**Sejtek migrációja**

**Immunológia gyakorlat – 2010.**

**Segédlet a vetített anyag előadásához**

**(Kőhidai László)**

2. A sejtek migrációját számos módon osztályozhatjuk. Egyik leggyakoribb osztályozási elv szerint megkülönböztetünk (i) kineziseket melyek esetében a mozgás iránya nem függ a kiváltó inger koncentrációjától, tehát random és (ii) taxisokat, melyeknél a koncentráció-gradiens jelenléte meghatározó és az elmozdulás vektoriális jellegű.

Kinezisek esetében beszélünk továbbá a mozgás sebességéről (orto), frekvenciájáról (klino) és ad hoc irányáról (kemo) is.

Taxisok esetében a folyadéktérben oldott anyagok által kiváltott (kemotaxis) forma mellett, megkülönböztetjük a felszínhez kötötten kialakuló gradiens által kiváltott mozgást (haptotaxis) és egyes elpusztuló sejtekből felszabaduló anyagok által indukált mozgásokat (nekrotaxis).

5. A kemotaxist kiváltó anyagok hatásuk alapján két fő csoportba oszthatók:

(i) kemoattraktánsok azok, melyek hatására a sejtek a növekvő koncentráció-gradiens irányába mozdulnak el;

(ii) kemorepellensek azok, melyek hatására a sejtek menekülnek, tehát a csökkenő koncentráció-gradiens irányába mozdulnak.

7. A kemotaxist kiváltó anyagok igen széles skálán mozognak. Egészen egyszerű ionok és viszonylag kis molekulák (pl. aminosavak) éppúgy hathatnak erős kemoattraktáns vagy repellens szerként, mint a viszonylag nagy méretűek (pl. kemokinek, szintetikus gyógyszerek)

8. A biológiában, illetve az élettan – kórtan – immunológia területén vizsgálva az egyes kemotaxist kiváltó anyagokat egyértelműen látható, hogy vannak ú.n. professzionális kemoattraktáns molekulák (pl. formil-Met-Leu-Phe, kemokinek, complement 5a).

Fentiek azonban nem zárják ki annak lehetőségét, hogy más molekulák, melyek elsődleges funkciója nem a kemotaxis indukciója, szintén kemoattraktánsak/kemorepellensek legyenek (pl. hormonok)

9. A kemokinek négy alosztályának besorolása a peptidek szerkezetét meghatározó egy, illetve két diszulfid híd elhelyezkedése, illetve a centrális ciszteinek közötti távolság alapján történik.

Funkció szempontjából különösen érdekes a CX3C csoport, mely tagja (i) a C-terminális hidrofób doménje révén a membránba is kihorgonyzódhatnak és ezáltal jó példáját adják a haptotaktikus migrációt indukáló ligandumoknak.

10. A kemokin receptorok is a 7TM receptorok családjába tartoznak. A ligandum kötésében fontos szerepet játszik a receptor N-terminálisan elhelyezkedő extracelluláris lánca, valamint a 2. extracelluláris hurokhoz való kötődés.

Az intracelluláris szignalizációt a trimer G-protein és a receptor 2. intracelluláris hurkán elhelyezkedő DRY szekvencia interakciója indítja be. A rendszer GTP általi aktiválásában a receptor intracellulárisan elhelyezkedő C-terminális láncvége játszik szerepet. E szakasznak foszforilációja béta arrestinnel történő kapcsolódást követően további szignál értékű jelet generál.

11. A magasabb rendű szervezetek esetében számos sejt szerepel az egyes kemokinek célsejtjeinek listáján. Ezek közül klinikai szempontból is a legfontosabbak a dián szereplő neutrofil granulocita, monocita, limfocita, eozinofil granulocita és az erek endotélje.

