

Doktori (PhD) értekezés tézisei

ZBTB46 ÉS RUNX3 ÁLTAL VEZÉRELT SEJTDIFFERENCIÁCIÓ
PLURIPOTENS EMBRIONÁLIS ÓSSEJTEKBŐL KIINDULVA

Botó Pál

Témavezető: Dr. Szatmári István PhD



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2022

ZBTB46 ÉS RUNX3 ÁLTAL VEZÉRELT SEJTDIFFERENCIÁCIÓ PLURIPOTENS EMBRIONÁLIS ÖSSEJTEKBŐL KIINDULVA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudomány tudományágban

Írta: Botó Pál okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Szatmári István, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Purity Melinda, PhD
Dr. Kókai Endre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, MTA doktora
tagok: Dr. Apáti Ágota, PhD
Dr. Vámosi György, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, Élettudományi Épület, F003-004 előadó, 2022.december 14., 12:00 óra.

Bevezetés

Az immunterápia hatékony eszköz lehet a szolid tumorok és a vérképzőszervi daganatok kezelésében. Továbbá ez a megközelítés alkalmazható az autoimmun betegségek és a gyulladásos rendellenességek enyhítésére is. Például az immun checkpoint inhibitor antitestek felhasználhatók a T-sejtes immunválasz elősegítésére azáltal, hogy antagonizálják a gátló szignálokat (például PD1/PD-L1 vagy CTLA-4). Érdekes módon ezeknek az checkpoint blokkoló antitesteknek az alkalmazása során számos daganattípusban tartós immunválaszt észleltek. Ezenkívül az adaptív sejterápiák alkalmazhatók tumorba infiltráló limfociták vagy perifériás T-sejtek felhasználásával. Ezek a limfociták úgy alakíthatók, hogy T-sejt-

receptorokkal vagy kiméra antigén-receptorokkal (CAR) célozzák meg a rákspecifikus antigéneket. Érdeemes megemlíteni, hogy a CD19-et célzó CAR T-sejtekkel végzett klinikai vizsgálatok 90%-os remissziót mutattak az akut B limfoblasztos leukémiában szenvedő betegeknél, ami jelzi e sejtalapú terápiás megközelítésben rejlő kiemelt potenciált. E PhD tézis témájához még inkább kapcsolódik, hogy az *ex vivo* létrehozott dendritikus sejtek (DC-k) tumorantigénekkal tölthetők fel, és visszainjektálhatók rákos betegekbe a daganatellenes immunválasz beindítása céljából. Néhány ilyen DC-alapú vakcina ígéretes klinikai eredményeket mutat.

A DC-eket általában a perifériás vér monocitáinak *in vitro* differenciálásával állítják elő immunterápia céljából. A begyűjtött monociták száma azonban korlátozott, és ezeknek a sejteknek a DC-differenciálódási képessége a donortól függően változik. A monocitákkal ellentétben a pluripotens embrionális őssejtek (ESC) korlátlan önmegújító és széles differenciálódási képességük miatt kimeríthetetlen forrást jelentenek az immunsejt alapú terápiákhoz. Az ESC-eredetű DC-k (ES-DC) jól definiált protokollok segítségével *ex vivo* differenciálással készíthetők. Azonban továbbra is kihívást jelent az ESC-k funkcionális sejtekké történő differenciálódása, mivel a végtermékek gyakran embrionális típusú vagy éretlen sejteket reprezentálnak. Az ESC-eredetű sejtekben az embrionális fejlődési programok könnyen aktiválódnak, azonban ezek a génszabályozó hálózatok általában nem garantálják a teljesen érett, funkcionális sejtek kialakulását. A megfelelő éréshez további lépésekre van szükség, amelyek hiányoznak a meglévő *in vitro* differenciálási protokollokból.

A genetikailag kódolt eszközök, például az ektopikusan expresszált transzkripciós faktorok lehetővé teszik az *ex vivo* generált immunsejtek érésének fokozását. Például a pluripotens őssejt-eredetű vérsejtek fejlődése fokozható transzkripciós faktorokkal. Kutatási munkámban két DC-specifikus transzkripciós faktor (RUNX3 és ZBTB46) hatását vizsgáltam a pluripotens ESC-k DC-kké történő *ex vivo* differenciálódása során.

Célkitűzések

Az ES-DC differenciálódás optimalizálás érdekében előzetesen megvizsgáltuk az egér ESC-kből származó DC-generálás hatékonyságát. Azt találtuk, hogy az ES-DC-k DC-specifikus sejtfelszíni markerei alacsonyabb expressziót mutattak LPS-kezelés után, mint a csontvelőből származó DC-k (BM-DC-k). Ezenkívül néhány DC-specifikus transzkripciós faktor alig volt

detektálható ES-DC-kben. Ezen adatok alapján célul tűztük ki a DC fejlődés két fontos szabályozójának, a RUNX3 és ZBTB46 transzkripciós faktorok hatásának vizsgálatát egér ESC eredetű DC progenitorokban.

Célunk volt felmérni az e faktorok által befolyásolt ES-DC-k fejlődési és immunológiai tulajdonságait, valamint génexpressziós elemzést végezni a következők feltárására:

- a RUNX3 vezérelt ES-DC maturációs folyamat jellemzése
- a RUNX3 moduláló szerepének feltárása az ES-DC-k T-sejt aktiváló és migrációs képességére
- a ZBTB46 hogyan befolyásolja a korai ESC-mezodermális átmenetet és a mieloid sejtek fejlődését
- hogyan modulálja a ZBTB46 a sejtciklust és az ESC-k proliferációját
- hogyan változtatja meg a ZBTB46 az ESC-ből származó progenitorok globális génexpressziós mintázatát
- a ZBTB46 hatása az ESC eredetű erythroid sejtek fejlődésére

Anyagok és módszerek

Embrionális őssejttenyésztés

A mitomicin C-vel (Merck) kezelt MEF (egér embrionális fibroblaszt) sejteket alkalmaztunk dajka sejtekként az ESC-k fenntartásához knockout DMEM-ben (Thermo-Fisher Scientific), amely 1000 U/ml LIF-et (leukémia gátló faktort, Merck), 15% FBS-t (fötális borjúsérumot, Thermo-Fisher Scientific), 100 µg/ml sztreptomicint és 100 U/ml penicillint (Merck) tartalmazott.

A transzgenikus sejtek differenciálódás előtti expanziója és újraszelekciója során az egér ESC-eket MEF sejtek nélkül tenyésztettük knockout DMEM-ben (Thermo Fisher Scientific) 15% FBS (Thermo Fisher Scientific) és 1000 U/ml LIF (Merck) 200-300 µg/ml G418 (Geneticin, Thermo Fisher Scientific) jelenlétében.

