

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az oxidatív stressz hatása a humán dendritikus sejtek
fenotípusos és funkcionális sajátosságaira**

Pázmándi Kitti Linda

Témavezető: Dr. Bácsi Attila



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol	Magyar
APC	Antigen presenting cell	Antigén prezentáló sejt
BDCA	Blood Dendritic Cell Antigen	Vér dendritikus sejt antigén
cDC	Conventional dendritic cell	Konvencionális dendritikus sejt
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester	Karboxifluoreszcein szukcinimidil észter
DC	Dendritic cell	Dendritikus sejt
DPI	Diphenylene iodonium	Difenilén-jodónium
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Enzim-kötött immunszorbens módszer
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT	Enzim-kötött immunszorbens SPOT
FLT3	Fms-like tyrosine kinase-3	Fms-szerű tirozin kináz-3
H ₂ DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate	2',7'-dihidro-diklorofluoreszcein diacetát
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	Hidrogén peroxid
ICOS-L	Inducible Costimulatory-Ligand	Indukálható kostimulatórikus-ligand
IFN	Interferon	Interferon
IL	Interleukin	Interleukin
IRF	Interferon Regulatory Factor	Interferon regulatórikus faktor
MHC	Major Histocompatibility Complex	Fő hisztokompatibilitási komplex
NAC	N-acetyl-cysteine	N-acetil-cisztein
NF-κB	Nuclear Factor-KappaB	Nukleáris faktor kappaB
NLR	Nod-like receptor	Nod-szerű receptor
O ₂ ⁻	Superoxide-anion	Szuperoxid-anion
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns	Patogén-asszociált molekuláris mintázat
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	Perifériás vér mononukleáris sejtek
pDC	Plasmacytoid dendritic cell	Plazmacitoid dendritikus sejt
PRR	Pattern Recognition Receptor	Mintázatfelismerő receptor
RLH	RIG-like helicase	RIG-szerű helikáz
ROS	Reactive Oxygen Species	Reaktív oxigéngyök
SLE	Systemic lupus erythematosus	Szisztémás lupus erythematosus
SPP	Subpollen particle	Szubpollen partikula
SPP ^H	Heat-inactivated subpollen particle	Hőinaktivált szubpollen partikula
TGF-β	Transforming growth factor -β	Transzformáló növekedési faktor-β
Th	Helper T cell	Segítő T sejt
Thf	Follicular helper T cell	Follikuláris segítő T sejt
TLR	Toll-like receptor	Toll-szerű receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor-α	Tumor nekrozis faktor-α
Treg	Regulatory T cell	Regulatórikus T sejt

Tartalomjegyzék

	Oldalszám
I. Bevezetés	4
II. Irodalmi áttekintés	5
II.1. A ROS-ok fajtái	5
II.2. A ROS-ok forrásai	6
II.3. A ROS-ok káros hatásai	8
II.4. A ROS-okkal szembeni védekező mechanizmusok	9
II.5. A ROS-ok szerepe humán kórképek patobiokémiai mechanizmusában, illetve jelátviteli folyamatokban	9
II.6. A DC-k jelentősége az immunválasz során	11
II.7. A DC-k eredete és fajtái	12
II.8. A DC-k szerepe a természetes immunválasz folyamataiban	15
II.9. A DC-ek szerepe az adaptív immunválasz polarizálódásában	17
II.10. A DC-k speciális alpopulációja, a pDC-k	20
II.11. Az oxidatív stressz és a DC-k kapcsolata	24
II.11.1. Az oxidatív stressz lehetséges hatása a humán pDC-k funkcióira	24
II.11.2. Allergének által kiváltott oxidatív stressz hatása a DC-k aktivációjára	25
II.12. Célkitűzések	29
III. Metodikák	30
III.1. Etikai nyilatkozat	30
III.2. Humán sejtpopulációk izolálása perifériás vérből	30
III.3. Humán cDC-k differenciálata CD14⁺ monocitákból	30
III.4. SPP-k izolálása és enzimaktivitásuk vizsgálata	30
III.5. A DC-k kezelése	31
III.6. Sejtek életképességének vizsgálata	32
III.7. Sejtek intracelluláris ROS termelésének meghatározása	32
III.8. Sejtek fenotípusos vizsgálata	32
III.9. Sejtek citokin és kemokin szekréciójának detektálása ELISA módszerrel	33
III.10. A cDC-k SPP felvétele	33
III.11. Proliferációs assay	33
III.12. T sejt polarizáció meghatározása ELISPOT módszer segítségével	34
III.13. Intracelluláris citokin meghatározás áramlási citométerrel	34
III.14. Statisztikai elemzés	35
IV. Eredmények	36
IV.1. Oxidatív stressz hatásának vizsgálata humán pDC-ken	36
IV.1.1. A human pDC-k és cDC-k oxidatív stressztűrésének összehasonlítása	36
IV.1.2. Oxidatív stressznek kitett pDC-k fenotípusos vizsgálata	38
IV.1.3. Oxidatív stressz hatása a pDC-k citokin és kemokin termelésére	40
IV.1.4. Oxidatív stressznek kitett pDC-k allogen T sejt aktiváló képessége	42
IV.1.5. Oxidatív stressz hatása a pDC-k naív T sejt polarizáló képességére	43
IV.2. Parlagfű SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-ok hatásainak vizsgálata humán cDC-ken	47
IV.2.1. SPP kezelés által indukált oxidatív stressz vizsgálata cDC-ken	47
IV.2.2. cDC-k SPP felvételének vizsgálata	50
IV.2.3. SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-ok hatásai a cDC-k fenotípusos és funkcionális tulajdonságaira	51
IV.2.4. SPP kezelt cDC-k T sejt proliferáló képességének vizsgálata	53
IV.2.5. SPP kezelés hatása a cDC-k allogen T sejt aktiváló képességére	54
V. Megbeszélés	56
VI. Összefoglalás	63
VII. Irodalomjegyzék	65
VII.1. A doktori értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke	65
VII.2. A Kenézy Élettudományi Könyvtár által kiállított saját közlemények jegyzéke	74
VIII. Tárgyszavak	76
IX. Köszönetnyilvánítás	77
X. Függelék	78

I. Bevezetés

Az adaptív immunválaszok különböző végrehajtó mechanizmusainak elindításában és polarizációjában meghatározó szerepe van a hivatásos antigén prezentáló sejteknek (APC-k), melyek közül a leghatékonyabbak a dendritikus sejtek (DC-k). A humán DC-k morfológiájuk, sejtfelszíni receptoraik, illetve funkcionális sajátásaik alapján két fő alpopulációra különíthetők el, mielőid vagy másnéven konvencionális dendritikus sejtek (cDC-k), illetve plazmacitoid dendritikus sejtek (pDC-k) csoportjára.

Napjainkra a DC-k az immunológiai kutatás egyik fő célpontjaivá váltak, kiderült ugyanis hogy a DC-k működésének célzott megváltoztatásával, illetve DC alapú vakcinákkal modulálni lehet az immunrendszer működését. Jelenleg is számos kutatócsoport dolgozik ezen vakcinák klinikai alkalmazásának optimalizálásán, melynek elengedhetetlen feltétele a DC-k funkcióinak átfogóbb megismerése. Vizsgálataink célja az volt, hogy olyan kísérleti közeget hozzunk létre, mely feltehetően hasonlít azon szöveti környezetre ahol a DC-k antigénnel, illetve allergénnel találkoznak. Ezen szöveti környezetben a DC-k a természetes immunválaszban résztvevő gyulladásozó sejtek által termelt reaktív oxigéngyökök (ROS-ok) hatásainak lehetnek kitéve, mely oxidatív környezet feltevésünk szerint befolyásolhatja a DC-k immunválaszban betöltött szerepét. Az utóbbi két évtized kutatásai rávilágítottak arra, hogy a reaktív gyökök alacsony koncentrációban fontos szignálrendszerként szolgálnak az intra- és intercelluláris kommunikációs folyamatokban, valamint a redox-homeosztázis fenntartásában, ezen kívül számos humán betegség patogenezisét is befolyásolják. Így munkánk során átfogóan kívántuk tanulmányozni az oxidatív stressz DC-kre gyakorolt hatását, mind antigén és mind allergén expozíciót követően. A DC alapú vakcinák fejlesztésére irányuló kísérletekben elsősorban cDC-ket alkalmaznak, melynek egyik oka, hogy a pDC-kről sokkal kevesebbet tudunk, mint a cDC-kről, ugyanis nehéz őket az *in vitro* vizsgálatokhoz szükséges mennyiségben szeparálni az emberi szervezetből, holott számos egyedülálló tulajdonsággal bírnak. Ez ösztönzött minket arra, hogy a cDC-k mellett nagy hangsúlyt fektessünk a pDC-k oxidatív stresszre adott válaszána tanulmányozására is, melyről irodalmi adat nem áll rendelkezésre.

Reményeink szerint kísérleteink eredményei hozzájárulnak ahhoz, hogy jobban megismerjük a gyulladásozó környezetben, oxidatív stressznek kitett DC-k tulajdonságait, és ezáltal új terápiás lehetőségek kifejlesztését segítsük olyan humán betegségek esetében, ahol az oxidatív stressz jelentős szereppel bír a kórképek kialakulásában.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A ROS-ok fajtái

A molekuláris oxigén nélkülözhetetlen eleme az aerob organizmusok alapvető energiatermelő folyamatainak, melyek túlnyomórészt oxidatív folyamatok. Ugyanakkor ezen oxidatív folyamatok melléktermékeként oxigén eredetű reaktív gyökök keletkezhetnek, melyek nagyobb koncentrációban oxidatív stresszt idézhetnek elő, és ezáltal káros hatással lehetnek a szervezetet felépítő strukturális elemekre.

Nyugalmi állapotban egy átlagos testtömegű (70 kg) ember testének minden egyes kg tömege 3,5 ml oxigént használ el percenként, mely azt jelenti, hogy az alapanyagcsere oxigén szükségletének fedezése céljából egy 70 kg-os ember 175 kg oxigént fogyaszt el évente. Az energiatermelő folyamatok révén ezen oxigén mennyiség 1%-ából keletkezhetnek reaktív gyökök, mely évente 1,7 kg-os szabadgyök képződést jelent az emberi test viszonylatában [1]. Ezen oxigén eredetű termékek párosítatlan szabad elektronjaik révén igen reakcióképesek, összefoglaló néven reaktív oxigéngyökök elnevezéssel illetjük őket. Ilyen, a szervezetben fiziológiás körülmények között is keletkező, erőteljes oxidáló tulajdonsággal rendelkező vegyület például a szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$). Egyes oxigén származékok, mint a hidrogén peroxid (H_2O_2) nem rendelkeznek párosítatlan elektronnal, de erősen oxidáló tulajdonságuknak köszönhetően még reaktívabb hidroxil-intermedierek keletkezésének prekursorai lehetnek. A hidroxil-intermedierek közé tartoznak például a hidroxidionok, valamint a hidroxilgyökök, melyek fémionok, mint például vas (Fe^{3+}/Fe^{2+}) jelenlétében Fenton-reakció révén, vagy $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 jelenlétében Haber-Weiss reakció során képződhetnek (**1. ábra**).

A reaktív gyökök átlagos élettartama 10^{-9} - 10^{-6} másodperc, bár vannak közöttük extrémén instabilak is, úgymint a $O_2^{\cdot-}$ és a hidroxilgyök, illetve olyanok is, melyek élettartama sokkal hosszabb lehet, ilyen például a H_2O_2 [2]. A szabadgyökök átlagos élettartamát számos fiziko-kémiai tényező befolyásolhatja, például a pH, hőmérséklet, oxigén tenzió, egyéb szabadgyökök, illetve antioxidánsok jelenléte. Fiziológiás körülmények között, a szövetek, illetve sejtek közötti térben, ahol az oxigén koncentráció jóval alacsonyabb (kb. 10-25 μM), a reaktív gyökök élettartama sokkal hosszabb lehet, mint *in vitro* körülmények között, ahol a levegő oxigén koncentrációja kb. 220 μM -os. Így az *in vivo* körülmények között keletkező gyökök élettartama 1-2 nagyságrenddel is nagyobb lehet, mint *in vitro* kísérletek esetében [3].

Reaktív oxigéngyökök

Szabadgyökök	Nem szabadgyökök
Szuperoxid-anion $O_2^{\cdot -}$	Hidrogén peroxid H_2O_2
Hidroxidion OH^-	Hipoklórossav $HOCl$
Hidroxilgyök OH^\cdot	Hipobrómosav $HOBr$
Peroxil RO_2^-	Szinglet oxigén 1O_2
Alkoxil RO^\cdot	Ózon O_3
Hidroperoxil HO_2^-	
Lipidperoxilgyök LOO^\cdot	

1. ábra Reaktív, oxigén eredetű gyökök fajtái

Az élő szervezetben előfordulhatnak olyan oxigénből származtatható szabadgyökök, melyek egy vagy több párosítatlan, szabad elektronnal rendelkeznek, illetve olyan oxigén eredetű vegyületek, melyek nem gyökös formában vannak jelen.

Francesco Galli et al., Cardiovascular Disorders in Hemodialysis. 2005. 149:240-260

II.2. A ROS-ok forrásai

A szabadgyökök keletkezhetnek exogén, illetve endogén tényezők hatására. Képződésük általában összefüggésben van az életmóddal, illetve külső környezeti tényezők is elősegíthetik létrejöttüket. Ilyen exogén faktorok lehetnek a dohányzás, az aránytalanul sok többszörösen telítetlen zsírsavak fogyasztása, a környezetben megjelenő levegőszennyező anyagok, ibolyántúli sugárzás, radioaktív sugárzás, valamint különböző gyógyszerek, főként kemoterapeutikumok. A ROS-ok endogén forrásaiként szolgálhatnak a már korábban említett metabolikus folyamatok, illetve enzimatis reakciók is. Ezen kívül a természetes immunválasz során kialakuló gyulladási folyamatok is intenzív ROS képződéssel járnak [4] (2. ábra).

