

Joanna Pastwińska

**Regulacja procesu adhezji komórek tucznych  
do składników macierzy pozakomórkowej  
w warunkach niedoboru tlenu**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

Zakład Mikrobiologii i Immunologii Doświadczalnej  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi /  
Pracownia Immunologii Komórkowej  
Instytut Biologii Medycznej PAN

Promotor pracy:

Prof. dr hab. Jarosław Dastyk

– Łódź 2022 –

## STRESZCZENIE

Zapalenie jest istotnym mechanizmem obronnym organizmu, który do prawidłowego przeprowadzenia wymaga współpracy różnych komórek ludzkiego organizmu. Do wytworzenia reakcji zapalnej niezbędne są również określone procesy komórkowe takie jak adhezja, aktywacja komórek odpornościowych oraz ich migracja. Adhezja jest nie tylko ważna ze względu na budowę tkanek i organów, ale również umożliwia komórkom układu odpornościowego docieranie do miejsc objętych stanem zapalnym. Do składników macierzy pozakomórkowej, które umożliwiają adhezję komórkową, należą kolageny, elastyna, fibronektyna, laminina, witronektyna, kwas hialuronowy oraz metaloproteinazy macierzy. Komórki tuczne ze względu na swoją lokalizację w tkankach, a także dzięki licznym mediatorom prozapalnym i przeciwzapalnym, które są przez nie produkowane i wydzielane, pełnią ważną rolę w inicjowaniu, utrzymywaniu oraz wygaszaniu zapalenia. Komórki tuczne wykazują na swojej powierzchni ekspresję licznych receptorów adhezyjnych, głównie z rodziny integryn. Hipoksja jest związana ze stanem zapalnym i może zmieniać ekspresję receptorów adhezyjnych, prawdopodobnie wpływając na adhezję komórek odpornościowych. Do tej pory niewiele było wiadomo na temat roli obniżonego ciśnienia parcjalnego tlenu w regulacji adhezji komórek tucznych. W pracy badano działanie hipoksji na adhezję ludzkich komórek tucznych do wybranych składników macierzy pozakomórkowej i ekspresję receptorów adhezyjnych w tych komórkach, a także poszukiwano mechanizmów warunkujących zależną od hipoksji zmianę w adhezji komórek tucznych do fibronektyny i kwasu hialuronowego.

W toku pracy wykorzystano ludzką linię komórek tucznych LAD2 i hodowlę komórkową w wyspecjalizowanej komorze z możliwością ścisłego regulowania stężenia tlenu. Procent adherujących komórek LAD2 był określany w teście adhezji przez pomiar kwaśnej fosfatazy uwalnianej z lizowanych komórek. Do oceny ekspresji mRNA zastosowano technikę RT-qPCR, zaś ekspresję powierzchniową receptorów badano za pomocą cytometrii przepływowej. Używano też metody *Western blot* do pomiaru aktywności wybranych ścieżek sygnałowych.

Stwierdzono, że hipoksja wpływa na regulację adhezji komórek tucznych, a efekty mogą być przeciwstawne w zależności od składnika macierzy pozakomórkowej oraz wchodzącego z nim w interakcję receptora. Komórki LAD2 adherowały do fibronektyny w zwiększonej ilości, kiedy były ekspozowane na niedotlenienie,

podczas gdy w tych samych warunkach traciły niemal całkowicie zdolność adhezji do kwasu hialuronowego. W pierwszym przypadku, wzrostowi adhezji nie towarzyszyły zmiany ekspresji mRNA oraz powierzchniowej integryny  $\alpha 5\beta 1$ , a zmiana aktywności tej integryny zależna była od procesu regulacji integryn znanego jako „*inside-out signaling*” i ścieżki sygnałowej PI3K/Akt, która była aktywowana przez hipoksję. W drugim przypadku, zanik adhezji na skutek obniżonego stężenia tlenu mógł wynikać ze zmian konformacyjnych receptora CD44, który wchodzi w interakcję z kwasem hialuronowym. Powyższe obserwacje wspierają pogląd, że hipoksja może odgrywać znaczącą rolę w napływie komórek tucznych do tkanki objętej procesem zapalnym poprzez regulację adhezji tych komórek do macierzy pozakomórkowej.

## SUMMARY

Inflammation is an essential defense mechanism in the body that for proper function requires the collaboration of various cells. Certain cellular processes such as adhesion, activation of immune cells and their migration are necessary to generate an inflammatory response. Adhesion is not only important for the structure of tissues and organs, but also helps cells reach inflammatory sites. The components of the extracellular matrix that enable efficient adhesion, include collagens, elastin, fibronectin, laminin, vitronectin, hyaluronic acid and matrix metalloproteinases. Due to location in tissues, as well as numerous pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators that are produced and secreted, mast cells play an important role in initiating, maintaining and extinguishing inflammation. Mast cells express on their surface numerous adhesion receptors, mainly within the integrin family. Hypoxia is associated with inflammation and may alter the expression of adhesion receptors possibly affecting adhesion of immune cells. Little is known about the role of reduced oxygen partial pressure in regulating mast cell adhesion. Taking into account the literature data, it was decided to assess the effect of hypoxia on mast cell adhesion by focusing in particular on: (1) adhesion of human mast cells to selected components of the extracellular matrix under hypoxic conditions; (2) expression of specific adhesion receptors under the influence of oxygen deficiency; (3) investigating the mechanism behind the hypoxia-dependent change in adhesion to fibronectin and hyaluronic acid.

In the course of the work, the human LAD2 mast cell line cultured in specialized chamber with the ability to precisely regulate the oxygen concentration were used.

The percentage of the adhering LAD2 was determined in an adhesion assay by measuring acid phosphatase released from lysed cells. The RT-qPCR technique was used to evaluate the mRNA expression of selected genes, while the surface expression of receptors was assessed by flow cytometry. Western blot was used to analyze state of selected signaling pathway involved in the regulation of LAD2 cell adhesion to fibronectin.

It was found that hypoxia influences mast cell adhesion, and the effects may be opposite depending on the extracellular matrix component as well as the receptor interacting with it. LAD2 adhered to fibronectin in an increased amounts when exposed to hypoxia, while under the same conditions they almost completely lost their adhesion to hyaluronic acid. In the first case, the increase in adhesion was not accompanied by a change in mRNA and surface expression of the  $\alpha 5\beta 1$  integrin, but an inside-out signaling pathway was engaged, resulting in the activation of cell surface receptors. Moreover, hypoxia directly affected the PI3K/Akt signaling. In the second case, the loss of adhesion due to decreased oxygen concentration could also result from conformational changes of the CD44 receptor, which interacts with hyaluronic acid. The above observations support the idea that hypoxia regulates mast cell adhesion to extracellular matrix and this process may play a role in the influx of mast cells into the inflamed tissue.