Mezodermális és mieloid sejt differenciáció

A sejtátalakítás elősegítése céljából az ESC-eket OP9 stromasejtekkel ko-kultúrában tenyésztettük. Az első szakaszban α -MEM (Thermo-Fisher Scientific), 20% FBS-el (Thermo-Fisher Scientific), 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel (Merck) kiegészített sejttenyésztő médiumot használtunk. Az 5. napon a differenciált sejteket 0,25%-os tripszin-EDTA (Thermo-Fisher Scientific) segítségével gyűjtöttük össze, majd 3-6 napig tenyésztettük tovább új OP9 sejtréteget használva α -MEM médiumban, amely 20% FBS-t, 50 ng/ml GM-CSF-et (PeproTech) és 50 µM 2-ME-t (β -mercaptoethanol; Merck) tartalmazott.

Az embryoid body differenciálódását (EBD) IMDM (Thermo-Fisher Scientific) sejttenyésztő tápközeg segítségével végeztük, amelyet 15% FBS-sel, 200 ng/ml vassal telített transferrinnel (Sigma), 4,5 mM monotioglycerollal (Sigma Aldrich) és 50 ng/ml aszkorbinsavval (Sigma) egészítettünk ki. Az ESC-eket begyűjtöttük és EBD médiumba hanging drop technikával fordított bakteriális tenyésztőedényekben tenyésztettük. A 2. napon az EB-eket begyűjtöttük, és 6 cm-es tenyésztőedényekbe transzferáltuk át és alacsony sebességű orbitális rázógépre tettük, hogy elkerüljük a sejtek tenyésztőedényhez tapadását. A sejteket a 4. vagy a 6. napon gyűjtöttük be. Egyes kísérletekben a begyűjtött sejteket 3 napig tovább tenyésztettük OP9 sztrómasejt rétegen 6 lyukú sejttenyésztő edényben 20% FBS, 50 ng/ml GM-CSF és 50 µM 2-ME tartalmú α -MEM médiumban.

A csontvelősejtek izolálása és differenciálódása

Egér BM sejteket izoláltunk 12 hetes hím C57BL/6 vagy 129S1 állatokból. A BM-DC differenciálódáshoz 500 000 BM sejtet tenyésztettünk 9 napon keresztül 10% FBS-t (Life Technologies), GM-CSF-et (50 ng/ml) és 2-ME-t (50 μ M) tartalmazó RPMI tápközegben 6 lyukú szövettenyésztő edényben. A DC aktiváció elősegítésére a tápközeget friss RPMI-vel helyettesítettük a 8. napon, és a sejteket 100 ng/ml LPS-sel kezeltük.

Kémiaailag indukálható ESC vonalak előállítása

Kémiaailag indukálható egér ESC vonalak létrehozására olyan célvektorokat (p2lox) hoztunk létre, amelyek az egér Irf8, Zbtb46, EGFP vagy bi-cisztronos Zbtb46-T2A-EGFP kódoló szekvenciáit tartalmazzák. Kémiaailag indukálható sejtvonalak előállításához génmódosított egér ESC vonalat (ZX1) használtunk. Röviden, a p2lox célvektort ZX1 (genetikai háttér: 129/OlaHsd) ESC-kbe transzfektáltuk elektroporációval. Az elektroporációs lépést követően a sejteket előzőleg elkészített genecin/neomicin rezisztens MEF (EmbryoMax, Merck) rétegre helyeztük, majd a rezisztens sejteket kémiai szelekciónak tettük ki 8 napon keresztül 300 μ g/ml G418-at tartalmazó knockout DMEM-ben.

A transzgenikus ESC vonalak jellemzése

Az előállított sejtklónok indukálhatóságának értékelésére az egér ESC-eket 2 napig tenyésztettük 15% FBS (Thermo Fisher Scientific), 1000 U/ml LIF-fel (Merck), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml sztreptomycin (Merck) tartalmú knockout DMEM-ben (Thermo Fisher Scientific), és 1 μ g/ml doxiciklinnel kezeltük 72 órán keresztül. A transzgén indukálhatóságát kvantitatív real-time PCR segítségével határoztuk meg, vagy intracelluláris ZBTB46 jelölést követően áramlási citometriával analizáltuk.

mRNS szekvenálás

Az mRNS szekvenálás végrehajtásához Illumina platformot használtunk. A total RNS-t TRI-reagenssel nyertük ki. A könyvtárkészítés Ultra II RNA Sample Prep kit (New England BioLabs) segítségével történt, a gyártó ajánlásait követve. A szekvenálási futtatásokat Illumina NextSeq 500-on végeztük egyvégű 75 ciklusos szekvenálás használatával. A Debreceni Egyetem, ÁOK, BMBI, Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriuma végezte a könyvtárkészítést, a szekvenálást és az alap bioinformatikai feladatokat.

RNS izolálás és kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A total RNS kinyeréshez és tisztításhoz TRI reagenst használtunk. A reverz transzkripciót High-Capacity cDNA RT Kit (Thermo-Fisher Scientific) segítségével végeztük. A kvantitatív valós idejű PCR-reakciókat Roche LC480 vagy LC96 platformon hajtottuk végre a következő kondíciók mellett: 1 ciklus (denaturációhoz) 95 °C-on 60 másodpercig; 40 ciklus 95 °C-on 10 másodpercig és 60 °C-on 30 másodpercig Taqman (Thermo Fisher Scientific) hidrolízis próbákkal. Komparatív threshold ciklus módszert alkalmaztunk az ActB-re normalizált relatív génexpresszió meghatározásához.

Western blot

A 40 000 sejt/mintából kivont fehérjék elektroforetikus elválasztását 10%-os poliakrilamid géllal végeztük, majd a mintákat PVDF membránra transzferáltuk (Pall Corporation). Anti-IRF8 poliklonális antitestet (ab245607, 2000-szeres hígítás, Abcam) és anti-GAPDH monoklonális antitestet (AM4300, 2000-szeres hígítás, Thermo-Fisher Scientific) használtunk a fehérjék kimutatására.

Áramlási citometria és sejt szétválogatás

A BD FACS Aria III-at (BD Biosciences) használtuk az áramlási citometriás elemzésekhez és a sejt szétválogatáshoz. A következő anti-egér antitesteket használtuk a jelölések során: CD45-FITC (30-F11), CD11b-BV711 (M1/70), Flk-1(CD309)-BV421 (Avas 12 α 1), MHC2-FITC (I-A/I-E; A2G9), CD80-APC (16-10A1) és CD86-APC (GL1), melyek a BD Biosciences-től származtak. Az F4/80–Alexa Fluor 488 (BM8) antitestet az eBioscience-től (San Diego, CA) szereztük be. Sejt szétválogatás (sorting) céljából 1 millió sejtet gyűjtöttünk össze és jelöltünk anti-egér Flk1 antitesttel, majd 50 000-100 000 Flk1+ sejtet válogattunk szét. Az intracelluláris ZBTB46 festéshez Transcription Factor Buffer Set-et (BD Biosciences) használtunk a gyártó ajánlásai szerint, a festést egér elleni ZBTB46-PE (U4-1374) antitesttel végeztük sejtfelszíni jelölés után.

Mágneses sejtszeparálás (MACS)

A Flk1+ mezoderális sejteket anti-CD309 mágneses Microbead Kit (Miltenyi Biotec) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint.

Sejtciklus és apoptózis vizsgálat

Az apoptózis kimutatási vizsgálatot a FITC Annexin V Apoptózis Detektáló Kit segítségével végeztük propidium-jodiddal (Biolegend) a gyártó utasításai szerint.