A mitokondriumokban zajló oxidatív foszforilációs folyamatok nagy mennyiségű ATP termelését teszik lehetővé. Az oxigén az elektrontranszportlánc végén végső elektron akceptorként játszik szerepet azáltal, hogy a citokróm-c oxidáz az átadott elektronok révén az oxigént vízzé redukálja. Az elektrontranszport nem megfelelő működése ROS-ok képződéséhez vezethet. Így az oxidatív gyökök generálódásának egyik fő celluláris forrása a mitokondriális elektron transzport. A mitokondriumokban magas koncentrációban

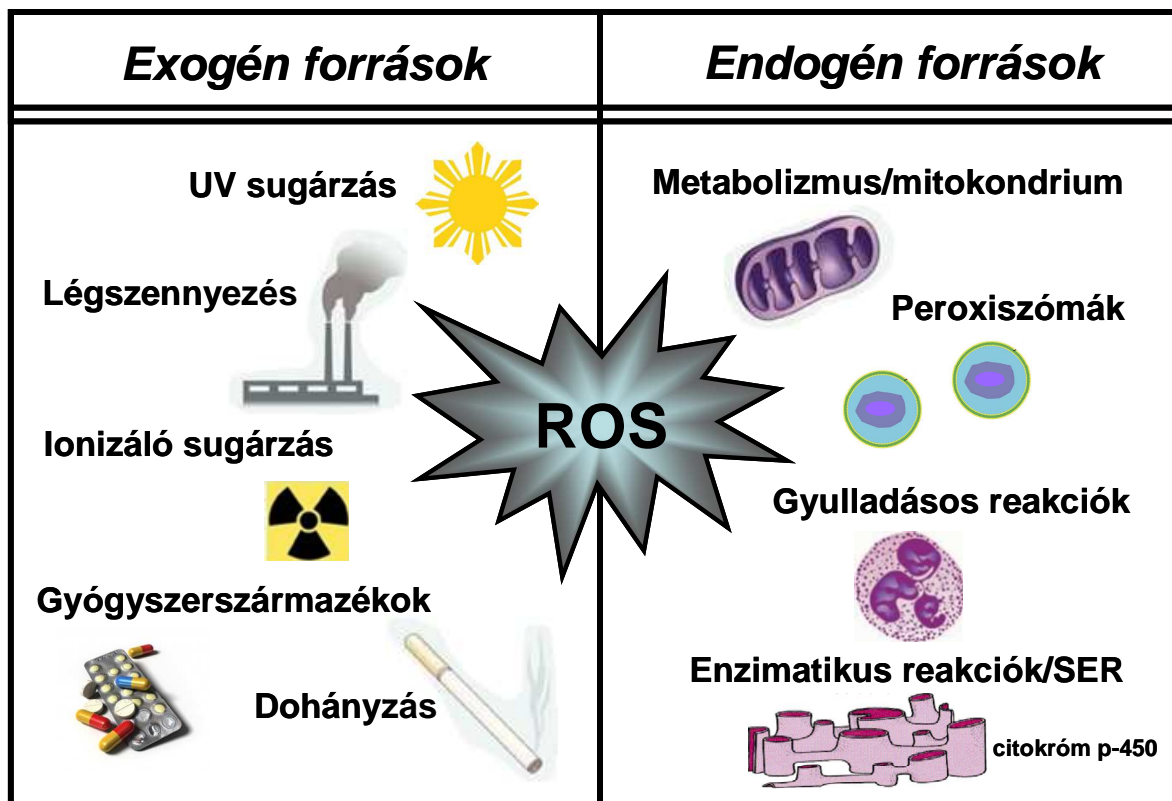
megtalálható szuperoxid-dizmutáz enzimnek köszönhetően a $O_2^{\cdot-}$ koncentráció ezen sejtorganellumokban mégis alacsony szinten van [5], mivel az enzim működése során keletkező, sejtmembrán permeábilis H_2O_2 a mitokondriális membránon átdiffundálva a citoszólba kerül [6].

Az endogén eredetű ROS-ok további forrása lehet a riboszómával nem rendelkező, sima felszínű endoplazmatikus retikulum, mely olyan enzimeket tartalmaz, melyek a lipídoldékony gyógyszermaradványok vagy más káros metabolikus termékek lebontását katalizálják. Ezen enzimek közé tartoznak a citokróm p-450 és a b_5 enzimcsalád tagjai, melyek képesek oxidálni a telítetlen zsírsavakat, valamint a xenobiotikus anyagokat, és a molekuláris oxigén redukciója révén $O_2^{\cdot-}$ vagy H_2O_2 képződését indukálják [7, 8]. Ezen kívül a sejtek magmembránja is tartalmaz citokróm-oxidázokat és olyan elektron transzport rendszert, mint az endoplazmatikus retikulum, de ezek funkciója még nem teljesen ismert [9], viszont *in vivo* DNS károsító hatásuk bizonyított [9, 10].

A peroxiszómák a sejtek H_2O_2 termelésének legfontosabb forrásai [11]. Ezen organellumok számos enzimet tartalmaznak, melyek működésük révén H_2O_2 -t generálnak. Ezek közé tartoznak például a glikol-oxidáz, D-aminosav-oxidáz, ureát-oxidáz, acetyl-CoA-oxidáz. A peroxiszómák enzimatis oxidatív reakciói különösen fontos szereppel bírnak a máj, valamint a lép sejtek esetében, ahol a toxikus anyagok (például etanol) eliminálása létfontosságú a szervezet számára [12].

Számos intracelluláris, membrán-asszociált oxidáz vagy szolubilis enzim (xantin-oxidáz, aldehyd-oxidáz, flavoprotein-dehidrogenáz, triptofán-dioxigenáz) is termelhet reaktív gyököket működése révén. Az olyan kisebb molekulák, mint a dopamin, az epinefrin vagy a flavinok autooxidációik révén szintén hozzájárulnak a ROS-ok sejten belüli megjelenéséhez [9].

A természetes immunválasz részeként a fagocita sejtek (makrofágok, granulociták) által termelt reaktív gyökök fontos szerepet játszanak a mikroorganizmusok elleni védekező folyamatokban. Ezen speciális funkció egyik legjelentősebb eleme a plazmamembránban lokalizálódó NADPH oxidáz enzim, amely katalizálja az oxigén redukcióját $O_2^{\cdot-}$ -ná a citokróm b_{558} ($gp91^{phox}$ és $p22^{phox}$ protein alegységekből álló heterodimer komplex) transzmembrán fehérje segítségével, mely folyamatban a NADPH az elektrondonor szerepét tölti be. A fagocitózis során vezikulumokba zárt mikroorganizmusokat a sejtek NADPH oxidáz enzim működése révén generálódó ROS-ok teszik ártalmatlanná [13, 14].



2. ábra *Reaktív oxigéngyökök (ROS-ok) exogén és endogén forrásai*

SER: Sima felszínű endoplazmatikus retikulum.

Toren Finkel, Nikki J. Holbrook, Nature. 2000. 408:239-247

II.3. A ROS-ok káros hatásai

A mitokondriális működésből és más celluláris vagy exogén forrásokból származó ROS-ok citotoxikus hatásuk miatt káros kémiai láncreakciók beindítói lehetnek, lipidek, fehérjék és DNS molekulák oxidációját okozhatják [9]. A sejtalkotó komponensek közül a sejteket határoló sejtmembrán az egyik legérzékenyebb a ROS-ok káros hatásaival szemben. A ROS-ok hatására ugyanis a membránban található lipidek peroxidálódnak, mely folyamat a sejtmembrán fluiditásának csökkenését eredményezi, melynek következtében a lipid kettősréteg integritása megszűnhet. Továbbá a peroxidált lipidek felhalmozódása a sejtek membránjában olyan karcinogenezist indukáló vegyületek képződéséhez vezethet, mint a malondialdehid [15]. Ezen hatások főként a hosszú életidejű sejtek, mint például idegsejtek esetében a legszembetűnőbbek [16]. A reaktív gyökök hatásának következtében a fehérjéken irreverzibilis szerkezeti változások jelenhetnek meg, denaturálódhatnak, degradálódhatnak és így a szervezet számára létfontosságú enzimatis folyamatok gátlódhatnak. Egyes megfigyelések szerint az idős állatok celluláris fehérjéinek 30-50 %-a oxidált állapotú, így ezen irreverzibilisen oxidálódott proteinek az öregedési folyamatok meghatározó indikátorai lehetnek [15]. Ezen kívül az oxidatív stressz DNS szál

töréseket, bázis deléciókat, valamint mutációkat eredményezhet, és ezzel a sejtek pusztulását okozhatja, vagy rákos elváltozásokat hozhat létre, ha a DNS javító mechanizmusok ezen hibákat nem képesek kijavítani [17].

II.4. A ROS-okkal szembeni védekező mechanizmusok

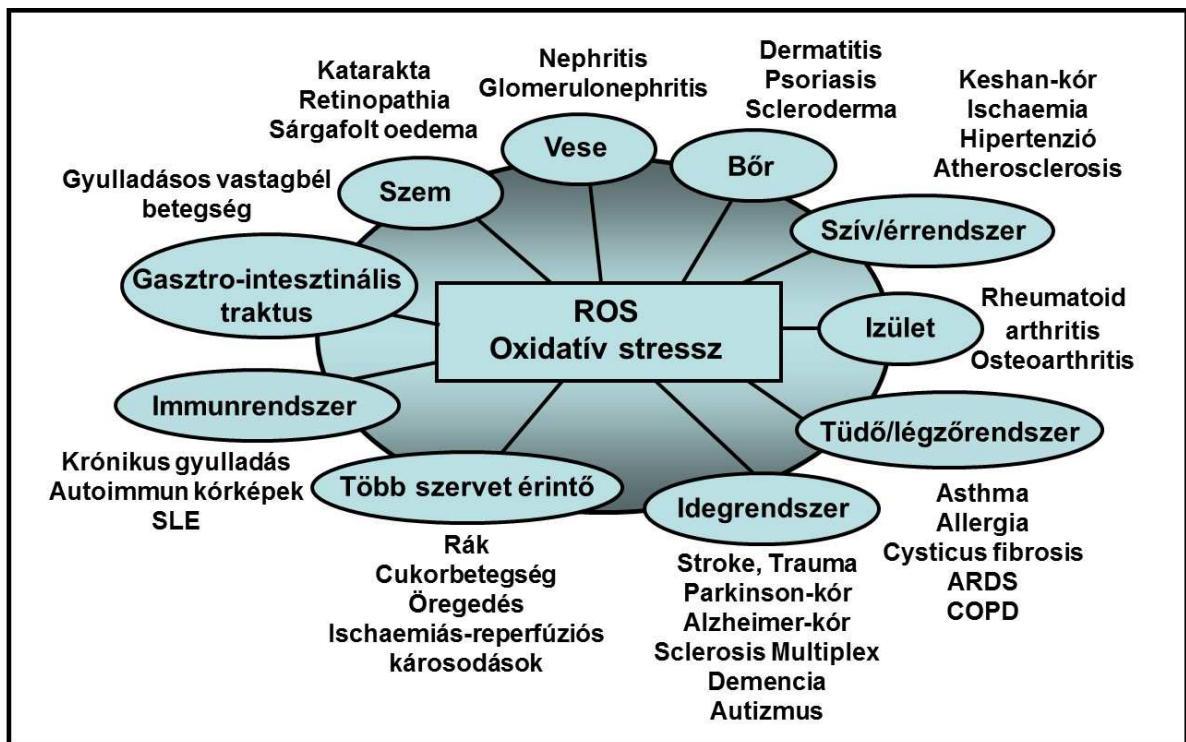
A sejtek antioxidáns kapacitásuk révén képesek védekezni az őket érő ROS-ok káros hatásaival szemben. Az evolúció során az antioxidáns védelem első vonalaként számos olyan biológiai stratégia alakult ki, mely a ROS-ok káros hatásainak kivédését szolgálta, így például a DNS kromatinba történő csomagolása a genetikai információ megőrzése céljából, különböző DNS javító enzimikus mechanizmusok kifejlődése, vagy specifikus pigment anyagok (melanin) felhalmozása a káros ultraviola sugárzás elleni védelem céljából [18]. Ezen kívül a sejten belül, illetve a sejtek közötti térben számos olyan molekula található, melyek antioxidáns tulajdonságaik révén képesek lelassítani vagy meggátolni más molekulák oxidációját, azáltal hogy megakadályozzák az oxidatív láncreakciókat és eliminálják a reaktív gyököket. A sejtek ezen védelmi mechanizmusa tulajdonképpen egy többkomponensű rendszer, melynek nem enzimikus és enzimikus elemei is ismertek. A nem enzimikus, poláros antioxidánsok a citoplazmában és a vérben lévő gyököket semlegesítik, míg az apolárosak a sejthártyákat védik a lipidperoxidációtól. Ezen nem enzimikus anyagok közé tartoznak például az aszkorbinsav (C-vitamin), az α -tokoferol (E-vitamin), a glutation, ubiquinon, melatonin, karotinok, valamint egyes fémkelátok, melyek redukáló csoportjaik révén képesek neutralizálni a ROS-okat. Az enzimek közül a már fentebb említett szuperoxid-dizmutáznak kiemelkedő szerepe van a $O_2^{\cdot-}$ eliminálásában. Továbbá számos kataláz és peroxidáz - például a glutation-peroxidáz - is része az antioxidáns védelemnek [19]. A sejtek oxidatív állapotát tehát legfőképpen a reaktív gyökök és az antioxidánsok sejten belüli aránya határozza meg.

II.5. A ROS-ok szerepe humán kórképek patobiokémiai mechanizmusaiban, illetve jelátviteli folyamatokban

A már korábban említett endogén vagy exogén tényezők hatására fokozott mennyiségben termelődő ROS-ok a szervezetben felhalmozódva károsíthatják a sejtek strukturális elemeit és számos olyan betegség kockázatát növelik, mint például a szív- és érrendszeri megbetegedések, ahol a lipidek oxidatív módosítása érlelmeszesedés (atherosclerosis) kialakulásához vezethet [20]. Ugyanakkor az öregedési folyamatokban és számos olyan kórkép patogenezisében is jelentős szerepet tulajdonítanak az oxidatív stressznek, mint például a különböző rákos, autoimmun és légúti megbetegedések, illetve

neurodegeneratív elváltozások [21, 22]. A **3. ábra** foglalja össze az egyes szervrendszereket érintő humán betegségeket, amelyek kórfolyamataiban bizonyítottan szerepet játszanak a ROS-ok. A sejtekben és a szövetek között fiziológiásan uralkodó hipoxiás milió hosszabb életidőt tesz lehetővé a reaktív gyökök számára, így a ROS-ok nem toxikus koncentrációban a sejtek szignalizációs és regulációs folyamatainak résztvevőivé válhatnak [4, 23]. Fontos szerepet tulajdonítanak például a mitokondriális ROS-oknak, mivel a sejtek apoptotikus folyamatainak regulátoraiként szolgálhatnak. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) és az interleukin-1 (IL-1) gyulladáscsökkentő citokinek által indukált apoptotikus útvonalakban részt vesznek a mitokondriális eredetű reaktív gyökök [24, 25]. Így a mitokondriumot, mint „oxigén szenzort” a hipoxia által kiváltott géntranszkripció mediátoraként tartják számon [26, 27]. Továbbá hipoxiás körülmények között a fokozott mitokondriális ROS szint esszenciális a hipoxia-indukálható transzkripció faktor-1 (HIF-1) aktiválásához [28]. Ismert, hogy a természetes immunválasz résztvevői a granulociták, illetve makrofágok IL-1 β pro-inflammatórikus citokin aktiváló hatására NADPH oxidáz enzimük révén ROS-okat termelnek. Ezen ROS-ok elengedhetetlenek a nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) transzkripció faktor aktiválásához. Az NF- κ B olyan szignalizációs útvonalak központi komponense, melyek a granulociták inflammatórikus válaszait indukálják [29]. Kísérletek igazolták a ROS-ok szerepét az inzulin, illetve a vaszkuláris növekedési faktor (VEGF) szignál transzdukciós útvonalaiban, valamint egyes tanulmányok a H₂O₂-nek másodlagos hírvivő szerepet is tulajdonítanak [30].