12. A magasabb rendűekben megfigyelhető fő migrációs mechanizmusok közül jól elkülöníthető az ú.n. (i) mesenchymalis forma, melyben a sejtek polarizálódását az integrinek általi kikötése és a sejtek által termelt extracellulárisan ható proteázok aktivitása határozza meg. (ii) Ettől eltérő a klasszikus amőboid migráció, melyben a környezet vázelemeinek bontása nem játszik jelentős szerepet, valamint (iii) a kollektív migráció, melyben egymással sejtkapcsoló struktúrák által összetartott sejtcsoportok együttes menetelése figyelhető meg.

13. Az immunrendszerben migrációt mutató számos sejtcsoport közül jó példának tűnik az ábrán bemutatott folyamat. Ennek során nyomon követhető egyrészt a DC-progenitor-éretlen DC – érett Ag-prezentáló DC útja, mely a csontvelőből a nem-limfoid szövetek közbeiktatásával jut el az immunszervekben. Az ábra jól mutatja azt, hogy az aktivált T sejtek migrációja és cirkulációja az egyes szervek között szintén fontos része ennek a folyamatnak

15. FAKULTATÍV Denritikus sejtek érpályán keresztül történő migrációja.

Az ábra a DC-k csontvelőből történő kiáramlását követően az egyes célszerveket/szöveteket mutatja az egyes sejttípusok megjelölésével - conventional DCs (cDC), pDC és DC precursor (monociták, HSPC -hematopoietic stem/progenitor cell- és más DC precursorok).

Az ábra célszervenként jelzi a célba juttatást biztosító receptor-ligandum párosokat.

16. A DC-k migrációja a periférián elhelyezkedő szövetekbe – pl. bőrbe. E migráció másik neve – interstitialis migráció, mely a bőrhöz kötött mikrokörnyezetből az afferens nyirokereken át a nyirokcsomókba irányul. Öt jól elkülöníthető lépésre bontható:

1. Mobilizáló jel felismerése
2. Leválás
3. Az interstitiumon keresztüli migráció
4. Megtapadás és belépés a nyirokér lumenébe
5. Vándorlás a nyirokérben centrális irányba

A folyamatot irányító fő kemokinek és receptoraik valamint más irányító molekulák kiemelten az egyes lépések rajza mellett szerepelnek.

17. A DC-k migrációja és hálózatalkotása nyirokcsomón belül.

Az ábra lépésről lépésre jelzi

1. Az afferens nyirokéren keresztüli belépést
2. A subcapsularis sinus-on, illetve a parafollikuláris arean történő áthaladást
3. A nyirokcsomó T/B sejtes area-kba történő migrációt
4. Az efferens nyirokéren keresztüli kilépést
5. A T sejtes zóna /HEV és a DC kapcsolatait

A migráló és rezidens DC-kre ható főbb jelentőségű molekuláris szignálok az egyes lépéseknél az ábrán kiemelten szerepelnek.

18. A dia az ú.n. intravitális mikroszkópia alkalmazhatóságát mutatja migráló DC-k vizsgálatára.

A módszer különösen alkalmas élő állat vagy viszonylag nagyobb szervrészlet fixáló és anticoaguláns szerek adása nélküli vizsgálatára. A módszer lelke maga az extrém gyors záridővel működő kamera.

Segítségével kifejezetten a vascularis folyamatok, pl. sejtek érfalhoz történő adhéziója, érfalon keresztüli transzmigráció vizsgálható.

A jelen példa egy nyirokcsomó metszet esetében mutatja az eltérő színű vitális festékkel jelzett komponensek segítségével a DC-k (piros) vándorlását a strómában és az erek lumenébe történő internalizációjukat.