Propidium-jodiddal végzett DNS-festést alkalmaztunk a sejteloszlás meghatározására a megfelelő sejtciklus-kompartmentekben. A begyűjtött mintákat 70%-os etanollal fixáltuk, majd mosás után 50 µl RNáz (100 µg/ml) és 200 µl propidium-jodid (20 µg/ml) oldattal kezeltük. A mintákat BD FACS Aria III készüléken elemeztük.

Hematopoietikus kolóniaképző assay

Az ES-eredetű sejtek kolóniaképző potenciáljának felmérésére Colony Forming Unit (CFU) assay-t alkalmaztunk Methocult GF M3434 félszilárd médiumot (Stemcell Technologies) alkalmazva. A telepeket EVOS XL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) mikroszkóp segítségével 8 napos tenyésztés után azonosítottuk és számoltuk meg. Az ESC eredetű progenitorokban a következő típusú vérsejt kolóniákat mutattuk ki: erythroid, GM (granulocita és makrofág) és GEMM (granulocita, erythrocyta, makrofág és megakariocita).

Statisztikai analízis

A statisztikai szignifikancia értékelésére és kiszámítására Student-féle t-próbát (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) használtunk.

DC migrációs assay

Transwell migrációs assay-t használtunk a CCL19 (C-C motif chemokine ligand 19) és CCL21 (C-C motif chemokine ligand 21) kemokinek által indukált DC migráció tanulmányozására. A vizsgálat során 24 lyukú, 5 µm pórusméretű tenyésztőedényeket (Corning-Sigma) használtunk.

T-sejt proliferációs elemzés

A T-sejteket 12 hetes hím BALB/c egerek lépéből izoláltuk a Miltenyi Pan T cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) alkalmazásával. Az allogén MLR-hez (Mixed Leukocyte Reaction) 10^3 vagy 10^4 ES-DC-t (genetikai háttér: 129/OlaHsd) stimulátorként tenyésztettünk együtt 10^5 T-sejttel 96 lyukú, kerek aljú tenyésztőedényben 5 napon keresztül. BrdU-t (5-bróm-2'-deoxiuridin) adtunk a tenyésztés utolsó 12 órájában. A BrdU beépülését Cell Proliferation Assay kit-tel (Merck) értékeltük a gyártó ajánlásai szerint.

Eredmények

A RUNX3 fokozza a DC maturációt

Az ES-DC fejlődés folyamatának megértése érdekében, kollégáim korábban megvizsgálták az eger ESC-kból történő DC generálás hatékonyságát, és elemezték a kapott antigénprezentáló sejtek fenotípusát. Érdekes módon két DC maturációs marker (MHCII és CD80) gyengén expresszálódott LPS hatására ES-DC-kben (kevesebb, mint 25% MHCII/CD80+ sejtet lehetett detektálni). Ezzel szemben a BM-DC-ből származó sejtek több, mint 50%-a MHCII/CD80+ volt. Megfigyelték azt is, hogy az LPS-aktivált ES-DC-k heterogén CD86 expressziót mutattak, viszont az LPS-sel kezelt BM-DC-k többsége CD86+ volt. Megjegyzendő, hogy mind a CD80, mind a CD86 DC-specifikus maturációs markerek, amelyek a T-sejtek aktiválásához és túléléséhez szükséges ko-stimulációs szignálokat biztosítanak. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az ES-DC-k egy különálló mieloid sejtípust képviselnek, korlátozott maturációs kapacitással. Ezen immunsejtek további jellemzésére az ES-DC-kben található számos transzkripciós faktor mRNS szintjét közvetlenül összehasonlítottuk a BM-DC-ekkel. Takács Erika elemzése rámutatott, hogy három gén (*Spi-B*, *Irf4* és *Runx3*) szignifikánsan alacsonyabb expresszióval rendelkezik az ES-DC-kben, mint a BM-DC-kben. A transzkripciós profilnak megfelelően a RUNX3 fehérje kimutatható volt BM-DC-kből, ezzel szemben ez a transzkripciós faktor alig volt detektálható az ES-DC-kből. Ez az eltérő génexpresszió arra késztetett bennünket, hogy kémiai indukálható transzgenikus ESC-k segítségével teszteljük a RUNX3 transzkripciós faktor hatását ES-DC-kben és progenitorokban.

Ebben a vizsgálatban először a transzgenikus Runx3 hatását teszteltük az *ex vivo* DC differenciálódás későbbi szakaszában. Ezt a transzkripciós faktort az 5. és a 19. nap között indukáltuk, és a sejteket LPS-sel is kezeltük a 18. napon, hogy érett DC-eket hozzunk létre, és fokozzuk aktivációjukat. Az ESC-ből származó terminálisan differenciált DC-ink maturációs kapacitásának jellemzésére a 19. napon mértük MHCII és CD80 expressziós mintázatukat. Várakozásainknak megfelelően emelkedett MHCII/CD80 duplapozitív szubpopulációt figyeltünk meg az LPS kezelés hatására. Bár ezek a sejtek még mindig alacsonyabb MHCII/CD80 expressziót mutattak, mint a BM-DC-k, eredményeink az ESC-ből származó DC-k fokozott maturációs potenciálját jelzik, az *ex vivo* RUNX3 hatására.

Az ES-DC-k fokozott migrációs kapacitása és T-sejt aktiváló potenciálja a RUNX3 által

Ezután megvizsgáltuk, hogy a RUNX3 képes-e modulálni az ESC-ből származó DC-k funkcionális tulajdonságait. Transwell migrációs assay segítségével megmértük sejtjeink CCL19/CCL21 alapú migrációs potenciálját. Adataink azt mutatták, hogy a RUNX3 által vezérelt ES-DC-k migrációs potenciálja jelentős volt, a RUNX3 nélküli ES-DC-k azonban még CCL19 és CCL21 jelenlétében is alig migráltak. Összehasonlításként értékeltük a BM-ből származó DC-k migrációs kapacitását is. Meglepő módon ezek a sejtek magasabb szintű migrációs potenciált mutattak még a fent említett citokinek hozzáadása nélkül is. Eredményeink a RUNX3 vezérelt ES-DC-k megnövekedett migrációs potenciálját mutatták, azonban ennek a sejtfunkciónak a szintje még mindig a BM-DC-k által meghatározott referenciaszint alatt volt. Végül MLR reakcióval feltérképeztük a *Runx3* transzgenikus ES-DC-k T-sejt aktiváló képességét. Ezekben a kísérletekben az ES-DC-eket más genetikai háttérű T-sejtekkel együtt tenyésztettük (allogén stimuláció). A megnövekedett migrációs potenciállal összhangban fokozott T-sejt proliferációs rátát észleltünk a *Runx3* indukcióra adott válaszként ES-DC-kben. Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a RUNX3 fokozza az ESC-eredetű antigénprezentáló sejtek migrációs potenciálját és T-sejt aktivációs képességét. Az ES-DC-k funkcionális és fenotípus elemzése azt mutatta, hogy a *Runx3* bekapcsolása fokozza az ESC-ből származó DC-k immunogén tulajdonságait. Az a megfigyelésünk, hogy a RUNX3-al átprogramozott ES-DC-k immunogenitása alacsonyabb szintű a BM-DC-kkel összehasonlítva, további transzkripciós faktorok tesztelésére készítetett bennünket.