A fentebb említett példák egyértelműen rávilágítanak arra, hogy káros hatásuk mellett a ROS-ok a sejtek jelátviteli útjainak fontos elemei lehetnek, illetve tükrözik ezen molekulák sejtekre gyakorolt sokrétű hatását.



3. ábra Humán kórképek, melyek patomechanizmusában szerepet játszanak a reaktív oxigéngyökök (ROS-ok), illetve az oxidatív stressz

ARDS: Akut respiratorikus distressz szindróma, COPD: Krónikus obstruktív tüdőbetegség, SLE: Szisztémás lupus erythematosus.

Francesco Galli et al., *Cardiovascular Disorders in Hemodialysis*. 2005. 149:240-260

II.6. A DC-k jelentősége az immunválasz során

Környezetünk, melyben élünk otthont nyújt számos patogén természetű mikroorganizmusnak, melyek veszélyt jelenthetnek az emberi szervezet számára. Az immunrendszerünk egyik legfontosabb feladata ezen patogének elleni hatékony védekezés, melyet a természetes (veleszületett) valamint az adaptív (szerzett) immunválasz összehangolt működése biztosít [31]. E kétszintű védelmi vonal a szervezetbe kerülő nem saját (vírusok, baktériumok, gombák, egysejtű paraziták, férgek) vagy megváltozott saját struktúrák (tumorossá vált, vagy patogénnel fertőzött sejtek) ellen immunreakciót indít, melyben kiemelkedő szerepe van a természetes és adaptív immunválaszt összekötő DC-knek. A bőrben és a mukózális felszínnek alatt összefüggő hálózatot alkotó és a testi szövetekben elszórtan jelen lévő DC-k a természetes immunitás részeként nagy mennyiségben képesek oldott anyagokat és részecskéket felvenni, majd a szöveti környezet változásaira reagálva ezeket a közeli nyirokszervekbe szállítani. Ebben a környezetben a DC-k a leghatékonyabb APC-kké differenciálódnak és a szöveti antigéneket bemutatják az

adaptív immunválasz képviselőinek, a T limfocitáknak [32]. A naív, azaz antigénnel még nem találkozott T sejtek ugyanis nem képesek az antigén expozíció helyére, azaz a perifériás szövetekbe vándorolni, valamint a T sejtek általi antigén felismeréshez az antigén előzetes feldolgozása és megfelelő bemutatása szükséges [33]. Ezen funkciók ellátását végzik az APC-kként működő DC-k. Így az adaptív immunválasz gyulladás vagy ellenanyag termelés irányába történő polarizációjában meghatározó szerepe van a DC-knek, melyek a T sejtek felé történő antigén prezentáció révén összekötik a természetes és adaptív immunválaszok folyamatait. A DC-k fenotípusától, az általuk kifejezett receptorok, adhéziós molekulák és a termelt citokinek arányától és természetétől függően a nyugvó T limfociták különböző effektor sejtekké differenciálódhatnak, beindítva ezáltal az adaptív immunválaszt.

Ezek alapján elmondható, hogy mai ismereteink szerint a DC-k a leghatékonyabb hivatásos APC-k, melyek képesek a T sejtek által közvetített adaptív immunválaszok kiváltására, és részt vesznek az idegen vagy veszélyes anyagok eltávolítását eredményező végrehajtó folyamatokban, valamint az immunológiai memória kialakításában és fenntartásában egyaránt.

II.7. A DC-k eredete és fajtái

A DC-keket, mint a humán perifériás vér heterogén sejtpopulációját 1973-ban írták le először. Felfedezésük Ralph Steinman kanadai és Zanvil Alexander Cohn amerikai tudósok nevéhez fűződik [34].

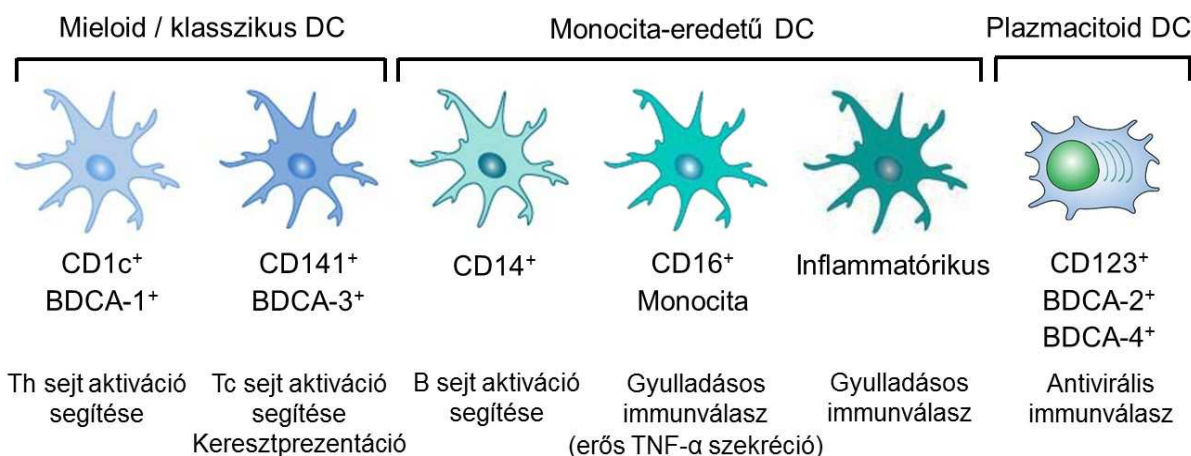
A DC-k, az immunrendszer egyéb sejtjeihez hasonlóan a csontvelői CD34⁺ hematopoetikus őssejtekből származtathatóak, melyek különböző fejlődési útvonalakat követve mieloid, illetve limfoid előalakokká differenciálódnak, melyek ezt követően a perifériás szövetekben telepednek le. A DC-k eredetét illetően számos eltérő hipotézis látott napvilágot. Egyes tanulmányok egy a vérben lévő, közös DC prekursor jelenlétét feltételezték, melyből az összes DC altípus képes differenciálódni [35], míg mások a DC-k bizonyos altípusait limfoid sejtvonal irányában elkötelezett sejtpopulációként írták le [36, 37]. Az utóbbi évek kutatásai viszont rávilágítottak arra, hogy a DC-k fejlődési folyamatai sokkal nagyobb flexibilitást mutatnak. Legfrissebb eredmények szerint mieloid, illetve limfoid prekursorokból is keletkezhetnek DC-k, melyek fms-szerű tirozin kináz-3 (fms-like tyrosine kinase-3, FLT3) receptort expresszálnak felszínükön, mely receptor jelenléte döntően befolyásolja a DC irányba történő differenciálódást. A DC altípusok esetében a prekursorok előfordulási aránya, illetve az adott szöveti környezet befolyásolja azt, hogy az FLT3 receptort expresszáló mieloid vagy limfoid előalak szolgál-e a DC-k

prekurzoraként. Ugyanakkor elmondható, hogy döntő többségben a mieloid eredetű DC differenciáció a jellemző [38].

Mai ismereteink szerint a DC-k szöveti lokalizációjuk, eredetük, aktivációs állapotuk és funkcionális sajátásaik alapján rendkívül heterogén sejtpopulációt alkotnak, viszont előfordulási arányuk a vér fehérvérsejtjei között igen kicsi, a szövetek közötti térben pedig ennél is kisebb arányban képviseltetik magukat [39]. A jelenlegi irodalmi adatok alapján a humán DC-k morfológiájuk, sejtfelszíni markereik, illetve funkcionális sajátásaik alapján több alpopulációra különíthetők el. Szöveti lokalizációjuk alapján a DC-ken belül a humán szervezetben megkülönböztetünk migrációs és limfoid szövet rezidens DC-eket. Az előbbi DC típus a klasszikus értelemben vett DC, mely legtöbb idejét a perifériás szövetekben tölti az immunrendszer őrszemeként, majd az ott felvett antigéneket a nyirokcsomókba szállítja [40]. Ilyen migratórikus DC alpopulációnak felelnek meg például a Langerhans sejtek [41, 42], a szövetközi (intersticiális) DC-k, valamint minden olyan DC, melyek lokalizációja perifériás, de nem limfoid szövethez kötött. A limfoid szövet rezidens DC-k viszont nem rendelkeznek migrációs aktivitással, ezen DC-k kizárólag a limfoid szövetekben történő antigén felismerésre specializálódtak [43]. Így a nyirokcsomókban található DC-k körülbelül fele rezidens DC, melyekre jellemző az éretlen DC fenotípus (sejtfelszíni kostimulatórikus és érési markerek alacsony expressziós szintje), illetve a fokozott antigén felvevő képesség, míg a nyirokcsomói DC-k másik felét a perifériás szövetekből érkező érett, migrációs DC-k képezik, melyeknek fagocitotikus aktivitása háttérbe szorul, és az antigén prezentáló funkciója kerül előtérbe [44, 45].

A migrációs DC-eket specifikus sejtfelszíni markereik alapján további specializált funkcióval bíró alcsoportokra lehet bontani. Ezen alcsoportok közös fenotípusos jellemzője, hogy Lin^- , CD11c^+ sejtek, melyek sejtfelszínükön expresszálják a fő hisztokompatibilitási komplex II (MHC II) családba tartozó, antigén prezentációban központi szerepet játszó fehérjét. Ezek alapján megkülönböztetünk CD103^+ DC-eket, melyek a humán béltraktusban lokalizálódva a szájon át érkező szolubilis antigének bemutatására specializálódtak [46]. A vérben lévő klasszikus, mieloid eredetű DC-k képviselői a CD1c^+ (Blood Dendritic Cell Antigen-1⁺, BDCA-1⁺) és a CD141^+ (BDCA-3⁺) DC-k, melyeknek eltérő, egyedi génexpressziós mintázata eltérő funkciókra utal. Míg előbbi nagymértékben expresszálja a bakteriális sejtalkomponensek felismerésére alkalmas Toll-like receptor (TLR) 4-es típusát [47], addig a CD141^+ DC-k endoszómális TLR3 expressziója fokozott, mely receptoron keresztül aktiválódva nagy mennyiségű interferon- λ (IFN- λ) antivirális citokin termelésére képesek [48]. Külön alpopulációt

képeznek a pDC-k, melyek nagy mennyiségű I-es típusú IFN termelésük révén az antivirális immunválasz egyik legfőbb képviselői, ugyanakkor gyengébb T sejt indukáló képességgel jellemezhetőek [49]. Ezzel szemben a mieloid DC-k a professzinális antigén prezentáló DC-k, melyek nélkülözhetetlenek a naív T sejtek aktivációjához [50, 51]. A monocita-eredetű DC-ken belül további kisebb alcsoportokat képeznek a CD14⁺ DC-k, melyeknek fontos szerepe van az antitest-termelő B sejtek aktivációjában [52], illetve a CD16⁺ monociták, melyek a DC-khez hasonló fenotípusos sajátosságokkal rendelkeznek, ezért a vérben lévő DC-k közé sorolják őket [53]. Külön DC populációként említendő a szintén monocita-eredetű, úgynevezett inflammatórikus DC-k, melyek kizárólag gyulladást követően jelennek meg a szövetekben [38]. Fenotípusuk és funkciójuk alapján ezen DC-k hasonlítanak leginkább az *in vitro* körülmények között monocitákból differenciáltatott DC-khez, melyek széles körben elterjedt és elfogadott modelljei a humán cDC-knek [54]. Az inflammatórikus DC-k egyik jellegzetes képviselőjének, az IDEC-nek (inflammatory dendritic epidermal cell) a dominanciája jellemzi például az epidermist az atópiás dermatitis esetében kialakuló gyulladáshoz vezető reakciók során [55, 56]. A DC-k CD1a sejt felszíni, lipidkötő fehérje expresszióját figyelembe véve, melynek legfőbb funkciója a saját, illetve patogén eredetű lipidek prezentálása, megkülönböztethetünk CD1a⁻ és CD1a⁺ DC alpopulációkat, melyek eltérő antigén felvevő képességgel bírnak, valamint különböző citokin, illetve kemokin termelő profiljuk, akárcsak a T sejt polarizáló kapacitásuk [57]. A vérben található főbb DC alpopulációkat és az immunválaszban betöltött legfontosabb szerepüket a **4. ábra** szemlélteti Matthew Collin és munkatársai által leírtak alapján [58]. A vérben lévő DC-k igen heterogén sejt populációt alkotnak, csoportosításuk a szakirodalomban nem egységes, így fontosnak tartjuk kiemelni, hogy jelen disszertációban a konvencionális DC (cDC) elnevezést minden olyan mieloid eredetű DC megnevezésére használtuk, melyek tehát nem pDC-k és a későbbiekben bemutatott kísérleteinkben ezen DC-eket monocitákból differenciáltatott DC-kkel modelleztük.



4. ábra A vérben található, humán DC alpopulációk és az immunválaszban betöltött legfontosabb funkcióik

Th: CD4⁺ segítő (helper) T sejt, Tc: CD8⁺ citotoxikus T sejt.

