik. Vagyis az egérből az adott sejttípus DT hatására apoptózis révén szelektíven eliminálódik, amely folyamat viszont a DT adagolásának felfüggesztésével visszafordítható. Az ITGAM-DTR egerekben tehát DT-nal tartósan szelektíven depletálni kívántuk a makrofágokat. A makrofágok depléciója sikeres volt, azonban DT folyamatos adása mellett az állatok néhány nap után elpusztultak, így lehetetlen volt krónikus makrofágdepléciót létrehozni. Ennek valószínű oka, hogy az ITGAM promóter nem elegendően szövetspecifikus. Alternatívaként felmerült vadtípusú egerekbe ITGAM-DTR csontvelő átültetése, azonban előzetes kalkulációt követően úgy találtuk, hogy az ezzel kapcsolatban felmerülő megemelkedett költségek (teljestest besugárzás, steril tenyésztési körülmények stb.) meghaladták volna a jelen pályázatból erre fordítható forrásokat.

Irodalomjegyzék

1. Cirelli, J.A., et al., *AAV2/1-TNFR:Fc gene delivery prevents periodontal disease progression*. Gene Ther, 2009. **16**(3): p. 426-36.
2. Rogers, J.E., et al., *Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis*. J Periodontol, 2007. **78**(3): p. 550-8.
3. Darveau, R.P. and R.E. Hancock, *Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough Pseudomonas aeruginosa and Salmonella typhimurium strains*. Journal of bacteriology, 1983. **155**(2): p. 831-8.
4. Lee, C.H. and C.M. Tsai, *Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation*. Analytical biochemistry, 1999. **267**(1): p. 161-8.
5. Oz, H.S. and D.A. Puleo, *Animal models for periodontal disease*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 754857.
6. Grieger, J.C., V.W. Choi, and R.J. Samulski, *Production and characterization of adeno-associated viral vectors*. Nature protocols, 2006. **1**(3): p. 1412-28.