ZBTB46-függő csökkent mieloid sejt differenciálódás

Munkatársaink 17 különböző DC specifikus transzkripciós faktor mRNS expressziós szintjét hasonlították össze ESC eredetű ex vivo generált DC-kben. Ezen faktorok némelyike magas mRNS expressziót mutatott, más transzkriptumok azonban alig detektálható mértékben fejeződtek ki. A RUNX3-hoz hasonlóan a ZBTB46, mely egy konvencionális dendritikus sejt (cDC) marker, alig expresszálódott ES-DC-kben és előalakjaikban. Ezért kísérleteink során arra is törekedtünk, hogy feltárjuk ennek a transzkripciós faktornak az ES-DC differenciációban betöltött szerepét, hasonló funkciónyerő (gain of function) megközelítéssel, mint a RUNX3 vizsgálatnál. Mindezért kémiai indukálható, *Zbtb46* transzgént expresszálni képes klónt hoztunk létre. Két ESC klónt (C2 és C4) választottunk ki, melyeket expandáltunk és jellemeztük. Kísérleti adataink azt mutatják, hogy a *Zbtb46* mRNS expressziós szintje 3 napos doxiciklin kezelés után erősen emelkedett, és a ZBTB46 fehérjeszinten is sikeresen kimutatható volt az indukált sejtek 95%-ában. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a ZBTB46

transzkripciós faktor egyöntetűen és erőteljesen indukálható ESC alapú transzgenikus rendszerünkben. Az újonnan generált klónok validálási folyamatát az *ex vivo* ESC differenciálódási vizsgálata követte. Az ES-DC progenitorok előállításánál a transzgén túltermelése az 5. napon kezdődött, és a progenitor sejteket 3 különböző időpontban gyűjtöttük be: a 8., a 11. vagy a 14. napon. Érdekes módon a CD45⁺/CD11b⁺ frakciót jelentősen csökkentette a ZBTB46 bekapcsolása az ESC-eredetű sejteink 8 napos differenciált állapotában. Érdemes megemlíteni, hogy a CD45 egy receptorhoz kötött protein tirozinfoszfátáz, amely minden leukocitán expresszálódik, beleértve a mieloid sejteket is. Ezzel szemben a CD11b mieloid sejt-specifikus marker. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a ZBTB46 erős represszív hatást gyakorol a sejtek mieloid fejlődésére. Fontos kiemelni, hogy a 11 és 14 napos differenciált progenitorok szintén csökkent mieloid potenciált mutattak.

Ezt követően teszteltük a ZBTB46 hatását az EB-kből származó progenitorokban is. Ezeket a háromdimenziós sejtaggregátumokat 6 napig növesztettük, és az EB-eredetű progenitorokat tovább tenyésztettük OP9 sejtekkel 3 napig. A monolayer differenciálódáshoz hasonlóan az EB-ből származó sejtek is kevésbé alakultak át CD11b⁺/CD45⁺ mieloid vérsejteké ZBTB46 jelenlétében. Ezek az eredmények tovább erősítik a ZBTB46 általános mieloszuppresszív szerepét az általunk vizsgált egér ESC-eredetű transzgenikus rendszerünkben.

A ZBTB46 gátolja a mieloid fejlődést mezodermális sejtekből kiindulva

Ezt követően megvizsgáltuk a *Zbtb46-ot* expresszáló, transzgenikus sejtvonalaink korai mezodermális fejlődését a differenciálódás 3-5. napja között. Eredményeink azt mutatták, hogy a *Zbtb46* indukálása az 5. napon az Flk1⁺ sejtkepződés jelentős csökkenését eredményezte, ami arra utalhat, hogy ez a transzkripciós faktor nem csak a mielopoézist, hanem az ESC-mezodermális átmenetet is negatívan befolyásolja. Továbbá ez a megfigyelés felvetette, hogy a mieloid sejtkepző potenciál korlátozottsága a mezodermális sejtfejlődés károsodásának lehet a következménye, mivel az 5 napig differenciált sejteink között még lehetnek pre-mezodermális állapotban lévő sejtek, amelyek nem tudnak Flk1⁺ mieloid prekursorokká átalakulni. Ezen lehetőség tesztelésére 5 napig differenciált Flk1⁺ sejteket tisztítottunk MACS technológiával, és 3 napig feeder sejtek nélkül differenciáltunk a transzgenikus *Zbtb46* jelenlétében. Meglepő módon, hasonlóan a mágneses szeparálás nélküli sejtekhez, a CD45-öt expresszáló sejtek aránya nagymértékben lecsökkent ZBTB46 jelenlétében a mágnesesen elválasztott Flk1⁺ mieloid prekursorokban. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a már mezodermálisan elkötelezett sejtek sem képesek hatékonyan átalakulni mieloid formákká ZBTB46 jelenlétében. Továbbá azt is megállapítottuk, hogy a ZBTB46 által vezérelt

A ZBTB46 indukálta antiproliferatív hatás

A ZBTB46 által vezérelt ES sejtdifferenciáció korábban feltárt attribútumai mellett a transzkripciós faktor hatására megváltozott sejtszám is a tenyészetekben. A 0-5. nap, illetve a 8. és 11. nap között alacsonyabb sejtszámot detektáltunk *Zbtb46* indukció esetén. Továbbá ez a jelenség még a differenciálatlan ESC tenyészetekben is megfigyelhető volt a *Zbtb46* bekapcsolásakor. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a ZBTB46 befolyásolja a sejtek életképességét és/vagy proliferációs kapacitását. E lehetőségek tesztelésére meghatároztuk a sejtek viabilitását és a sejthalál mértékét a transzgen által vezérelt rendszerünkben. Továbbá feltérképeztük az ESC-k sejtciklus profilját is, hogy feltárjuk a ZBTB46 által előidézett esetleges változásokat. Meglepő módon a ZBTB46 által vezérelt sejtekben alacsonyabb propidium-jodid és annexin V pozitivitást figyeltünk meg a kontroll (*Zbtb46* indukció nélkül), nem differenciált ESC-khez képest. Ezen eredmények szerint sem életképesség csökkenés, sem apoptotikus sejtek képződése nem tehető felelőssé a csökkent sejtszám miatt. Érdekes módon a *Zbtb46* indukálásakor megváltozott sejtciklus profil volt megfigyelhető: a G0/G1 sejtek aránya lecsökkent, ezzel szemben a G2/M fázisban lévő sejtek aránya megemelkedett a ZBTB46 által vezérelt ESC-kben. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a sejtciklus fázisainak eltérése hozzájárulhat a csökkent sejtproliferációhoz.