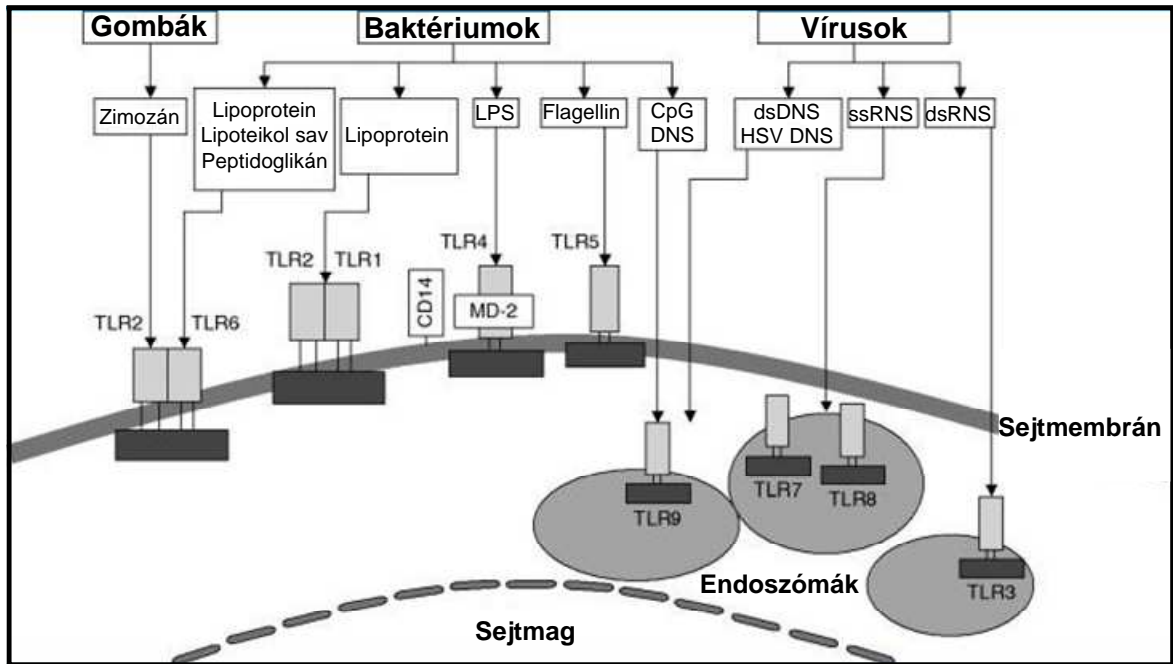
Matthew Collin et al., *Immunology*. 2013. Sep. 140 (1):22-30

II.8. A DC-k szerepe a természetes immunválasz folyamataiban

A DC-k a természetes immunitás részeként a mikroorganizmusok számos csoportját azonosítani képes mintázatfelismerő receptorok (Pattern Recognition Receptor, PRR) széles repertoárjával rendelkeznek. Ezek a sejtfelszínen, citoplazmatikusan vagy endoszómálisan expresszálódó receptorok döntően a kórokozók közös vagy hasonló, a gazdaszervezetben nem képződő invariáns molekuláris struktúráit, az úgynevezett patogénekhez kapcsolt molekuláris mintázatokat (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) ismerik fel. Ezen mintázatok olyan konzervált elemek, melyek a különböző patogének túléléséhez nélkülözhetetlenek, ezért szigorúan megőrződtek az evolúció során. Ilyen molekuláris mintázatok például a Gram negatív baktériumok sejtfalában található endotoxin, a lipopoliszacharid, vagy a bakteriális lipoproteinek, a peptidoglikánok, a lipoteicholsav, a metilálatlan CpG-motívumokat tartalmazó bakteriális vagy virális DNS, valamint az élesztő mannán [59]. A különböző PRR-ok különböző PAMP-okat ismernek fel, mely specifikus szignalizációs útvonalak aktiválásához vezet. Mivel expressziós mintázatok eltérő a különböző DC alpopulációkban, különböző az általuk kiváltott, patogén ellen irányuló immunválasz is. A PRR-ok közé tartoznak a membrán-asszociált C-típusú lektinek, mint például a mannóz receptor, langerin, dektin-1, melyek a patogének felszínén, illetve a patogén struktúrákban lévő cukor oldalláncokat ismerik fel [60]. A citoplazmában elhelyezkedő Nod-típusú receptorok (Nod-like receptor, NLR) olyan bakteriális termékek azonosításában vesznek részt, mint például a peptidoglikánok. Szintén citoplazmatikus lokalizációt mutatnak a vírus nukleinsavak felismerését lehetővé

tevő RIG-szerű helikázok (RLH), illetve az AIM2-szerű receptorok [61]. A már korábban említett TLR-eknek is nagy jelentősége van a mikrobiális struktúrák felismerésében. Ezen receptorok egy része a sejt felszínén (1, 2, 4, 5, 6, 10 és 11), másik részük az endoszómákban (3, 7, 8 és 9) lokalizálódik [60, 62, 63] (**5. ábra**).

A perifériás vérben és szövetekben tartózkodó DC-k ezen receptoraik révén érzékelik a szervezetbe kerülő mikrobákat. A periférián tartózkodó DC-k fenotípusára jellemző a MHC II molekulák (HLA-DQ) alacsony expressziója és a kostimulatórikus molekulák (CD80, CD86) hiánya, másfelől viszont képesek felvenni és lebontani a környezetükben lévő különböző anyagokat [64], mellyel hatékony résztvevői az immunvédelem első vonalának, azaz a természetes immunválasz reakcióinak.



5. ábra Humán TLR-ek és fontosabb ligandjaik

A humán TLR-ek egy része a sejtfelszínen expresszálódik és főként bakteriális sejtalkotókat ismer fel, míg mások az endoszómális kompartmentekben elhelyezkedve főleg virális nukleinsavak felismerését teszi lehetővé. Egyes TLR-ek, úgymint a TLR4 koreceptorok (CD14, MD-2) jelenlétét igényli az aktivációhoz [65, 66]. A TLR-ek közül a TLR2 egyedülálló tulajdonsága, hogy heterodimerizálódni képes a TLR1 és 6 receptorral, szélesítve ezáltal a felismerhető patogén mintázatok spektrumát [67].

HSV: Herpes Simplex Vírus, LPS: lipopoliszacharid, MD-2: limfocita antigén 96, ds: dupla szálú, ss: szimpla szálú.

Dorothea Terhorst et al., Am J Clin Dermatol. 2010. 11(1):1-10

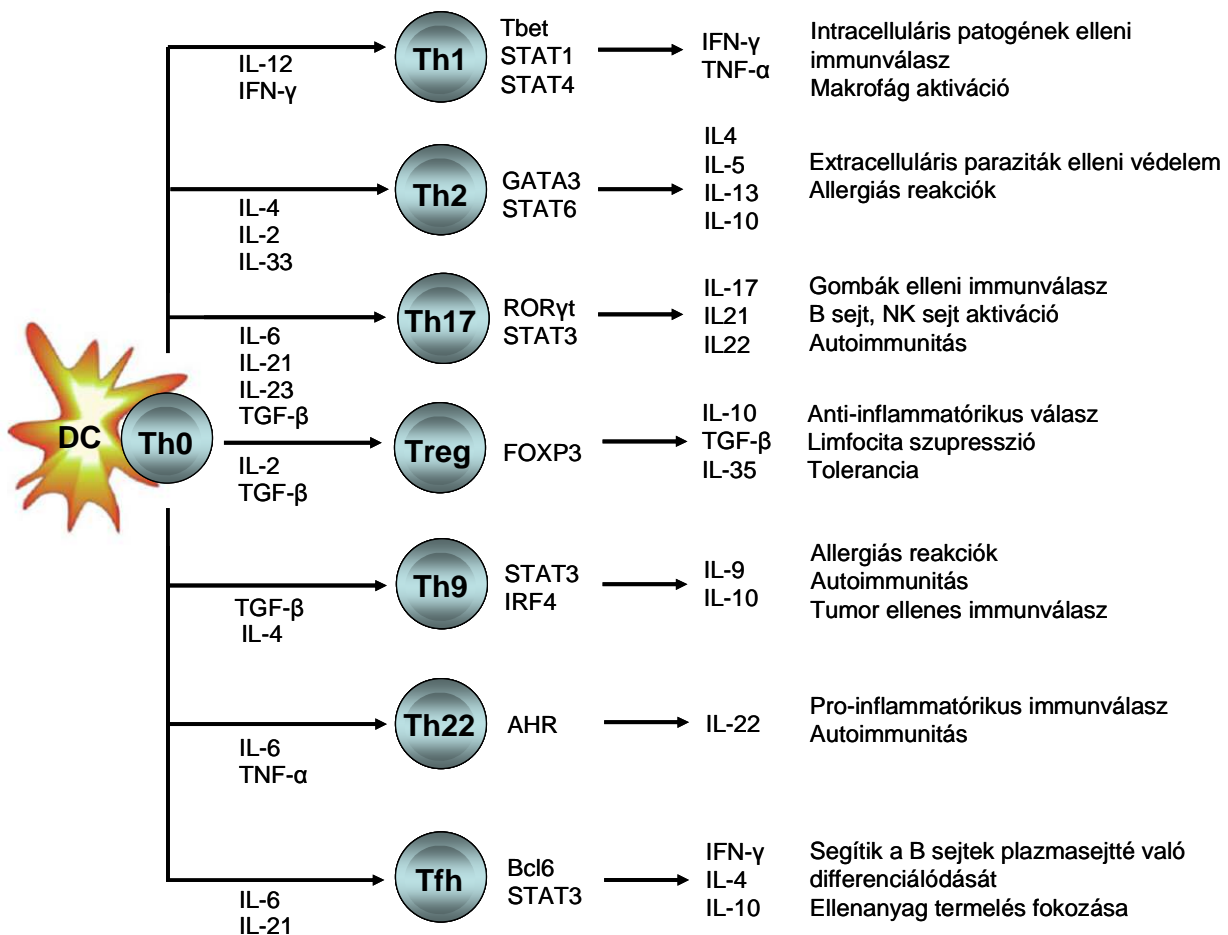
II.9. A DC-k szerepe az adaptív immunválasz polarizálódásában

Az adaptív immunválasz felismerő és végrehajtó (effektor) sejtjei a limfociták, melyek speciális feladataikat csak a természetes immunitás sejtjei és molekulái közreműködésével képesek megfelelő módon elvégezni. A limfociták két funkcionális csoportja a B és T sejtek. Az antigén-specifikus ingerek hatására a B sejtek specifikus ellenanyagot termelő plazmasejteké differenciálódnak, mellyel a humorális immunitás legfőbb képviselői. A T limfociták a natív antigéneket nem képesek felismerni, az antigén felismeréséhez a fehérjék előzetes feldolgozása és megfelelő bemutatása szükséges, melyet az MHC génkomplex által kódolt membránfehérjéket kifejező, antigén prezentáló sejtként működő DC-k végeznek. A veszély szignálok, mint a mikrobiális vagy allergén komponensek, a sérült szövetekből felszabaduló mediátorok (gyulladásos citokinek,

hősokkfehérjék) a DC-k éréséhez szükséges szignálok megjelenését idézik elő. Ennek következtében az antigének lebontásából származó peptidok az MHC molekulákkal komplexet alkotva a sejtek felszínére helyeződnek ki. A DC-k a maturáció során az afferens nyirokerekben keresztül a környéki nyirokcsomókba vándorolnak, miközben az MHC I és II fehérjék, a kostimulatórikus és az adhéziós molekulák, valamint a DC specifikus érési markerek expressziója fokozódik a sejt felszínükön, ugyanakkor antigénfelvevő képességük nagymértékben csökken. Ezen molekulák sejt felszíni megjelenése mind szükséges az immunológiai szinapszis kialakításához, amely a T sejtek általi antigén specifikus felismerést teszi lehetővé. Az érett DC-k felszínének molekuláris mintázata, illetve a DC-k által termelt citokinek együttes jelenléte teszi lehetővé az adaptív immunválasz elindítását [68, 69].

Az antigén prezentációt követően a naív T sejtek különböző effektor T sejtekké differenciálódhatnak az antigén stimulustól függően. Az effektor T sejteknek több alpopulációját is megkülönböztetjük, úgy, mint segítő (helper) T (Th) 1 sejtek, Th2, Th17, Th9, Th22, regulatórikus T (Treg) sejtek, illetve folliculáris Th (Tfh) sejtek (**6. ábra**). A Th1 sejtek kialakulását serkentő citokinek a DC-k által termelt nagy mennyiségű IL-12 citokin, valamint az IFN- γ , melynek termelődéséért az IL-12 által indukált természetes ölősejtek (natural killer cells, NK sejtek) felelősek [70]. Ezen effektor T sejt típus kialakulásában fontos szerepet játszanak még a Tbet, STAT1 és STAT4 transzkripciós faktorok is [71-73]. A Th1 sejtek effektor funkciói közé tartozik az intracelluláris patogének eliminációja, melyet az IFN- γ citokin termelésével tesznek lehetővé, mely citokin makrofág aktivációt eredményez [74, 75]. A Th2 sejtek fejlődéséhez elengedhetetlenek a DC-k által termelt IL-2, illetve IL-33 citokinek, valamint a GATA3 és STAT6 transzkripciós faktorok [76-78]. A Th2 sejteknek kiemelkedő szerepe van az egysejtű paraziták és férgek elleni immunválaszban, valamint részt vesznek az allergiás reakciókban is [74, 79]. A Th17 irányú differenciációt az IL-1, IL-6, IL-22, IL-23 és a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) citokinek valamint a ROR γ t és STAT3 transzkripciós faktorok teszik lehetővé [80-82]. Ezen sejtek az adaptív immunválaszt IL-17, IL-21 és IL-22 citokinek termelése révén befolyásolják. Ezen citokinek fontos szerepet játszanak a T sejt mediálta gyulladáshoz vezető választ létrejöttében, illetve serkentik a B sejtek aktivációját, valamint plazmasejtté való differenciálódását és ezáltal a humorális immunválasz folyamatait [83-85]. További T sejt differenciációs útvonalat jelent a TGF- β és IL-4 citokinek, valamint az interferon reguláló faktor 4 (IRF4) transzkripciós faktor jelenlétében kialakuló Th9 effektor sejtek, melyek IL-9 és IL-10 citokin termelésükkel szerepet játszanak allergiás reakciókban, autoimmun folyamatokban, illetve tumor-ellenes

immunválaszban [86]. Külön effektor T sejt alpopulációt képviselnek a Th22 sejtek, melyek a DC-k által termelt TNF- α és IL-6 citokinek jelenlétében alakulnak ki és IL-22 szekrécióval egyaránt szerepet vállalnak anti-inflammatorikus és pro-inflammatorikus reakciókban is [87]. Az immunológiai tolerancia kialakításának legfőbb elemei a Treg-ek, melyek főként az ártalmatlan antigének ellen kialakuló T sejt válasz kontrollálásában játszanak szerepet, mellyel elkerülhető a krónikus sejt aktiváció és gyulladás, ezáltal megelőzhető a hiperszenzitizáció valamint a T sejt mediált autoimmun kórképek kialakulása [88, 89]. Ezek a T sejtek többféle szubpopulációt alkotnak: a tímuszban található, CD4⁺CD25⁺, valamint FOXP3 transzkripciós faktort expresszáló T limfocitákat természetes szabályozó T sejteknek (nTreg) nevezzük, melyek kis mennyiségben termelnek IL-10 citokint, viszont jelentős szerepük van az autoimmun folyamatok prevenciójában. A periférián a CD4⁺ T sejtek két másik csoportja, az úgynevezett indukálható Treg-ek (iTreg) és a Th3 limfociták. A Th3 sejtekre a TGF- β termelés a jellemző, ezen populáció felelős a mukózális tolerancia kialakulásáért. Az iTreg sejtek felelősek a kiemelkedően magas IL-10 produkcióért, mely anti-inflammatorikus citokin gátolja a Th1 és Th2 sejtek citokin szekrécióját, illetve akadályozza a DC-k MHC II fehérjéinek és kostimulátorikus molekuláinak expresszióját [90, 91]. A Tfh sejtek az effektor T sejtek olyan speciális alpopulációját képezik, melyek CXCR5 receptort expresszálnak sejt felszínükön és a limfoid szövetek folliculáris régiójában lokalizálódva az antigén-specifikus B sejt immunválasz kialakulását segítik [92, 93]. A Tfh limfocitákat az általuk termelt citokinek alapján további alcsoportokba sorolják. A Tfh1 sejtek IFN- γ szekréciójuk révén az IgG2a izotípusú ellenanyagot termelő plazmasejtek differenciációját serkentik, míg a Tfh2 sejtek IL-4 szekréciója IgG1 és IgE izotípusú, a Tfh10 sejtek IL-10 szekréciója pedig az IgA antitestek termelődését indukálja [94]. A Th sejtek mellett a másik nagy effektor T sejt populációt a specifikus ölképességgel is rendelkező citotoxikus T sejtek alkotják, melyek MHC I fehérjékhez kötött vírus, baktérium vagy tumor eredetű fehérjékből képződő peptidek felismerésére képesek, így kiemelkedő jelentőséggel bírnak a fertőzött és a tumoros sejtek elpusztításában [95]. A fentebb ismertetett effektor T sejtek az adaptív immunválaszban betöltött funkciójukat csak a DC-k által képesek véghezvinni, mely sejtek közvetlen kapcsolatot képesek teremteni az antigén-specifikus segítő és citotoxikus T limfociták előalakjaival és az általuk termelt citokinek révén befolyásolni tudják az T sejtek aktivációját, illetve polarizációját.