Ha esetleg akadna, aki a sémás ábrán kékkel jelzett T limfocitákat is látná, kérem szóljon mert én nem látom ☹

19. A posztkapilláris venulákban a limfociták transzmigrációjakor az egyes fázisok kialakulását más-más molekuláris mechanizmusok teszik lehetővé:

1. Rolling - szelektin-szialomucin kapcsolat (vagy integrin alfa4béta1 és alfa4béta7)
2. Aktiválás – az endotél heparánszulfát proteoglikánjai (HSPG) által bemutatott kemokinek a kemokin receptorokkal kapcsolódnak, aktiválják a limfocitákat
3. Adhézió – az aktiválás eredményeként fokozott affinitású és aviditású integrinek jelennek meg a limfociták felszínén. Ezek az endotélen lévő ligandjaikkal (ICAM, VCAM stb.) kapcsolódnak mely az adhéziót szorossá teszi.
4. Diapedesis – a junkcionális adhéziós molekulákkal (JAM, PECAM-1=CD31) történő kapcsolódás az endotélek közötti rések megnyílását és a limfociták transzmigrációját eredményezik.

20. A limfociták migrációja erősen adhéziós molekulák, kemokinek és kemokin receptorok által szabályozott.

- A naiv T sejtek homingja és másodlagos immunszerveken keresztüli recirkulációja lehetséges, mivel integrin alfa4beta7-t (mucosa) és L-szelektint (nyirokcsomók) is expresszálnak.

- Az aktívált T sejtek gyulladás helyére történő migrációja számos receptor-ligand páros kapcsolódását foglalja magába: szelektin-szialomucin, 41-VCAM-1, 41-CS-1, és CD44-hialuronsav.

- A T sejtekből kialakult memória sejtek esetében a megjelenő „homing signature” egy specifikus adhéziós és kemokin receptor profil, mely képessé teszi őket szelektív, szövetspecifikus migrációra.

21. FAKULTATÍV A naív B sejtek ko-expresszálják az L-szelektint és az alfa5béta7 integrint, mely képessé teszi őket arrra, hogy a mucosába és a perifériás nyirokcsomókba egyaránt migrálhassanak. A Peyer plakkok germinális centrumaiban lezajló reakciók a memória B sejtek alfa4béta7 integrin expresszióját idézik elő. Ezek a sejtek azután IgA-t szecernáló plazmasejtekké differenciálódnak. A memória B sejtek döntő hányada azonban a nyirokcsomókból származik és IgG-t szecernáló plazmasejtekké differenciálódik. Ezek a sejtek CXCR4-et, alfa4béta1 integrint és LFA-1-et expresszálnak, melyek a csontvelőbe történő hominghoz szükséges. A csontvelőben ezek a sejtek hosszú-életű plazmasejtekké alakulnak.

23. Az ábra a kemotaxis mérése esetén megkülönböztethető két alapvetően különböző rendszert mutatja, melyek a sejtek mozgástípusától – ld. 3 dimenzióban vagy 2 dimenzióban mozognak-e – függően alkalmazhatók.

Míg a reverzibilis rendszerben a sejtek egy szabad mozgástérben helyezkednek el és az előkísérletek során beállított inkubációs idő alapján határozzuk meg az optimális vizsgálati időt (egyébként nagy a visszaáramló sejtekre az esély), a filterrel elválasztott rendszerekben minimális a sejtek „visszavándorlásának” esélye. Ezekben a rendszerekben a koncentráció gradiens fennmaradása szabja meg meddig is folytatható a kísérlet, amennyiben már a koncentráció gradiens kiegyenlítódött, nem kemotaxist, hanem kemokinetikus aktivitást fogunk mérni.

24. A kemotaxist mutató sejtek aktivitását, a kemotaxis indukálhatóságát számos módszerrel mérhetjük. Az ezek által szolgáltatott információ mennyisége és a módszerek eredményessége azonban nem áll arányban. A legtöbb információt szolgáltató módszer (Dunn-kamra) csak viszonylag kevés sejt mérését teszi lehetővé, míg a receptorkötés vizsgálatok, melyek 106 sejt felett mérnek rendszerint csupán egy adatot szolgáltatnak.

Fentiek is jelzik, hogy a leghatásosabb a több paraméteres vizsgálat, mely számos módszert alkalmazva értékeli a vizsgált anyagot vagy a modell-sejt kemotaktikus válaszkészségét.