A ZBTB46 dependens génexpressziós mintázat

A ZBTB46 által vezérelt génexpressziós változások dokumentálása érdekében módosítottuk a sejtdifferenciálási protokollunkat, hogy viszonylag homogén sejtpopulációkat kapjunk. Ötnapos differenciált és MACS-tisztított Flk1+ sejteket OP9 sztrómasejtek nélkül tenyésztettünk tovább doxiciklin jelenlétében vagy hiányában. A sejteket 24 és 72 óra múltán gyűjtöttük be, hogy megfigyeljük a ZBTB46 hatását. A teljes genomra kiterjedő génexpressziós analízis RNS-szekvenálással valósult meg; kísérleti kondícióként 3 biológiai replikát tesztelve (összesen 15 minta). Először a globális génexpressziós mintázatot főkomponens analízissel elemeztük. Eredményeink szerint az 5 napig differenciált Flk1+ sejtek jelentősen eltérő génexpressziós mintázatot mutatnak a 6 vagy 8 napos differenciált sejtekhez képest. Ebből az analízisből az is világossá vált, hogy a doxiciklin kezelés (*Zbtb46* indukció) mérsékelt hatást gyakorol a globális expressziós mintázatra. Ezt követően ANOVA tesztet alkalmaztunk a változó expressziót mutató gének jellemzésére. Elemzésünk 3030 változó gént azonosított az 15371 expresszált gén közül, amelyek dinamikus profilt mutattak ebben a differenciálódási szakaszban. A 8. napon számos gén mutatott magasabb expressziót, de érdekes módon ezen gének többségének kifejeződését a ZBTB46 csökkentette.

Ezt követően tovább elemeztük a ZBTB46 által negatívan szabályozott transzkriptumokat egy olyan megközelítéssel, amely csak a ZBTB46 transzgenikus hatásokra fókuszál a 6 és 8 napig differenciált sejteinkben. Elemzésünk 726 transzkriptum expressziójának csökkenését mutatta a ZBTB46 által vezérelt 6 vagy 8 napig differenciált sejtekben. A lista felhasználásával úgynevezett 'gene set enrichment' analízist végeztünk. Ennek eredményeként azt tapasztaltuk, hogy az immunsejtekhez kapcsolódó génontológiai (GO) kategóriák magasan képviseltették magukat a többi osztályhoz képest. Például az „immune system process” kategória 148 mRNS-e volt megtalálható a génlistánkon, többek között az *Itgal* (DC11a), az *Itgam* (CD11b) és az *Irf8* gének expressziója is lecsökkent ZBTB46 jelenlétében. Meglepő módon ezek a gének még erőteljesebben represszálódtak a 8. napon, ami arra utal, hogy számos immun- és mieloid sejtfejlődéssel kapcsolatos gén negatívan szabályozott a ZBTB46 által átprogramozott sejtekben. Az *Irf8* csökkent expresszióját a 8. napon kvantitatív PCR és Western blot segítségével is igazoltuk független kísérletekből származó mintákon. Összhangban az áramlási citometriás eredményeinkkel, a ZBTB46 tehát csökkenti a mielopoézisben részt vevő gének többségének expresszióját, ezáltal a genom szintű transzkript analízisünk is alátámasztja a ZBTB46 gátló hatását a mieloid sejtfejlődésre.

Ezt követően azokat a géneket vizsgáltuk, amelyek expressziója megemelkedett a ZBTB46 hatására. A magasabb expressziót mutató génkészlet kiválasztásához ugyanazt az algoritmust alkalmaztuk, mint amit a leszabályozott gének meghatározásához használtunk. 361 gént azonosítottunk, amelyeket a ZBTB46 pozitívan szabályozott, ezek közül RT-PCR analízissel két gén esetében (*Cyp26b1* és *Ramp3*) igazoltuk a ZBTB46 dependens indukciót.

Zbtb46 által indukált erythroid fejlődés ESC eredetű sejtekben

Transzkript analízisünk feltárta a ZBTB46 gátló szerepét az ESC eredetű mieloid sejtek kialakulása során. Ugyanakkor, az ESC-ből származó vérképző előalakok más sejtípusokká is alakulhatnak, például erythroid irányban is fejlődhetnek. Az RNS szekvenálási eredményeinkből az is világossá vált, hogy fokozott expressziót mutatnak az embrionális és felnőtt hemoglobin gének a 6 és 8 napig differenciált sejtekben, összehasonlítva az 5 napig differenciált Flk1+ sejtekkel. Ezen túlmenően a 8 napos differenciált sejtekben megfigyeltük a felnőtt béta globin transzkriptek (*Hbb1* és *Hbb2*) szintjének emelkedését ZBTB46 bekapcsolására, jelezve a fokozott erythropoézist. Részletes RT-PCR méréseink igazolták a felnőtt vörösvérsejtekre jellemző béta-globin gén (*Hbb-b1*) fokozott expresszióját 8 és 11 napig differenciált, ZBTB46 által átprogramozott sejtekben.

Ezt követően megvizsgáltuk az *ex vivo* generált sejtek hematopoietikus kolóniaképző potenciálját. A 8 napig differenciált sejteket begyűjtöttük, majd Methocult M3434 félszilárd táptalajban további 8 napig tenyésztettük. A kísérlet végén azonosítottuk és megszámláltuk a hematopoietikus sejteket tartalmazó kolóniákat. Meglepő módon, a transzgén bekapcsolt állapotában, illetve hiányában is alacsony számú mieloid (GM) és kevert (GEMM) kolóniát figyeltünk meg. Ezzel szemben a *Zbtb46* indukciója során lényegesen nagyobb számú erythroid jellegű telepet észleltünk. Hasonlóan fokozott erythroid sejt képződést detektáltunk a 11 napig differenciálódott sejtekben. Ezen sejtek esetében a *Zbtb46* indukciót követően a kevert kolóniák (GEMM) száma is fokozódott. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a mieloid kolóniák (GM) száma csökkent a 11. és 14. napon a *Zbtb46* indukció hatására. Összességében ezek az eredmények azt sugallják, hogy a ZBTB46 túltermelése a vérsejtek fejlődését a mieloidtól az erythroid irányba tereli ESC-ből származó progenitor sejtekben.

Érdekes módon az erythroid differenciálódás fő szabályozó faktorai (KLF1, LMO2, GATA1 és LDB1) ZBTB46 jelenlétében represszált állapotban maradtak vagy nem változott az expressziójuk. Ez arra utal, hogy a ZBTB46 dependens fokozott erythroid fejlődés valószínűleg nem magyarázható a rájuk specifikus szabályozó gének és termékeik indukciójával. Ugyanakkor, nagyobb számú CD105 (Endoglin) pozitív sejtet figyeltünk meg mind a 8 napig differenciálódott, mind az EB-eredetű sejtekben a ZBTB46-os indukciót követően. Az Endoglin pozitív populáció elkülönül a CD45+ sejtektől és ezt a két markert ellentétes módon szabályozta a ZBTB46. Az erythroid progenitorok CD105+ sejtek, ezért ennek a szubpopulációnak a fokozott képződése egy lehetséges magyarázata lehet az intenzívebb erythropoezisnek.