6. ábra Humán effektor, segítő (helper) T sejtek (Th) alpopulációi, citokin profilja, illetve az adaptív immunválaszban betöltött fontosabb effektor funkciói

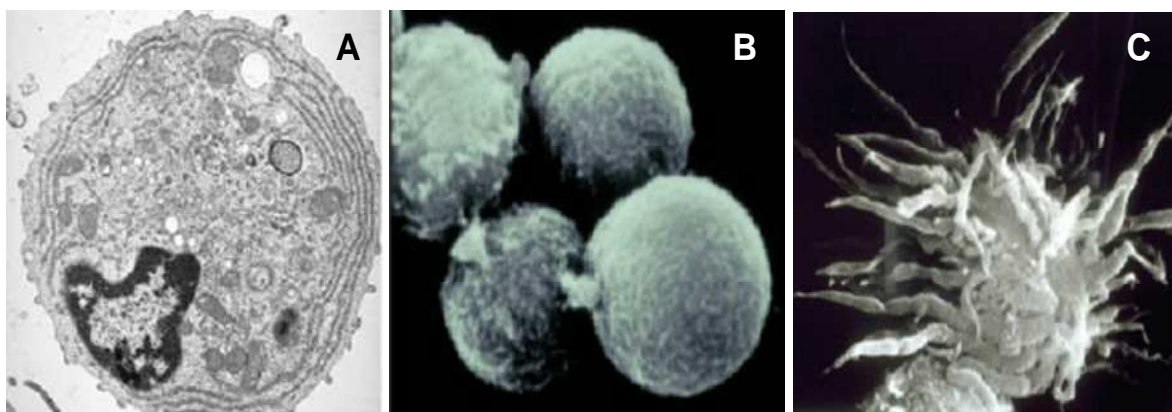
Az adott T sejt polarizáció meghatározó elemei a DC-k által termelt citokinek, illetve a T sejtekben megjelenő transzkripciós faktorok.

Th0: naív T sejt, Treg: regulatórikus T sejt, Tfh: folliculáris segítő (helper) T sejt, AHR: aril-hidrokarbon receptor.

II.10. A DC-k speciális alpopulációja, a pDC-k

A pDC-kről sokkal kevesebbet tudunk, mint a cDC-kről, ugyanis nehéz őket az *in vitro* vizsgálatokhoz szükséges mennyiségben szeparálni az emberi szervezetből (a perifériás vérben található mononukleáris sejteknek mindössze ~0,2 – 0,8 %-át teszik ki). A humán perifériás vérben található pDC-k fenotípusukat tekintve Lin⁻ HLA-DR⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CD123⁺ ILT3⁺ ILT1⁺ CD11c⁻ sejtek. Specifikus sejtfelszíni antigénjeik a BDCA-2, illetve a BDCA-4 fehérje. Felszínükön nagy mennyiségben expresszálják az IL-3 receptor α -láncát (CD123), melynek ligandja az IL-3 citokin, mely fontos szerepet tölt be ezen sejtek érési és differenciálódási folyamataiban [49].

A pDC-k egyedülálló tulajdonsága, hogy professzionális I-es típusú IFN-t termelő sejtekként (Interferon Producing Cell, IPC) terminális differenciálódás nélkül képesek ellátni specializált funkciójukat a virális infekció elleni immunválaszban, és ezt követően hivatásos APC-kké differenciálódva beindíthatják az adaptív immunválaszt [96]. Ezt a kettősséget alapul véve az irodalomban az IFN-termelő állapotra a plazmacitoid pre-dendritikus sejt vagy a professzionális I-es típusú IFN-t termelő sejt megnevezés, ugyanakkor a DC megjelenésű, hivatásos APC állapotra a plazmacitoid eredetű dendritikus sejt elnevezés vált elfogadottá (**7. ábra**).



7. ábra A humán plazmacitoid dendritikus sejtek (pDC-k) morfológiája

(A) A humán pDC-k plazmasejt-szerű morfológiát mutatnak, jellemző rájuk az excentrikus elhelyezkedésű, vese alakú sejtmag marginális heterokromatinnal. Jól fejlett endoplazmatikus retikulummal, illetve kisméretű Golgi-apparátussal rendelkeznek, valamint a citoplazmájukban számos mitokondrium található. Pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgálva ezen sejteket, IFN-t termelő alakjai (pre-pDC-k) sima, kerek, limfoid morfológiát mutató 8-10 μm átmérőjű képletekként jelennek meg (B), míg érett, aktivált állapotban DC morfológia jellemzi a sejteket (C). Az eredeti nagyítás mértéke: 7000X (A), 3000X (B és C).

Yong-Jun Liu et al., Annu. Rev. Immunol. 2005. 23:275-306

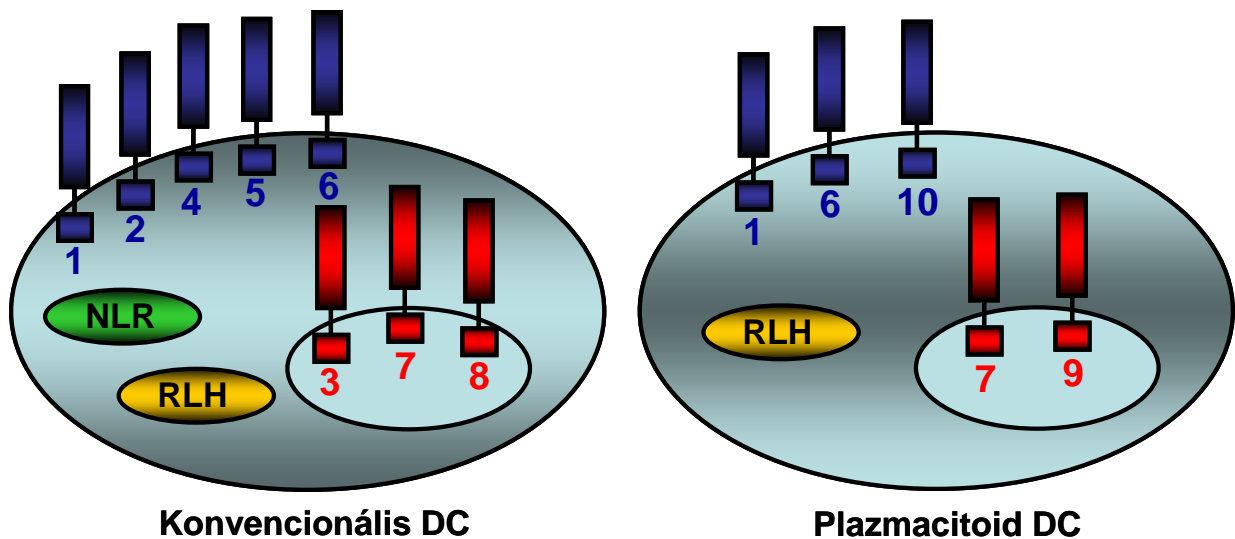
A pDC-k a mintázatfelismerő TLR-ek közül nagymértékben expresszálják endoszomálisan a TLR7-et, illetve a TLR9-et [97], hasonlóan a B sejtekhez [98]. A TLR7 specifikusan ismeri fel a virális egyszálú RNS-eket, valamint a guanozin analóg vegyületeket, mint például a szintetikus imidazokinolinokat (pl. imiquimod, resiquimod). A TLR9 agonistái a metilálatlan CpG-motívumot tartalmazó oligonukleotidok, melyek jelenléte a bakteriális és virális DNS-re jellemző. Ezen receptor-kifejeződési mintázat is tükrözi a DC alpopulációk eltérő, ám részben átfedő specializációját, mivel a cDC-k főleg

a bakteriális sejtalkotók azonosítására alkalmas TLR-eket (TLR1, 2, 4, 5, 6) expresszálják a TLR7 mellett [99-101] (**8. ábra**).

A pDC-k a fentebb említett mintázatfelismerő receptoraik által aktiválódva gyors, nagy mennyiségű I-es típusú IFN termeléssel válaszolnak. Az I-es típusú IFN-ek - az IFN- α és az IFN- β - a természetes immunitás fontos faktorai, amelyek közvetlen antivirális aktivitásuk mellett, a pDC-k és a cDC-k érését is irányítják [102]. A pDC-k -nagyfokú specializációjuknak köszönhetően- a többi magvas sejttípusnál 1000-szer nagyobb mennyiségű I-es típusú IFN termelésére képesek vírusinfekció hatására. Ezen egyedülálló és nagymértékű IFN termelés molekuláris mechanizmusának részletei sokáig ismeretlenek maradtak a tudósok számára. A közelmúltban viszont bizonyítást nyert, hogy ezen specifikus tulajdonság molekuláris hátterében egy speciális tér- és időbeli szabályozás áll. Ugyanis az aktiválódott TLR9 és a hozzá kötődő adaptor molekula (MyD88) közel 30 percig visszatartásra kerül a korai endoszómában, mialatt a TLR-en keresztüli jelátvitel aktív marad és az így állandóan magas szinten tartott IRF7 expresszió az I-es típusú IFN gének fokozott átírását teszi lehetővé [103, 104]. Ezen egyedülálló és nagymértékű IFN termelésnek köszönhetően a pDC-k már a perifériás szövetekben képesek egyfajta védelmi vonalat biztosítani a patogénekekkel szemben. Ugyanakkor fiziológiás körülmények között a pDC-k a csontvelőben, a limfoid szervekben és a vérben lokalizálódnak, eltérően a cDC-ktől, melyek főként a perifériás szövetekben tartózkodnak. A pDC-k jelenléte a periférián csak közvetlen antigén expozíciónak kitett szövetekben mutatható ki. Jelenlétüket eddig igazolták nazális nyálkahártyában, kísérletesen indukált allergiás rhinitis esetén [105], valamint bőrben, allergiás kontakt dermatitisben [106]. Az érett pDC-k a perifériás szövetekből a nyirokcsomókba vándorolnak [107], ahol hivatásos APC-kké differenciálódva MHC II molekulához kötötten antigéneket mutatnak be a naív T sejtek számára. Legújabb eredmények szerint a pDC-k képesek keresztprezentációra (exogén antigének MHC I molekulán történő bemutatása T sejteknek) is, hasonlóan a cDC-khez [108]. A pDC-k nagyfokú plaszticitását mutatja az a tény, miszerint képesek indukálni majdnem minden T sejt differenciációs útvonalat, beleértve a Th1, Th2, Th17, Th22 és Treg irányú polarizálódást [109, 110]. A pDC-k által kiváltott T sejt válasz nagymértékben függ az antigén stimulus fajtájától, a sejteket érő citokin ingertől, illetve az adott szöveti környezettől, melyek mind befolyásolhatják a pDC-k fenotípusos és funkcionális differenciálódását. Így például az I-es típusú IFN-ek által aktivált pDC-k a Treg sejtek képződését segítik, a hízósejtekből származó IL-3 által indukált pDC-k pedig a Th2 limfociták kialakulásának kedveznek, míg a CpG-oligonukleotidok és a CD40 ligandum által aktivált pDC-k a Th1 differenciálódást teszik lehetővé [111]. Egyes tanulmányok

tolerogén tulajdonsággal ruházzák fel az aktiválatlan pDC-eket, mivel nagymértékű indukálható kostimulatórikus-ligand (ICOS-L) expressziójuk esszenciális szignált biztosít az IL-10 termelő FOXP3⁺ Treg sejtek túléléséhez [112, 113]. Bizonyított továbbá a pDC-k tolerogenitása számos humán tumoros elváltozás esetében is, így például mell-, illetve méhnyakrák esetében [113-115]. Ugyanakkor immunstimuláló hatásuk megkérdőjelezhetetlen az antivirális immunválaszban, valamint különböző autoimmun kórképekben, mint például szisztémás lupus erythematosusban (SLE), illetve psoriasisban is [109].

A humán pDC-k ezen kettős tulajdonsága, miszerint tolerogén, illetve immunogén irányba is képesek polarizálni az adaptív immunválaszt, világossá teszi számunkra ezen sejttípus jelentőségét a különböző immunregulatórikus folyamatok szabályozásában.



8. ábra A humán cDC-k és pDC-k mintázatfelismerő receptorainak expressziós mintázata

A cDC-k, illetve a pDC-k egymást kiegészítő funkcióval rendelkeznek az immunválasz során, melyet jól tükröz mintázatfelismerő receptoraik expressziós profilja is. Ugyanis míg a cDC-k főleg a bakteriális sejtalkotók felismerésére specializált TLR-eket expresszálnak, addig a pDC-k főleg a virális komponenseket ismerik fel konstitutívan expresszálódó, endoszómális TLR7 és 9 receptoruk által. A cDC-k esetében a citoplazmatikus DNS szenzorok közül az NLR-ok, illetve az RLH-k is jellemzőek, addig a pDC NLR expressziója nem jellemző. Az ábrán szereplő számok a különböző TLR altípusokat jelölik.