Az ábra jobb felső sarkában látható a két koncentrikus gyűrű-szerű kamrából álló Dunn-kamra képe, melyben a fedőlemez alatti migráció a két kamra közötti gáton történik. Előnye, hogy a koncentráció-gradiensek e kamrában kb. 24 óráig változatlanul stabilan megmaradnak.

25. A módszer alapja a kemotaxist végző sejtek nagy hányadára jellemző álláb képződés vizsgálata.

A módszer igen egyszerű: kapillárisok nyílásaiban negatív nyomást alkalmazva sejteket rögzítünk. Az egyik csoportot kemoattraktáns anyagot tartalmazó térben inkubáljuk, míg a másikat referenciának számító közegben vagy gátlószerrel kezelve vizsgáljuk.

Az értékelés sztereomikroszkóppal vagy videomikroszkóppal történik.

26. A módszer igen egyszerű, megfelelően alkalmazva mégis igen megbízható eredményekkel szolgál.

Tenyésztő flaska felszínét ECM peptidekkel fedjük. Ezt követően a flaskát felállítjuk és gondosan ügyelve arra, hogy a fedett felszínt ne érjék, sejteket tartalmazó oldatot töltünk az edénybe és megvárjuk azok kitapadását. A következő lépésben az edény kb. 20 fokos megdöntésével a praktikusan sejtmentes tápfolyadékkal fedjük az ECM-mel fedett felszínt, melyen a sejtek migrációja megindul.

(Mód van arra is, hogy az ECM fedés mellett egyéb molekulákból gradienst alakítsunk ki.)

A rendszer kiértékelése az 5. pontban jelzett hálózatban a sejtek számának meghatározásával történik. Vitális fluoreszcens festékekkel jelzett sejtek alkalmazásakor a kiértékelés automatizálható.

27. A bemutatott agaróz lemezes technika csupán egy a számos hasonló, különböző furatokat és csatornákat alkalmazó kemotaxis assay közül. Bemutatása azért ajánlott mert visszautalhatunk azokra az immunológiában alkalmazott hasonló technikákra, ahol ellenanyag – antitest interakciók bemutatását és mérését végzik hasonló renszerekben.

A módszer kvalitatív jellege mellett a dA és dK távolságok mérésével kvantitatívvá is tehető.

28. A bemutatott módszer talán a legszélesebb körben alkalmazott kemotaxist mérő technika, melyet 1962-ben írt le Boyden.

Elve egy két-kamrás rendszer, melyet a vizsgálandó sejtek számára csak aktív mozgással átjárható filter választ el.

A sejtek a felső kamrában helyezkednek el, míg a vizsgált anyagot az alsó kamrába tesszük. Kellő inkubációs idő megválasztása esetén a sejtek a filter pórusaiban kialakuló koncentráció gradiens mentén az alsó kamrába vándorolnak, ezek száma egyszerű számlálással, vagy pl. egyes sejtekre specifikus enzimek kimutatásával (ld. MTT) határozható meg. A módszer hátránya, hogy egy kara csak egyetlen mérési pontnak felel meg, így megbízható eredményt csak sok kamra együttes alkalmazásakor kapunk.

29. A korábbiakban bemutatott Boyden kamra hátrányait igyekezett kiküszöbölni a transwell assay, melyben egyszerre 6-12-24-96 mérés végezhető. Alapelve hasonló, itt is filter választ el egy sejtekkel telt felső és egy a vizsgáló anyaggal töltött alsó teret. A kiértékelés vagy az alsó térből, vagy magából a membránból történik, az ebbe migrált sejtek ugyanis jól megfesthetők és ez a réteg, mint egy vastag szöveti metszet értékelhető ki.

Hátránya a Boyden kamrával szemben, hogy igen nehéz a sejteket tartalmazó tér és a külső tér közötti folyadéknívó pontos beállítása. Szemmel alig vagy nem is látható eltérések olyan nem kívánt, átmeneti folyadékáramlásokat okozhatnak, melyek szennyezhetik a sejtes teret a vizsgált anyaggal, illetve megnehezítik a gradiens kialakulását.