Diszkusszió

Vizsgálataink során két DC-specifikus transzkripciós faktor, a ZBTB46 és a RUNX3 az ESC-k differenciálódására kifejtett hatását tanulmányoztuk. Transzkripciós faktorokat gyakran alkalmaznak sejtidentitás módosítására. Ezzel a megközelítéssel speciális sejteket lehet kifejleszteni regeneratív gyógyászatához vagy immunterápiákhoz. Például transzkripciós faktorokkal szomatikus sejtek dedifferenciálhatók pluripotens őssejteké (iPSC generálás), vagy transzdifferenciálhatók más sejtípusokká. Ezenkívül a PSC-k irányított differenciálódása is elősegíthető transzkripciós faktorokkal, többek között az ES-DC differenciációt is modulálni lehet ezzel a megközelítéssel. Az elmúlt évtizedekben kidolgoztak számos protokollt a DC létrehozására az ESC-kból vagy az iPSC-kből. Ezek a módszerek különféle citokineket alkalmaznak az immunsejtek képződésének irányítására, különösen a GM-CSF-et a mieloid és DC differenciálódás elősegítésére. Több tanulmány dokumentálta, hogy az ES- vagy iPSC-DC-k képesek tumorelles immunválaszt stimulálni, azonban azt is megfigyelték, hogy ezek a DC-k sok esetben alacsonyabb T-sejt-aktivációs potenciállal rendelkeztek, mint a felnőtt progenitor eredetű DC-k. Összhangban ezekkel az eredményekkel kollégáim is megfigyelték, hogy az ES-DC-k számos maturáció specifikus sejtfelszíni marker (MHCII, CD80 és CD86) alacsonyabb expresszióját mutatták LPS kezelés után, mint a BM-DC-k. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy néhány faktor hiányzik az *ex vivo* generált ESC-eredetű immunsejtekből. Ezért kollégáink szisztematikusan összehasonlították a DC specifikus transzkripciós faktorok génexpressziós mintázatát ES és BM-DC-ben. RT-PCR elemzésekkel Takács Erika három gént azonosított (*Spi-B*, *Irf4* és *Runx3*), amelyek alacsonyabb expressziót mutattak az ES-DC-kben a BM-DC-kkel összehasonlítva. Ezek az eredmények arra inspiráltak bennünket, hogy kémiai indukálható ESC-vonalakat használva teszteljük e három transzkripciós faktor hatását ES-DC-kben és előalakjaikban. A cél elérése érdekében munkatársaim korábban Runx3, és Spi-B indukálható ESC klónokat készítettek Cre-mediált helyspecifikus rekombináció segítségével. PhD munkám során megvizsgáltam a transzgenikus Spi-B és Runx3 ES-DC aktivációra gyakorolt hatását. Spi-B indukcióját követően az érett ES-DC fenotípus változatlan maradt, ami arra utal, hogy ez a faktor minimális hatással van a DC aktiválására. Ezzel szemben lényegesen nagyobb arányban detektáltam MHCII/CD80 duplapozitív sejteket a RUNX3 által vezérelt ES-DC-kben, különösen LPS aktivációt követően. Ezenkívül egy jellegzetes MHCII-t expresszáló sejtpopulációt is detektáltunk, amely még LPS aktiválás nélkül is jelen volt a RUNX3 által programozott sejtekben. Korábban már leírták, hogy az MHCII expressziót közvetlenül a RUNX3 szabályozza. Eredményeink összhangban vannak ezzel a megfigyeléssel, mivel a

RUNX3 által szabályozott ES-DC-k esetében emelkedett MHCII-pozitivitást észleltünk. Sejteinkben azonban a RUNX3 által kiváltott fenotípusos változások nem korlátozódnak az MHCII emelkedett expressziójára, mivel a CD86 fokozott expressziója is kimutatható volt, ami azt jelzi, hogy a RUNX3 általánosan fokozza az ES-DC maturációs kapacitását.

Annak felmérésére, hogy a RUNX3 hozzájárulhat-e ES-DC-k funkcionális tulajdonságaihoz, megvizsgáltuk az LPS-aktivált ES-DC-k migrációs kapacitását. Runx3 indukció nélkül az ES-DC-k még CCL19 és CCL21 jelenlétében is alacsony mértékű transzmigrációt mutattak. Ezzel szemben a RUNX3 indukált sejtek CCL19 és CCL21 függő fokozott transzmigrációját detektáltuk. Megvizsgáltuk a RUNX3 által vezérelt ES-DC-k T-sejt aktivációs potenciálját is MRL reakció segítségével. Az allogén stimuláció (antigénprezentáló sejteinket eltérő genetikai hátteret hordozó T-sejtekkel együtt tenyésztettük) a RUNX3 által indukált ES-DC-kre adott válaszként megemelkedett T-sejt-proliferációs rátát azonosítottunk. *Ex vivo* elemzéseink azt is feltárták, hogy az ES-DC-k migrációs és érési kapacitása gyengébb a BM-DC-khez viszonyítva. A Runx3 transzgen túltermelése azonban elegendő volt ahhoz, hogy pozitívan modulálja az ES-DC-k maturációs, kemotaktikus és T-sejt-aktivációs potenciálját. Eredményeink szerint egyetlen transzkripciós faktor elegendő az ES-DC-k érésének és immunogenitásának javításához. Ugyanakkor, a felnőtt progenitor eredetű DC-k (BM-DC) még mindig magasabb százalékban expresszálják MHCII/CD80 és CD86 markereket, és a BM-DC-k nagyobb migrációs és T sejt aktiváló kapacitást mutattak, mint a RUNX3-mal előállított ES-DC-k. Ezek az eredmények arra készítetnek bennünket, hogy a RUNX3 mellett további transzkripciós faktorokat és citokineket is teszteljünk, hogy tovább fokozzuk a pluripotens őssejt eredetű DC-k immunogenitását.

Munkám második részében a ZBTB46 fehérje ESC differenciálódásra gyakorolt hatását vizsgáltam. A RUNX3-hoz hasonlóan azt találtuk, hogy, a ZBTB46, mely egy cDC marker, alig expresszálódott ES-DC-kben, és előalakjaiban. Ez az eredmény arra inspirált bennünket, hogy megvizsgáljuk ennek a génnek a DC fejlődésre gyakorolt hatását. A ZBTB46 ES-DC létrejöttében betöltött szerepének feltárására hasonló funkcionyerő megközelítést alkalmaztunk, mint a RUNX3 esetében, azaz kémiai indukálható transzgenikus ESC vonalakat hoztunk létre. Ellentétben a RUNX3-al, azt találtuk, hogy a *Zbtb46* túltermelése erős represszív hatást vált ki a korai hematopoietikus fejlődés során. Az ESC-ből származó ZBTB46 vezérelt sejtek sokkal kisebb arányban képeztek CD45⁺/CD11b⁺ mieloid progenitorokat, ami arra utal, hogy a mieloid sejtfelődést ez a transzkripciós faktor gátolta. Érdeemes megemlíteni, hogy a ZBTB46 néhány gátló funkcióját már korábban megfigyelték. Például a *Zbtb46* túltermelése a BM-ből