NLR: Nod-szerű receptor, RLH: RIG-szerű helikáz.

Szilvia Benko et al., Biol Chem. 2008. 389:469-85

II.11. Az oxidatív stressz és a DC-k kapcsolata

II.11.1. Az oxidatív stressz lehetséges hatása a humán pDC-k funkcióira

A perifériás szövetekben az antigén expozíciót követően a gyulladós sejtek (makrofágok, neutrofil és eozinofil granulociták) működése révén oxidatív stressz alakulhat ki. Az általuk generált ROS-ok célszerű hatásukon – a mikroorganizmusok, célsejtek elpusztításán – kívül, az extracelluláris térbe jutva károsíthatják a környező szöveteket. A különböző makromolekulák (proteinek, lipidek, DNS) roncsolásán keresztül pedig láncreakciót indíthatnak el, melynek eredménye további sejtbeáramlás a gyulladt területre [116]. Az antigén expozíció helyén lévő vagy a gyulladás helyére érkező, a vérkeringésből kilépő DC-k tehát olyan szöveti környezetbe kerülnek, ahol a gyulladós válasz által termelődött ROS-ok hatnak rájuk, mely befolyásolhatja az immunválaszban betöltött szerepüket.

Több tanulmány is beszámol arról, hogy a CD14⁺ monocitákból differenciáltatott DC-ken a H₂O₂ indukálja az MHC I fehérjék, illetve az MHC II osztályba tartozó HLA-DQ és HLA-DR sejt felszíni fehérjék expresszióját is, valamint a H₂O₂-vel kezelt DC-k nagyobb mértékben képesek indukálni a T sejtek proliferációját [117]. Xantin-oxidáz/xantin enzim-szubsztrát rendszer segítségével kiváltott oxidatív stressz szintén fenotípusos változásokat eredményezett monocitákból származó DC-ken, ugyanis a kostimulatórikus molekulák (CD80, CD86) és érési markerek (CD83) sejt felszíni expressziója megnövekedett az enzim működése által generált O₂^{•-} hatására. Igazolták továbbá, hogy xantin-oxidáz/xantin jelenlétében, azaz oxidatív stressz körülményei között a DC-k endocitotikus aktivitása nagymértékben csökkent, mely a DC-k érésére utal. Ezen hatás xantin-oxidázt gátló vegyületekkel (allopurinol, oxypurinol, amflutizol), valamint antioxidáns, N-acetil-cisztein (NAC) jelenlétében felfüggeszthető [118]. Megfigyelték azt is, hogy a H₂O₂-kezelt DC-k TNF- α pro-inflammatórikus citokin, illetve IL-8 kemokin szekréciója fokozódik [119]. A cDC-k közé tartozó, epidermisben lokalizálódó Langerhans sejtek esetében is sikerült igazolni, hogy az UV sugárzás által generált ROS-ok fokozzák a sejtek felszínén található kostimulatórikus molekulák (B7.1 és B7.2 családba tartozó fehérjék) expresszióját [120]. Ugyanakkor a ROS-ok indirekt hatásai is bizonyíthatók a DC-k aktivációjában, ugyanis az oxidatív módon módosított fehérjék fokozhatják a DC indukálta T sejt proliferációt [121]. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a cDC-k esetében az oxidatív stressz aktivációs szignálként funkcionálhat az adott antigén stimulus mellett.

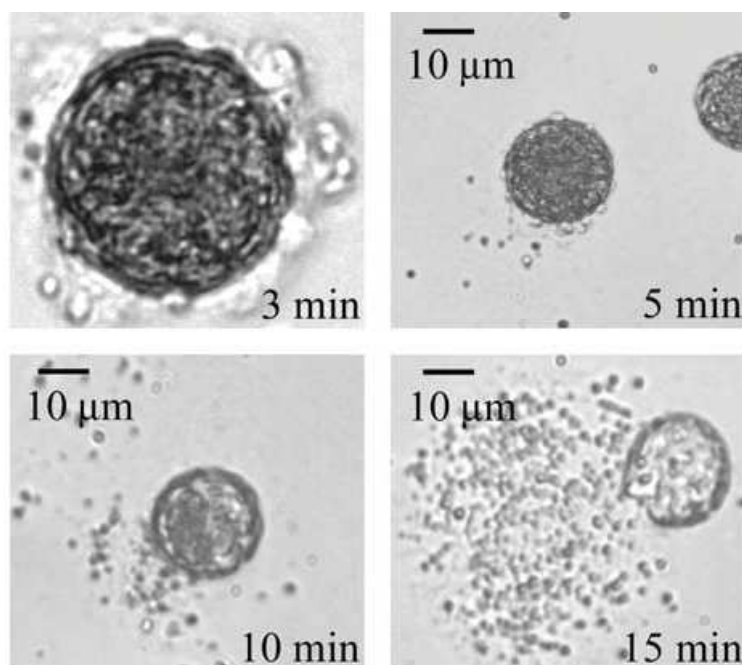
Az irodalomban nincs adat arra nézve, hogy a pDC-k, amelyek számos tekintetben különböznek az ezirányú vizsgálatokban modellként alkalmazott cDC-ktől, hogyan viselkednek oxidatív stressz körülményei között. Feltételezhető ugyanakkor, hogy azon oxidatív szöveti környezet, ahol a pDC-k antigénnel találkoznak, hatással lehet ezen sejtek működésére is, mely megnyilvánulhat a sejt felszíni fehérjék expressziójának változásában, a sejtek citokin, illetve kemokin szekréciójára is kihathat, valamint a pDC-k T sejt aktiváló és polarizáló képességét is befolyásolhatja.

Így munkám során célul tűztem ki a pDC-k oxidatív stresszre adott válaszreakciójának tanulmányozását, mellyel átfogóbb képet alkothatnánk a pDC-k immunválaszban betöltött szerepéről.

II.11.2. Allergének által kiváltott oxidatív stressz hatása a DC-k aktivációjára

A pollen eredetű allergiás megbetegedések gyakorisága az elmúlt évtizedekben olyan mértékben megemelkedett, hogy a fejlett országokban ma már népbetegségként

tartják számon. Hazánkban a parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*) igen jelentős aeroallergén növénynek számít, a lakosság közel 20 %-a szenved különböző parlagfű pollen által kiváltott allergiás megbetegedésekben. Az intakt parlagfű pollenszemek mérete (20-30 μm) túl nagy ahhoz, hogy az alsóbb légutakba penetráljon, így a felső légutakba jutva okozza a klasszikus allergia tüneteit a parlagfűre érzékeny egyéneknél [122]. Ugyanakkor korábbi kutatási eredmények alapján elmondható, hogy a pollenszemekből hidratáció során úgynevezett szubpollen partikulák (SPP) (9. ábra) szabadulnak ki, melyek megőrzik az intakt pollenszemekre jellemző allergén komponenseket, illetve ROS generálására képes NAD(P)H oxidáz enzimeket, ezáltal fontos szerepet játszanak az allergiás tünetek kiváltásában [123]. A belégzett SPP-k méretüknél fogva (0,5 – 4,5 μm) már képesek az alsóbb légutakba jutni ahol közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a légúti DC-kkel.



9. ábra Parlagfű pollenszeméből felszabaduló szubpollen partikulák (SPP)

Intakt parlagfű pollen (*Ambrosia Artemisiifolia*) vízzel történő hidratációját követően a pollenfal felhasad és a pollenszem citoplazmatikus komponensei, az úgynevezett SPP-k kiáramlása figyelhető meg, melynek mértéke az inkubálási idő előrehaladtával fokozódik.

Az eredeti nagyítás mértéke: 100X.

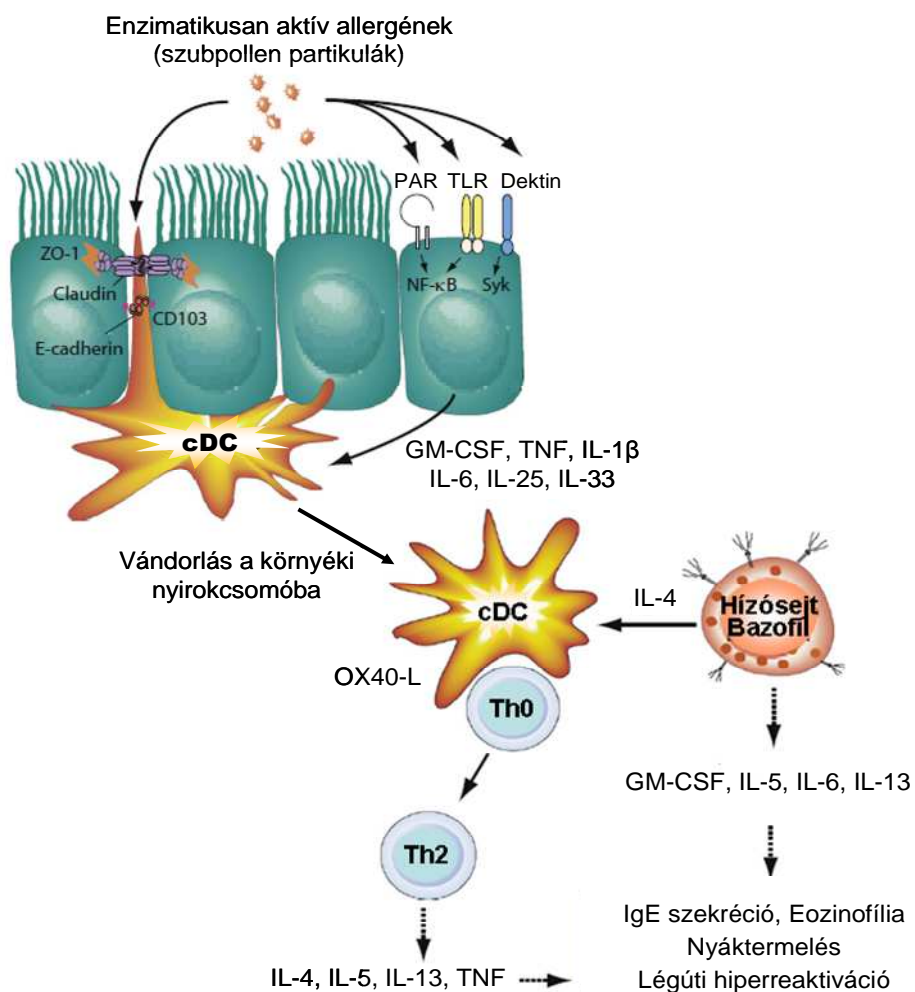
Attila Bacsi et al., J Allergy Clin Immunol. 2006. 118(4):844-850

A légutakban a gyulladásozó sejteken kívül környezeti faktorok is hozzájárulhatnak az oxidatív stressz létrejöttéhez. Bizonyított, hogy a különböző légszennyező anyagok, illetve az ózon, a dohányfüst fokozzák a ROS-ok szintjét a nyálkahártyában, így

súlyosbítják az allergiás légúti gyulladás, valamint az asthma tüneteit [124]. Ehhez hasonlóan a hidratálódott pollenszemek, valamint az SPP-k NAD(P)H oxidáz enzimeik által termelt ROS-oknak is szerepe van a légúti gyulladásos válasz kiváltásában [123, 125].

A respiratórikus traktusban, a szubmucosa alatt az allergének és más részecskék felismerésére és bekebelezésére specializálódott DC-k sűrű hálózatot alkotnak. Az itt található DC-k képesek az epithelsejtek között kinyújtani nyúlványaikat a légutak lumenjébe és ezáltal mintát venni a belégzett antigénekből [126, 127]. Ugyanakkor a parlagfű pollenek szerin proteáz aktivitásuk, illetve ROS termelésük révén roncsolhatják az epithéliális barriert, mely elősegítheti a paracelluláris átjutást és így a találkozást az intraepithéliális DC-kkel [128] (**10. ábra**).

A légúti allergének által kiváltott allergiás reakciók mechanizmusa viszonylag jól tanulmányozott, valamint az is ismert, hogy a ROS-oknak meghatározó szerepe lehet ezen gyulladásos folyamatokban [129], viszont az aeroallergének által kiváltott allergiás kórképek szenzitizációs lépései kevésbé ismeretesek. Feltételezésünk szerint az SPP-knek fontos szerepük lehet a pollen által indukált allergiás megbetegedések szenzitizációs fázisában és ezáltal a DC-k általi adaptív immunválasz aktiválásában, melyre a Th2 polarizáltság jellemző allergiás reakciók esetében. Így céljaim között szerepelt az SPP-k DC aktiváló képességének vizsgálata, különös figyelmet fordítva arra, hogy az SPP-k által termelt ROS-oknak milyen szerepük lehet ezen folyamatokban.



10. ábra Allergén expozíciót követő Th2 polarizáció a légúti DC-k közreműködésével

A légutak hámrétege alatt hálózatot képező DC-k a hámsejtek között nyúlványokat bocsátanak ki a légúti lumenbe, ezáltal folyamatosan képesek mintát venni a külső környezetből. Ezen nyúlványoknak a felszínén a zonula occludensre (tight junction) jellemző fehérjéket (occludin, claudin, zona occludens-1 [ZO-1]) lehet kimutatni, ezért a DC nyúlványok jelenléte nem bontja meg a hámréteg integritását. A belélegzett allergének tehát közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a DC-kkel, anélkül hogy áthatolnának a hámsejtek rétegén. A DC-k az E-cadherinen és CD103 integrinen keresztül is az epithélhez tapadnak. Az enzimatikusan aktív allergének nem csak a DC-ket aktiválják, hanem a hámsejteken expresszálódó receptorok (PAR, TLR, Dectin) aktiválására is képesek, ami kemokin, illetve citokin termelést idéz elő, és segíti a DC-k érését. Ezen hatások eredményeként a DC-k a környéki nyirokcsomóba vándorolnak, ahol naív T sejtekkel (Th0) interakcióba lépve Th2 választ indukálnak. A Th2 polarizáció kialakításában fontos szerepe van a DC-ken kifejeződő OX40-L-nak, illetve a hízósejtek és bazofilek által termelt IL-4 citokinnek. Ezt követően a Th2 sejtekből, a hízósejtekből és bazofilekből felszabaduló mediátorok felelősek a jellegzetes allergiás reakció tüneteinek megjelenéséért.

PAR: proteáz aktivált receptor, GM-CSF: Granulocita-makrofág-kolónia-stimuláló faktor.