30. A Chemo Tx módszer egyesíti a Boyden kamra és a transwell rendszerek előnyös tulajdonságait. A légmentesen lezárt tér kiküszöböli a folyadékterek közötti nem kívánt áramlásokat. A huzamosabb ideig használható kamra változat (ld. dia bal felső kép) mellett 2008 óta hozzáférhető az egyszer használatos változat is.

A kiértékelés módja hasonló a Boyden-kamránál leírtakhoz.

31. Az eddig ismertetett módszerek hátránya volt, hogy kevéssé sikerült modellezniük azt a szöveti teret, az erek falát, melyben a sejtek migrációja leggyakrabban végbemegy.

Ezt teszi lehetővé az ábrán bemutatott módszer, melyben endotélből, filterből és ECM rétegből álló, mesterségesen felépített rendszereket használunk.

Mint az ábra is mutatja, a módszer lehetőséget ad mind az ér lumene felőli, mind a külső, kötőszöveti tér felőli migráció vizsgálatára. A módszer kiegészítését jelenti a folyamatosan áramló terek létrehozása, melyek az éren belüli környezet modellezésével teszik teljessé a szisztémát.

32. FAKULTATÍV A bemutatott lemez esetében az eddigiektől eltérő horizontálisan elhelyezett két kamrát használunk. A sejteket a 0.15mikroL térfogatú mérőfelszínre szélesztjük, amelyet azok kb. 12-48h alatt befednek. Ezt követi a piros és kék színnel jelzett két kamra feltöltése vizsgálandó és referencia anyagokkal, majd az inkubációs idő, mely során a mérőfelszínen lévő sejtek az alkalmazott anyagoknak megfelelően fogak elmozdulni.

A módszer kiértékelhető sorozatfotózással, illetve azzal egybekötött ú.n. ‘cell–tracking analysis”-sel, utóbbi esetben számítógépes program követi egyenként a kiválasztott sejtek útját.

33. A kemotaxis vizsgálatok külön fejezetét jelentik a sebgyógyulási vagy ‘wound healing’ assay-k.

Ezekben leggyakrabban hámsejtekből kialakított konfluens rétegek „sértését” követően azt vizsgáljuk, milyen gyorsan közeledik egymás felé a két sebzési felszín.

A módszer kezdetleges és igen bizonytalanul kivitelezhető eljárása volt az, amikor pipetták műanyag csúcsait alkalmazták a „seb” elkészítésére.

A dia egy lényegesen megbízhatóbb technikát mutat be, melyen egyszerre HTS rendszerekben is lehet egymással összemérhető méretű és minőségű folytonossághiányokat előállítani.

Tudnunk, kell, hogy megfelelő erősségű áram rövid ideig alkalmazott impulzusa szintén képes sejtrétegeken „sebeket” ejteni, ezek kiértékelésére az impedancia alapú mérések alkalmazhatók.

34. Egész állat kísérletek során gyakran alkalmazzák a tumoros szövetből előállított ECM koncentrátumot, a Matrigelt, mint a migráló sejtek mozgásának útvonalat adó, a sejteket művi szövetként befogadó hálózatot.

A jelen dia egy olyan korong-assay-t mutat, melyben filterekkel lezárt és Matrigellel és vizsgálati anyaggal töltött korongot implantálunk a kísérleti állatba. Több nap elteltével a korong kivétele után az abba migrált sejtek száma, illetve az egyes sejtpopulációk aránya is meghatározható.

35. FAKULTATÍV A táblázat a Matrigel nevű tumorszövet eredetű ECM keverék felhasználhatósági korlátaira utal.

A gél – előállításából adódóan – tartalmaz számos növekedési faktort, melyek a sejtek migrációját jelentősen befolyásolhatják. Éppen ezért kapható a piacon GFR minőségű, csökkentett növekedési faktorszintű Matrigel is.