származó hematopoietikus progenitorokban negatívan szabályozta a mieloid granulocita fejlődést, és a sejt differenciálódást a cDC-szerű sejtek felé mozdította el. Ezen túlmenően a *Zbtb46* hiányos DC-kben nagyszámú monocita fejlődéssel kapcsolatos gén expressziója fokozódott, ami arra utal, hogy ez a transzkripciós faktor negatívan modulálja a mieloid/monocita génszabályozó hálózatokat. Az ESC eredetű progenitorokban is csökkent mieloid véresejtképződést találtunk, azonban a *Zbtb46* ektopikus expressziója után nem észleltünk DC-szerű fenotípust. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a ZBTB46 általános gátló hatást válthat ki a mieloid véresejtek fejlődésében, de az alternatív sejtfejlődés iránya kontextusfüggő. A ZBTB46 több gént és útvonalat is represszálhat az ESC differenciálódás során. Ezért megvizsgáltuk ennek a génszabályozó fehérjének a globális génexpresszióra kifejtett hatását mRNS szekvenálással. Összhangban a represszív funkcióval több mint 700 gén mutatott alacsonyabb expressziót ennek a transzkripciós faktornak a túltermelése következtében 6 vagy 8 napig differenciált sejtekben. Ezek közül a transzkriptumok közül számos mieloid specifikus mRNS-t azonosítottunk, beleértve az *Irf8*-at, a *CD14*-et és a *CD11b*-t. Lehetséges, hogy ezen mieloid specifikus gének némelyikét közvetlenül represszálja a ZBTB46. Megjegyzendő, hogy az elérhető publikációk szerint számos mieloid/monocita specifikus génszabályozó régióhoz kötődik a ZBTB46. Ezen erős represszív hatás ellenére genom szintű transzkripciós analízisünk arra is rávilágított, hogy a hemoglobin béta gének (*Hbb1* és a *Hbb2*) szintje megemelkedik a ZBTB46-os túltermelése során. Ezzel összhangban nagyobb számú erythroid kolóniát észleltünk, a ZBTB46 vezérelt 8 vagy 11 napig differenciált sejtek esetén. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy a *Zbtb46* túltermelése fokozza az erythroid sejtek képződését ESC alapú rendszerünkben. Meglepő módon a kulcsfontosságú erythroid szabályozók kifejeződését (*KLF1*, *LMO2*, *GATA1* és *LDB1*) a ZBTB46 vagy nem változtatta meg, vagy represszálta. Ezért a fokozott erythroid fejlődés nem magyarázható az erythropoiesis-specifikus transzkripciós faktorok ZBTB46 általi indukciójával. Ugyanakkor, több *CD105* (Endoglin) pozitív sejtet figyeltünk meg a differenciálódás korai szakaszában ZBTB46 jelenlétében. Ismert, hogy az erythroid progenitorok expresszálják a *CD105*-öt és az is megállapítást nyert, hogy az ESC-eredetű erythroid fejlődést pozitívan modulálja a *CD105* túltermelése. Ezért a ZBTB46-függő *CD105*+ sejt populáció összefüggésbe hozható a fokozott erythropoézissel. Nyilvánvalóan további vizsgálatokra lesz szükség a ZBTB46 által közvetített vörösvérsajt fejlődés jellemzésére ESC eredetű differenciált sejtekben.

Összefoglalva, sikerült demonstrálnunk, hogy egyetlen transzkripciós faktor (ZBTB46) felülírhatja a vérsajt-fejlődés programját. Ennek a transzkripciós faktornak a túltermelése eger

ESC-eredetű sejtekben elegendő volt a mieloid génszabályozó hálózatok gátlásához és az erythroid útvonal aktiválásához. A ZBTB46 erőteljes hatása az ESC-ből származó progenitorokban azt sugallja, hogy érdekes lenne a ZBTB fehérjék más tagjait önmagukban vagy kombinációban tesztelni, hogy elősegítsük az ESC-k irányított differenciálódását. Ezenkívül a teljes genomra kiterjedő génexpressziós profilozásunk alapul szolgálhat a ZBTB46 szabályozó hálózat feltárásához az ESC-ből származó progenitorokban.

Összefoglalás

Monocita eredetű dendritikus sejteket gyakran használnak daganatellenes immunoterápia céljából. Fontos kiemelni, hogy a monocita forrásból létrehozott DC alapú vakcinák több esetben ígéretes klinikai eredményekhez vezettek. Ugyanakkor, limitált az adott betegből begyűjthető monociták száma, s ezekből nem mindig jön létre terápiás mennyiségű DC. Ellentétben a monocita sejtekkel, a pluripotens embrionális őssejtek szinte korlátlan sejtforrást biztosíthatnak mivel az ES sejtek immortálisak és széles fejlődési képességgel rendelkeznek. Ugyanakkor, komoly kihívást jelent az ES sejtek irányított átalakítása DC-ké: sok esetben az így létrehozott immunsejtek éretlenek és csak korlátozott immunogenitásuk van. Úgy tűnik további faktorok szükségesek az ES sejt eredetű DC-k (ES-DC-k) maturációjának eléréshez. Hipotézisünk szerint DC specifikus transzkripciós faktorok bekapcsolásával fokozható lehet az ES eredetű immunsejtek maturációja és immunogenitása. Mindezek miatt kísérleteinkben megvizsgáltuk a RUNX3 és a ZBTB46 DC specifikus transzkripciós faktorok hatását az ES-DC-k fejlődése során, és az alábbi következtetéseket vontuk le.

1. Az egér ES sejt eredetű DC-k is limitált maturációs képességgel rendelkeznek, viszont az érett sejtek aránya a RUNX3 transzkripciós faktor bekapcsolásával jelentősen fokozható. A fokozott maturációt támasztja alá, hogy sokkal több MHCII/CD80 dupla pozitív, illetve CD86+ sejt volt megfigyelhető a RUNX3-al átprogramozott ES-DC-ben LPS kezelést követően. Ezzel ellentétben az Spi-B faktor túltermelése nem befolyásolta a DC maturációt.
2. A sejtfelszíni markerek vizsgálata alapján tehát azt találtuk, hogy a RUNX3 fokozza az ES eredetű DC-k maturációs képességét. További funkcionális vizsgálataink rávilágítottak arra, hogy a RUNX3 pozitívan befolyásolja az ES eredetű DC-k migrációs képességét, viszont ez a képesség még így is elmarad a csontvelői eredetű DC-k hasonló tulajdonságától. Ezen felül igazoltuk, hogy a *Runx3* túltermelése fokozza az ES-DC-k T-sejt aktiváló kapacitását.
3. A RUNX3 mellett szintén teszteltük a ZBTB46 hatását az ES-DC *ex vivo* differenciáció során. Ezen transzkripciós faktor túltermelése esetén egyáltalán nem jöttek létre DC-szerű sejtek, mivel a myeloid sejtek korai fejlődése szinte teljesen blokkolódott.
4. Megállapítottuk, hogy a ZBTB46 faktor túltermelése nem csak a myeloid vérképző sejtek kialakulását gátolja, hanem az ezt megelőző mezodermális sejtfejlődésre is represszív hatással van. Továbbá ez a fehérje negatívan befolyásolja a sejtproliferációt is, feltételezhetően a sejtciklus szabályozásán keresztül.