Bart N. Lambrecht, Hamida Hammad, *Immunity*, 2009. 31:412-424

II.12. Célkitűzések

1. Antigen expozíciót követően a természetes immunválaszban résztvevő gyulladásosejtek működése révén a perifériás szövetekben oxidatív stressz alakulhat ki. A gyulladás helyére érkező pDC-k a vérkeringésből kilépve tehát olyan szöveti környezetbe kerülnek, ahol oxidatív stressz éri őket. Az irodalomban nincs adat arra nézve, hogy ezen oxidatív környezet milyen hatással lehet a pDC-k immunválaszban betöltött szerepére. Kísérleteink során ezért tanulmányozni kívántuk, hogy a H₂O₂-vel kísérletesen kiváltott, oxidatív stressz:

- hogyan befolyásolja a pDC-k életképességét,
- milyen változásokat eredményez aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával (R837/imiquimod) aktivált pDC-k fenotípusában,
- hogyan módosítja az aktiválatlan, illetve aktivált pDC-k citokin, illetve kemokin szekrécióját,
- milyen hatással van a pDC-k allogén T sejt aktiváló képességére,
- hogyan befolyásolja a pDC-k autológ naív T sejt polarizációját.

2. Korábbi vizsgálatok eredményei alapján ismert, hogy atópiás egyének esetében a pollenszemekből felszabaduló allergének a tüdőben robusztus gyulladást képesek kiváltani, az intakt pollenszemek azonban méretüknél fogva nem jutnak le az alsóbb légutakba, így a folyamat mechanizmusa még tisztázatlan. Legfrissebb tanulmányok szerint a pollenszemekből hidratáció során kiszabaduló SPP-k hordozzák az intakt pollenszemekre jellemző allergén komponenseket, illetve ROS generálására képes NAD(P)H oxidáz enzimeket, ezáltal fontos szerepet játszanak a gyulladás kiváltásában. A belégzett SPP-k méretüknél fogva képesek az alsóbb légutakba jutni, ahol közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a DC-kkel, így jelentős szerepük lehet a pollen-indukált allergiás reakciók szenzitizációs fázisában. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy:

- a humán cDC-k képesek-e az SPP-k felvételére,
- az SPP kezelés aktiválja-e a cDC-eket, ha igen, akkor milyen fenotípusos, illetve funkcionális változásokat eredményez a cDC-ken,
- az SPP kezelés hogyan befolyásolja a cDC-k T sejt proliferációját, illetve allogén T sejt aktiváló képességét,
- az SPP-k NAD(P)H oxidáz enzimjei által termelt ROS-oknak milyen szerepe lehet a DC aktivációban és ezáltal a természetes, illetve adaptív immunválasz folyamataiban.

III. Metodikák

III.1. Etikai nyilatkozat

A kísérletekhez használt, humán eredetű vérkészítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat debreceni Regionális Vérellátó Központjának közreműködésével kaptuk. A human vérkészítményekkel történő munkát az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatója, valamint a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte. Minden vérvétel a donorok előzetes, írásos beleegyezésével történt és a donorok adatainak feldolgozása valamint megőrzése az Orvos Világszövetség által kiadott Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveit követve valósult meg.

III.2. Humán sejtpopulációk izolálása perifériás vérből

Kísérleteinkhez a humán DC-eket, illetve T sejteket egészséges véradók perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből (PBMC) nyertük. Első lépésként a heparinos, buffy coat készítményt Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) meghatározott sűrűségű poliszaharid oldatra rétegeztük 1:1 arányban, majd sűrűség-alapú gradiens centrifugálással elválasztottunk a PBMC réteget a vér további sejtes alkotóitól. Az így nyert vörösvértest és trombocita mentes PBMC-ből mágneses izolálási technikán alapuló, megfelelő sejtizoláló kitek segítségével szeparáltuk a kísérletekhez szükséges sejtpopulációkat. A pDC-k, illetve a naïv CD4⁺ T sejtek esetében negatív szelekción alapuló, míg a CD14⁺ monociták, illetve a CD3⁺ pan-T sejtek esetében pozitív szelekciós eljárásokon alapuló kitek alkalmaztunk, melyeket a Miltenyi Biotec (Bergish Gladbach, Germany) cég forgalmaz. Az izolálási folyamat során a gyártó által megadott utasításokat követtük. A szeparálást követően a sejtpopulációk tisztaságát az adott sejtpopulációkra jellemző specifikus markerek alapján FACSCalibur áramlási citométer (BD Biosciences Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) segítségével ellenőriztük, mely minden esetben 96 % felettinek adódott.

III.3. Humán cDC-k differenciálása CD14⁺ monocitákból

A frissen izolált CD14⁺ monocitákat 24 lyukú tenyésztőlemezen 2×10^6 sejt/ml koncentrációban RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) médiumban szétosztottuk. A tápfolyadékot 2 mM L-glutaminnal (Sigma Aldrich), 100 U/ml penicillinnel, 100 ng/ml streptomycinnel és 10% végkoncentrációjú hőinaktivált FCS-sel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) egészítettük ki. A differenciációhoz szükséges citokineket, a 80 ng/ml granulocita-makrofág-kolónia stimuláló faktort (GM-CSF)

(Gentaur Molecular Products, Brussel, Belgium) és a 100 ng/ml IL-4-et (Peprotech EC, London, UK) a differenciáció 0., illetve a 2. napján adtuk a sejtekhez. A differenciáció 5. napján a sejtek több mint 90%-a éretlen DC fenotípust (DC-SIGN/CD209⁺, CD14⁻) mutatott.

III.4. SPP-k izolálása és enzimaktivitásuk vizsgálata

Az SPP-ket intakt parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*, Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA) pollenszemekből izoláltuk. 100 mg intakt pollent 10 ml steril endotoxin-mentes desztillált vízben 90 percig 4 °C-on hidratáltuk, majd az intakt pollenszemeket alacsony sebességen történő centrifugálással (1600 g, 5 perc, 4 °C) távolítottuk el. A felülúszóból szűrést (Minisart Sterile 5 µm Filter, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA) követően, magas fordulatszámú történő centrifugálással (9000 g, 15 perc, 4 °C) nyertük ki az SPP-ket. A partikulákat tartalmazó pelletet steril, endotoxin-mentes PBS-ben (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) vettük fel és Neubauer kamra segítségével meghatároztuk az SPP-k darabszámát, illetve vizsgáltuk a frissen izolált SPP szuszpenziók endotoxin tartalmát PyroGene™ Endotoxin Detection Assay Kit (Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland) felhasználásával. Az SPP preparátumokban detektálható igen alacsony endotoxin koncentráció (28 pg/ml) alapján elmondható, hogy kísérleteinket az SPP preparátumok endotoxin tartalma valószínűleg nem befolyásolhatta.

A frissen izolált SPP-k NAD(P)H oxidáz enzimaktivitás vizsgálatához 50 µM koncentrációjú 2', 7'-dihidro-dichlorofluorescein diacetát (H₂DCF-DA; Invitrogen) oldatot és szubsztrátként 100 µM-os NADPH-t használtunk. Az enzimaktivitás hatására történő fluoreszcencia intenzitás-változást Synergy HT multiplate olvasóval (Bio-TEK® Instruments, Winooski, VT, USA) 488/530 nm hullámhosszon detektáltuk.

III.5. A DC-k kezelése

A frissen izolált pDC-ket 96 lyukú tenyésztőlemezre 1×10^5 sejt/lyuk koncentrációban 2 mM L-glutaminnal (Sigma Aldrich), 100 U/ml penicillinnel, 100 ng/ml streptomycinnel és 10% végkoncentrációjú hőinaktivált FCS-el (Invitrogen) kiegészített RPMI 1640 médiumban (Sigma Aldrich) szétosztottuk. A sejt kultúrákhoz 50 ng/ml rekombináns humán IL-3-at (Peprotech) adtunk, mert ezen citokin jelenléte *in vitro* körülmények között esszenciális a pDC-k túléléséhez. Kísérletesen kiváltott oxidatív stressz körülményeinek létrehozásához a sejteket stabilizált H₂O₂ (Sigma Aldrich) megfelelő hígításaival (0,01-10 µM) kezeltük. Antioxidánsként 30 mM-os NAC-ot (Sigma

Aldrich) alkalmaztunk. A pDC-k aktiválása TLR7 receptor agonistával (imiquimod, R837, 2,5 µg/ml; Invivogen, San Diego, CA, USA) történt, 24 órás inkubálással.

A cDC-k esetében a különböző kezelések hasonló tápközegben zajlottak, mint a pDC-knél leírtak, kivéve az IL-3 citokin jelenlétét, mely a cDC sejtkultúrák számára nem esszenciális. A cDC-k SPP-vel történő kezelésekor a frissen izolált SPP-ket 1:15 (cDC/SPP) arányban adtuk a sejtekhez a NAD(P)H oxidáz enzim szubsztrátja, 100 µM NADPH (Sigma Aldrich) jelenlétében vagy anélkül. A kontroll kísérletekhez 72°C-on 30 percig hőinaktivált SPP-t (SPP^H), illetve NADPH oxidáz gátlóval, difenilén-jodóniummal (DPI, 5 µM; Sigma Aldrich) 30 percig előkezelt SPP-t alkalmaztunk. A feleslegben maradt DPI-t mosási lépéssel távolítottuk el az SPP preparátumokból. A kezelések időtartama 1, 4, illetve 24 óra volt, az adott kísérleti módszereknek megfelelően.

III.6. Sejtek életképességének vizsgálata

A sejtek életképességét 10 µg/ml koncentrációjú 7-aminoactinomycin D / 7-AAD (Sigma Aldrich) festék segítségével vizsgáltuk, amely DNS interkalátorként a nekrotikus sejtek nukleinsavát festi meg és áramlási citometriás mérésekre alkalmas.

III.7. Sejtek intracelluláris ROS termelésének meghatározása

A sejteket – a tápfolyadék eltávolítását követően - steril 37 °C-os PBS-sel (PAA Laboratories GmbH) mostuk, majd 50 µM végkoncentrációjú fluoreszcens ROS-szenzitív H₂DCF-DA (Invitrogen) festék oldattal inkubáltuk sötétben, 20-25 percig 37 °C-os termosztátban. Az inkubációs idő letelte után a fölösleges festéket PBS-es mosással távolítottuk el. A H₂DCF-DA festékkel töltött sejtek intracelluláris ROS szintjét a különböző kezeléseket követően, a fluoreszcencia intenzitás mérésével határoztuk meg FL1 csatornában (530±15 nm) áramlási citométerrel.

III.8. Sejtek fenotípusos vizsgálata

Kezeléseket követően a DC-k sejtfelszíni markereinek expressziójában bekövetkező változásokat az adott sejtfelszíni antigén elleni, fluoreszcens festékkel konjugált monoklonális antitestek, illetve megfelelő izotípusú antitest kontrollok felhasználásával, áramlási citometriás méréssel detektáltuk. Az általunk használt monoklonális antitestek a következők voltak: anti-CD40, anti-CD83, anti-OX40-L, anti-PDL-1 (mind a BD Pharmingentől, San Diego, CA, USA), anti-CD80, anti-HLA-DQ (mindkettő a BioLegendtől, Uithoorn, The Netherlands), anti-CD86 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-ICOS-L (eBioscience, Vienna, Austria). A FACSCalibur

citométerrel (BD Biosciences Immunocytometry Systems) detektált adatok kiértékelése FlowJo szoftver (TreeStar, Ashland, OR, USA) segítségével történt.

III.9. Sejtek citokin és kemokin szekréciójának detektálása ELISA módszerrel

A sejtek felülúszójából a szekretált citokinek, illetve kemokinek mennyiségét szendvics technikán alapuló, enzim-kötött immunszorbens (ELISA) módszerrel határoztuk meg. Az általunk vizsgált mediátorok között szerepeltek az IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 (70), IL-17, TNF- α , TGF- β 1 (mind a BD OptEIA; BD Biosciences-től, San Diego, CA, USA), IFN- α (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ, USA) citokinek, illetve az IL-8 kemokin (BD OptEIA; BD Biosciences). Az abszorbanciát Synergy HT multiplate olvasó (Bio-TEK® Instruments) segítségével 450 nm hullámhosszon detektáltuk.

III.10. A cDC-k SPP felvétele

Kísérleteink során az SPP izolátumokat fluoreszcens CellVue® Jade festékekkel (45 perc, 4 °C; Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) konjugáltuk. Ezt követően a sejteket 4 óráig inkubáltuk a fluoreszcensen konjugált SPP preparátummal, majd áramlási citometria segítségével FL1 fluoreszcens csatornában (530 \pm 15 nm) vizsgáltuk a CellVue® Jade pozitív sejtek arányát a sejt kultúrákban. A mikroszkópos vizsgálatokhoz a fluoreszcensen konjugált SPP-kkel kezelt DC-eket fixáltuk, majd PE-vel konjugált, specifikus DC markerrel (DC-SIGN/CD209; R&D Systems) jelöltük. A sejteket tárgylemezre helyezve, konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp (Zeiss LSM 510 mikroszkóp, Carl Zeiss AG, Jena, Germany) segítségével vizsgáltuk. A CellVue® Jade festékekkel konjugált SPP-k fluoreszcens jelét 505-550 nm-en, a jelölt DC-k fluoreszcens emisszióját 560-615 nm-en detektáltuk.

III.11. Proliferációs assay

A proliferációs tesztekhez sejtmembrán permeábilis, fluoreszcens karboxifluoreszcein szukcinimidil észter (CFSE) festékekkel (Invitrogen) jelölt allogén, naív CD4⁺ T sejteket ko-kultiváltunk megfelelően előkezelt DC-kkel 1:20 arányban (DC: T sejt arány) 1 μ g/ml koncentrációjú anti-CD3 monoklonális antitest (Klón: HIT3a, DB Pharmingen) jelenlétében. Öt napos ko-kultivációt követően áramlási citométerrel vizsgáltuk a T sejtekben jelenlévő CFSE festék fluoreszcencia intenzitásának feleződését, mely a T sejtek DC aktivációra bekövetkező proliferációját mutatja meg.

III.12. T sejt polarizáció meghatározása ELISPOT módszer segítségével

A megfelelően előkezelt DC-kkel történő aktiválást követően a T sejtek citokin választ IFN- γ -ra, IL-4-re és IL-17-re specifikus enzim-kötött immunszorbens SPOT (ELISPOT) tesztekkel (mind az eBioscience-től) detektáltuk, mely citokinek felvilágosítást nyújtanak a T sejt immunválasz polarizáltságáról. Kísérleteinkhez előaktivált DC és allogén CD3⁺ pan-T sejt (1:10) ko-kultúrákat hoztunk létre, majd négy napos inkubációt követően a CD3⁺ pan-T sejteket a detektálandó citokinre specifikus antitesttel fedett, illetve 10 % FBS-t tartalmazó médiummal blokkolt ELISPOT lemezekre osztottuk szét. A 24 és 48 órás inkubálást követően a sejteket mosással eltávolítottuk, majd az ELISPOT kitek leírását követve biotin-konjugált detektor antitesttel inkubáltuk a lemezeket. Ezt követte a torma-peroxidáz-avidin konjugátum, illetve az enzim szubsztrátjának (AEC, 3-amino-9-ethylcarbazol; BD Biosciences) a felvitele a lemezekre. Az enzim-szubsztrát reakció révén keletkező, színes spotok formájában megjelenő termék detektálása ImmunoScan analizátorral történt, ImmunoSpot 4.0 szoftver (C.T.L.-Cellular Technology Ltd., Bonn, Germany) segítségével.