36. Az in vivo assay-k közé tartozik az ábrán bemutatott módszer is, mely intraperitoneálisan Sephadex gyöngyöket juttat a kísérleti állatba. A hashártya két lemeze közti térben e gyöngyök erős sejtmigrációt indukáló hatásuknál fogva sejtszaporulatot idéznek elő.

Amennyiben a Sephadex gyöngyök felszínéhez különböző anyagokat kötünk, az anyagok kemotaxist kiváltó hatása is elemezhető.

A kiértékelés 6-48h elteltével a hasűri folyadék leszívásával történik. Ennek sejtszáma és sejtpopulációi jól vizsgálhatók.

37. Az Ivar Giaver Nobel-díjas fizikus által bevezetett módszer a kemotaxis bevezető szakaszának számító sejtadhézió és maga a migráció vizsgálatára is egyaránt alkalmas.

Alapelve szerint, váltakozó áramú áramkörbe kapcsolt mérő elektród esetében az annak felszínén kitapadó sejtek (mint jó szigetelő anyagok) fokozodó ohmikus ellenállást (R) és impedancia (Z) értéket eredményeznek.

Ennek alapján jól mérhetővé válik egyes sejtek adhéziós képessége és annak indukálhatósága vagy gátlása is.

A módszer a kitapadt sejtek esetében képes arra is, hogy az ellenállás értékeinek finom fluktuációját kövesse. Ennek hátterében a sejtek mikromozgásai állnak.

A módszer egyik fő értéke még, hogy az egyes folyamatok real-time követhetők akár több napon át is.

Pont-szerű elektródokat alkalmazva a technika képes konfluens sejtrétegeken pontokban a sejtek eltávolítására (ld. sebzés). Az ezt követő sejtmigráció, mely a felszabadult felszín irányába történik szintén jól követhető, tehát a wound-healing objektív mérési eszköze van kezünkben.

38. A kemotaxist végző sejtek vizsgálatának alapja a folyadéktérben egyenletes gradiensek kialakítása. Ezt teszik lehetővé egy új technika, a mikrofluidika eszközei, melyek polidimetilsziloxán (PDMS) felhasználásával, előre megtervezett csatornarendszerekben hígítják a vizsgálandó anyagokat.

Ezt a PDMS technika képzi az alapját a „lab-on-chip” rendszereknek is, melyek mint ahogyan a név is utal erre komplex laboratóriumi eljárások kivitelezését teszik lehetővé tárgylemez méretű vizsgáló-egységekben. A bemutatott módszer egy olyan PDMS alapú rendszert mutat, melyben horizontális elrendezésben található két kamra, s ezeket egy nyomásviszonyokra érzékeny lemez választja el. A két kamra feltöltését követően, a lemezre gyakorolt szívóerő fokozásával állíthatjuk be az anyagok keveredésének mértékét és ezáltal a gradiens kialakulását.

Ezt követően a középső – gradienst tartalmazó - vályúba helyezve a sejteket, jól vizsgálható azok koncentráció-függő migrációja.

Az ábra alsó része a PRMS technika fő lépéseit mutatja, azt, hogy pl. a jelen esetben alkalmazott két profil hogyan önthető ki.

39. A bemutatott eljárás ma a mozgó sejtek elmozdulás-vizsgálatára használt egyik legérzékenyebb technika. Elvi alapját az amőboid mozgással migráló sejt és a kitapadási felszín között képződő erők képezik, tehát az, hogy a sejt a fokális kontaktusok révén az egyes kitapadási helyeken a mozgás során erőt fejt ki az alatta lévő rétegre. Az erők a mozgás felszínét borító mikrotűk sokaságával válnak mérhetővé – azok meghajlásának iránya az elmozdulás negatív vektorát, az elhajlás mértéke a kifejtett erő nagyságát mutatja. Utóbbi emberi fehérvérsejtek esetében a nN-os (nano Newton) skálán mozog.