5. Összhangban a megfigyelt myeloid sejtfejlődés gátlásával, az általunk végrehajtott globális génexpressziós vizsgálatok feltárták, hogy csökkent expresszió mutat számos myeloid sejt specifikus gén (pl. *Irf8*, *Itgal* és *Itgam*) is a ZBTB46-tal átprogramozott sejtekben. Továbbá olyan géneket is azonosítottunk (pl. *Cyp26b1* és *Ramp3*) melyek expressziója fokozódott ZBTB46 jelenlétében.

6. Végezetül vizsgálataink feltárták, hogy a ZBTB46 transzkripciós faktor túltermelése a myeloid program helyett az erythroid sejtek kialakulását segíti elő az ES sejtek differenciálódása során. Ezzel párhuzamosan az is kimutatható volt, hogy ezek az erythroid sejtek leginkább a felnőtt vörös vérszámokra jellemző hemoglobin formákat expresszálnak.

Összefoglalásként fontos kiemelni, hogy a pluripotens ES sejtekből létrehozott DC-k immunogenitása korlátozott. Viszont *Runx3* transzgen expressziója esetén olyan ES-DC-k fejlődnek ki, melyek érettebb sejteknek tekinthetők és erőteljesebb immunválaszt tudnak létrehozni. Eredményeink azt is feltárták, hogy a ZBTB46 teljesen képes átírni a korai hematopoiesis folyamatát az ES eredetű progenitorokban, mivel e protein hatására a myeloid sejtek fejlődése represszálódik, ezzel szemben az erythroid sejtek képződése fokozódik.

Publikációs lista



**UNIVERSITY of
DEBRECEN**

**UNIVERSITY AND NATIONAL LIBRARY
UNIVERSITY OF DEBRECEN**

H-4002 Egyetem tér 1, Debrecen

Phone: +3652/410-443, email: publikaciok@lib.unideb.hu

Registry number: DEENK/120/2022.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Pál Botó

Doctoral School: Doctoral School of Molecular Cellular and Immune Biology

List of publications related to the dissertation

1. Botó, P., Gerzsenyi, T. B., Lengyel, A., Szúnyog, B., Szatmári, I.: Zbtb46-dependent altered developmental program in embryonic stem cell-derived blood cell progenitors. *Stem Cells*. 39 (10), 1322-1334, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.3424>
IF: 6.277 (2020)
2. Takács, E.*, Botó, P.*, Simó, E., Csuth, T. I., Tóth, B. M., Raveh-Amit, H., Pap, A., Kovács, E. G., Kobolák, J., Benkő, S., Dinnyés, A., Szatmári, I.: Immunogenic Dendritic Cell Generation from Pluripotent Stem Cells by Ectopic Expression of Runx3. *J. Immunol.* 198 (1), 239-248, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1600034>
* These authors contributed equally this work.
IF: 4.539

List of other publications

3. Douida, A., Batista, F., Botó, P., Regdon, Z., Robaszkiewicz, A., Tar, K.: Cells Lacking PA200 Adapt to Mitochondrial Dysfunction by Enhancing Glycolysis via Distinct Opa1 Processing. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (4), 1-22, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22041629>
IF: 5.923 (2020)
4. Douida, A., Batista, F., Robaszkiewicz, A., Botó, P., Aladdin, A., Szenyiv, M., Czinege, R., Virág, L., Tar, K.: The proteasome activator PA200 regulates expression of genes involved in cell survival upon selective mitochondrial inhibition in neuroblastoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* 24 (12), 6716-6730, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.15323>
IF: 5.31





5. Dániel, B., Czimmerer, Z., Halász, L., Botó, P., Kolostyák, Z., Pólska, S., Berger, W. K., Tzerpos, P., Nagy, G., Horváth, A., Hajas, G., Silye-Cseh, T., Nagy, A., Sauer, S., Francois-Deleuze, J., Szatmári, I., Bácsi, A., Nagy, L.: The transcription factor EGR2 is the molecular linchpin connecting STAT6 activation to the late, stable epigenomic program of alternative macrophage polarization.
Genes Dev. 34 (21-22), 1474-1492, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.343038.120>
IF: 11.361
6. Aladdin, A., Király, R., Botó, P., Regdon, Z., Tar, K.: Juvenile Huntington's disease skin fibroblasts respond with elevated parkin level and increased proteasome activity as a potential mechanism to counterbalance the pathological consequences of mutant huntingtin protein.
Int. J. Mol. Sci. 20 (5338), 1-39, 2019.
IF: 4.556
7. Botó, P., Csuth, T. I., Szatmári, I.: RUNX3-Mediated Immune Cell Development and Maturation.
Crit. Rev. Immunol. 38 (1), 63-78, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2018025488>
IF: 1.191
8. Kiss, M., Czimmerer, Z., Nagy, G., Bieniasz-Krzywiec, P., Ehling, M., Pap, A., Pólska, S., Botó, P., Tzerpos, P., Horváth, A., Kolostyák, Z., Dániel, B., Szatmári, I., Mazzone, M., Nagy, L.: Retinoid X receptor suppresses a metastasis-promoting transcriptional program in myeloid cells via a ligand-insensitive mechanism.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114 (40), 10725-10730, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1700785114>
IF: 9.504
9. Bencsik, R., Botó, P., Szabó, R. N., Tóth, B. M., Simó, E., Bálint, B. L., Szatmári, I.: Improved transgene expression in doxycycline-inducible embryonic stem cells by repeated chemical selection or cell sorting.
Stem Cell Res. 17 (2), 228-234, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2016.08.014>
IF: 3.494

Total IF of journals (all publications): 52,155

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 10,816

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.



24 March, 2022

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Szatmári Istvánnak, akinek szaktudása, folyamatos támogatása munkám során felbecsülhetetlen értékű. Az évek során tanúsított kiváló mentori tevékenysége nagyban hozzájárult személyes és szakmai fejlődésemhez. Köszönet illeti a DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet jelenlegi és azt megelőző vezetőit Prof. Dr. Tózsér Józsefet és Prof. Dr. Fésüs Lászlót, hogy lehetőséget biztosítottak a PhD kutatási munkám elvégzéséhez. Külön köszönettel tartozom PhD advisor-omnak Prof. Dr. Fésüs Lászlónak a kutatásaim során nyújtott kiváló mentori tevékenységéért.

Szeretném megköszönni a laboratóriumunk minden jelenlegi és korábbi dolgozójának, szerzőtársaimnak az eredményes publikációk során végzett munkájukat, amelyek egy része jelen disszertáció alapját is képezi.

Köszönettel tartozom Michael Kyba-nak (University of Minnesota, MN, USA) a rendelkezésünkre bocsátott OP9 és ZX1 sejtvonalakért és p2Lox targetáló plazmidért, illetve Mező Irén kolléganőmnek a kitűnő technikai segítségért munkám során.

A legnagyobb köszönet illeti családomat a tanulmányaim és kutatásaim éve alatti határtalan és odaadó támogatásért.

A PhD disszertáció az alábbi az alábbi kutatási pályázatok támogatásával valósult meg: NKFIH K124890 and GINOP- 2.3.2-15-2016-00044 PHARMPROT.