III.13. Intracelluláris citokin meghatározás áramlási citométerrel

A T sejt polarizációs kísérletekhez megfelelő módon előkezelt DC-eket ko-kultiváltunk autológ CD4⁺CD45RA⁺ naív T sejtekkel 1:10 arányban humán anti-CD3 monoklonális antitest (BD Pharmingen) jelenlétében, majd 6 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T sejtek citokin termelését intracelluláris citokin festéssel. Hat napot követően a T sejteket nem antigén specifikus, poliklonális aktivátorokkal (2,5 μ g/ml tisztított humán anti-CD3 monoklonális antitest [BD Pharmingen], 100 ng/ml phorbol 12-miristil 13-acetát, 1 μ g/ml ionomycin [Sigma Aldrich]) 7 órán keresztül újraaktiváltuk a megfelelően detektálható intracelluláris citokin szint elérése érdekében. Az aktiválás utolsó öt órájában a sejtekhez GolgiStop (BD Biosciences) fehérje transzport gátlót adtunk, meggátolva a termelt citokinek extracelluláris térbe történő szekrécióját. Fixálást és permeabilizálást követően a T sejteket IFN- γ -ra és IL-4-re specifikus fluoreszcensen konjugált monoklonális antitest koktéllal és a megfelelő izotípus kontrollal (BD Biosciences) jelöltük és a fluoreszcencia intenzitás-változást áramlási citométerrel detektáltuk.

III.14. Statisztikai elemzés

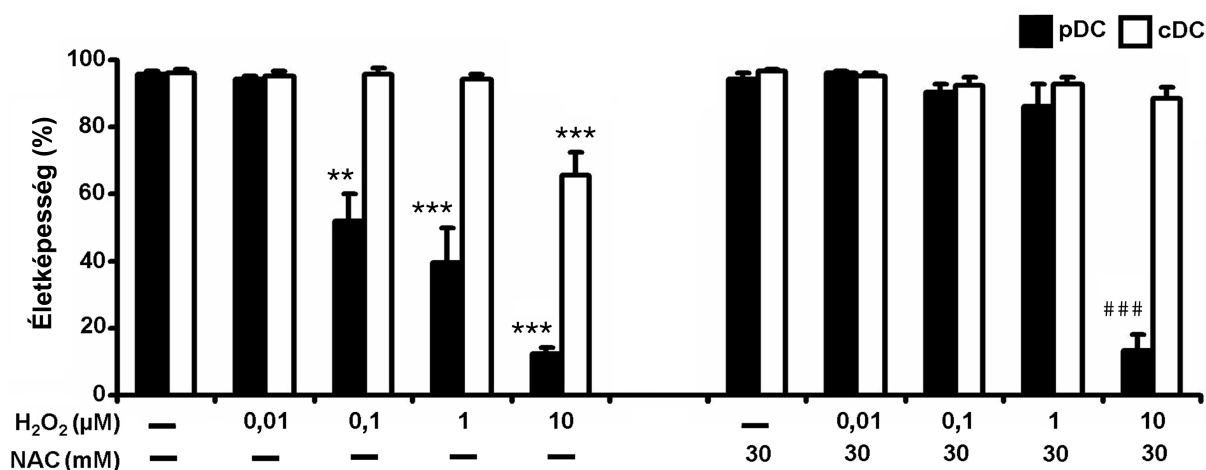
Az adatok statisztikai analízisére Student-féle t-próbát, valamint variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni post-hoc teszttel. A statisztikai számítások elvégzéséhez SPSS 12.0 programot (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) használtunk. A választott szignifikancia szint: $P < 0,05$.

IV. Eredmények

IV.1. Oxidatív stressz hatásának vizsgálata humán pDC-ken

IV.1.1. A human pDC-k és cDC-k oxidatív stressztűrésének összehasonlítása

A természetes immunreakció során létrejövő oxidatív környezet befolyásolhatja a hivatásos APC-k immunválaszban betöltött szerepét, ezért kísérleteinkkel először arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a DC-k milyen mértékben képesek kivédeni a reaktív gyökök káros hatásait. Így pDC-eket, illetve cDC-eket kezeltünk növekvő koncentrációjú H_2O_2 -vel, majd 7-AAD festék segítségével vizsgáltuk a sejtek életképességét 24 óras inkubációt követően. Az alkalmazott 0,1, 1 és 10 μM -os H_2O_2 koncentrációk mellett a pDC-k életképessége 48, 60, illetve 88%-kal csökkent a kezeletlen sejtekhez képest. Ugyanakkor a cDC-k esetében csak a legnagyobb koncentrációjú, a 10 μM -os H_2O_2 kezelésnél detektáltunk szignifikáns életképesség csökkenést. A sejtek antioxidánsal (NAC) történő előkezelése mind a pDC-k és mind a cDC-k esetében felfüggesztette az oxidatív stressz viabilitásra gyakorolt káros hatását, mely azt mutatja, hogy a sejtek kezelést követő életképesség csökkenését valóban a H_2O_2 kezelés idézte elő (**11. ábra**). A NAC egy kettős hatású antioxidáns, egyrészt a glutation prekursoraként képes fokozni a sejtek antioxidáns kapacitását, másrészt közvetlenül is képes reakcióba lépni a reaktív gyökökkel és semlegesíti azokat [130], így megfelelőnek találtuk kontroll kísérleteinkhez.



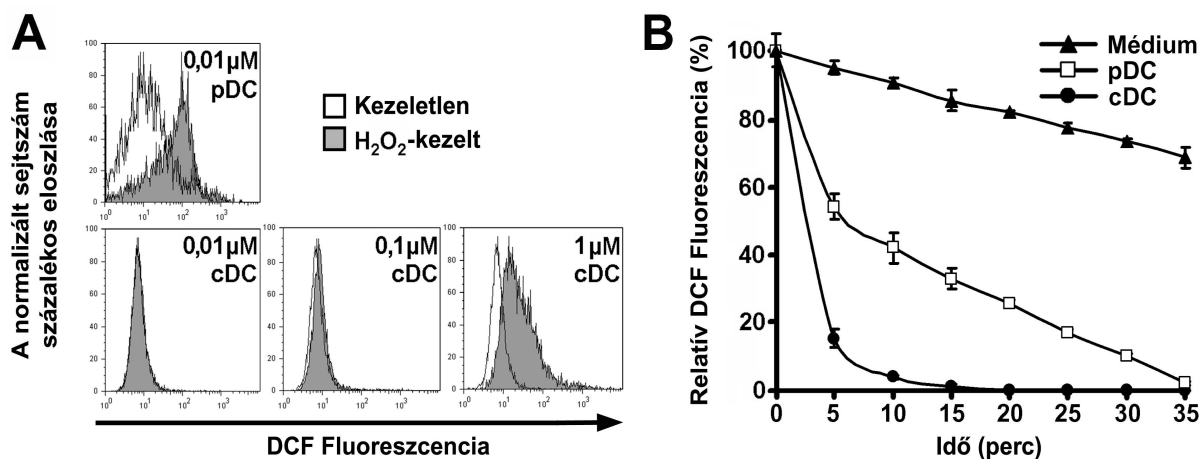
11. ábra A humán pDC-k és cDC-k oxidatív stressztűrésének összehasonlítása

A sejteket növekvő koncentrációjú H₂O₂ kezelésnek tettük ki, majd 24 óra inkubációt követően vizsgáltuk a sejtek életképességét áramlási citométer segítségével. Az oszlopdiagram az élő sejtek százalékos arányát tünteti fel, melyet 7-AAD, DNS interkalátor festék segítségével határoztunk meg. Az életképesség vizsgálatokat antioxidáns (NAC) jelenlétében is elvégeztük. Az adatok 3 független kísérlet átlagát mutatják. **P<0,01, ***P<0,001 a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, ###P<0,001 a NAC-cal előkezelt sejtekhez képest. NAC: N-acetil-cisztein.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a legalacsonyabb H₂O₂ koncentráció (0,01 μM), mely nem befolyásolja a pDC-k életképességét, megnöveli-e a sejtek intracelluláris ROS szintjét. A sejteket fluoreszcens, ROS-szenzitív H₂DCF-DA festékkel töltöttük meg, majd kezelést követően vizsgáltuk a DCF fluoreszcencia változását. A pDC-k esetében már az alacsony koncentrációjú H₂O₂ kezelés is 3,7±2,3-szoros DCF fluoreszcencia növekedést eredményezett, míg a cDC-knél csak 100-szor nagyobb H₂O₂ koncentrációnál (1 μM) tudtunk fluoreszcencia emelkedést detektálni (**12. A ábra**).

A két sejttípus antioxidáns kapacitása közötti különbséget mutatta az is, hogy a cDC-k esetében az alacsony koncentrációjú H₂O₂ (0,01 μM) kezelést követően 20 perc elteltével a sejt kultúra felülúszójában már nem lehetett kimutatni H₂O₂-t, míg a pDC kultúrák felülúszójában csak 15 perccel később csökkent a H₂O₂ koncentrációja a fluorimetriás módszerrel detektálható határérték alá (**12. B ábra**).

Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a pDC-k jóval érzékenyebben reagálnak az oxidatív környezetre, mint a cDC-k.



12. ábra A H₂O₂ kezelés hatása az intracelluláris ROS szintekre pDC-kben és cDC-kben, valamint a H₂O₂ lebomlásának kinetikája a sejt kultúrák felülúszójában

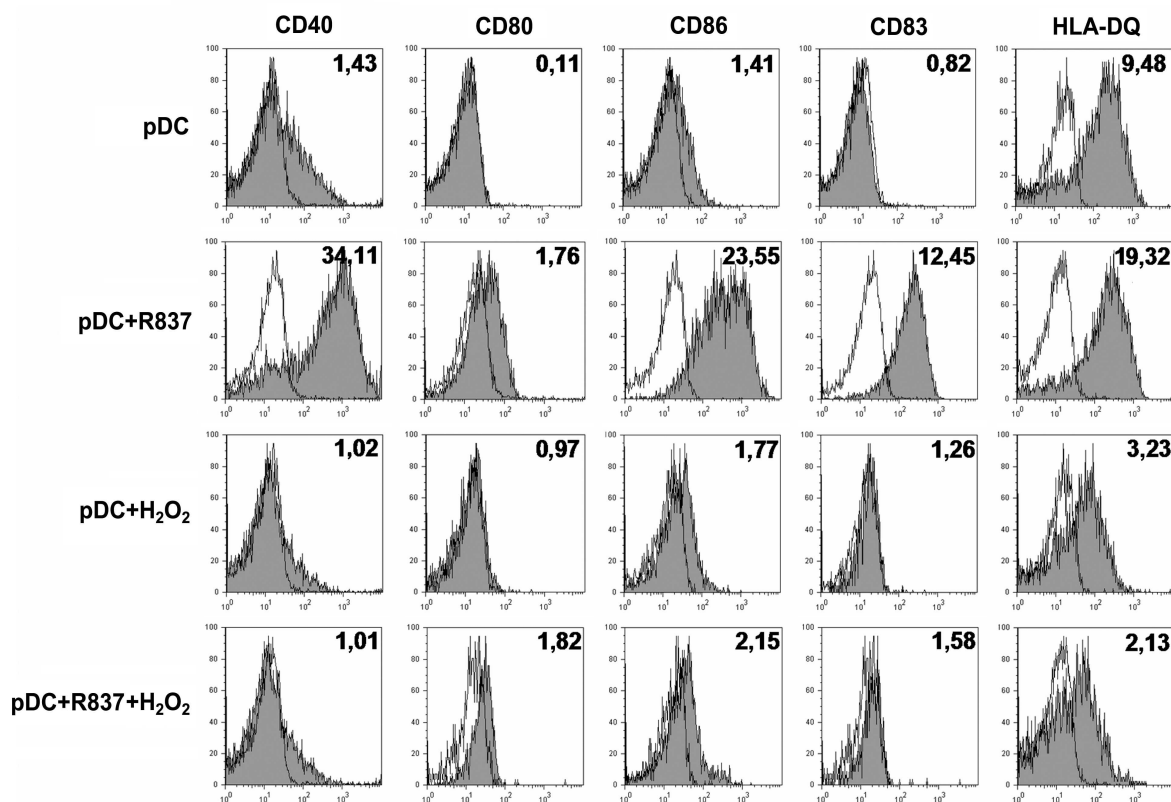
(A) A DC-eket ROS-szenzitív, fluoreszcens H₂DCF-DA festékkel töltöttük meg, majd a H₂O₂ kezeléseket követően áramlós citometria segítségével vizsgáltuk a DCF fluoreszcenciában bekövetkező változásokat. A histogramok egy reprezentatív kísérlet adatait mutatják (N=3). (B) A DC-eket alacsony koncentrációjú (0,01 μM) H₂O₂-vel kezeltük meg, majd fluorimetriás módszer segítségével mértük az 5 percenként vett sejtmentes felülúszó minták ROS tartalmát. Az adatok három független kísérlet átlagát mutatják.

IV.1.2. Oxidatív stressznek kitett pDC-k fenotípusos vizsgálata

Számos korábbi tanulmányban elemezték, hogy az oxidatív stressz hogyan befolyásolja a cDC-k funkcióit, viszont a pDC-kkel kapcsolatban még nem végeztek ilyen irányú vizsgálatokat. Így a továbbiakban azt tanulmányoztuk részletesebben, hogy az oxidatív stressz hogyan befolyásolhatja a pDC-k immunválaszban betöltött szerepét. További kísérleteinkben azt a koncentrációjú H₂O₂ kezelést (0,01 μM) alkalmaztuk, melynél a pDC-k életképessége a kezeletlen mintákéhoz hasonló volt. El akartuk ugyanis kerülni, hogy a nekrotizáló sejtek nagyobb arányú jelenléte befolyásolja kísérleti eredményeinket. A H₂O₂ kezelés által kiváltott fenotípusos változásokat áramlási citométer segítségével detektáltuk. A vizsgált sejtfelszíni markerek között szerepeltek kostimulatórikus molekulák (CD40, CD80, CD86), érési marker (CD83), valamint az antigén prezentációban központi szerepet játszó HLA-DQ fehérje. A H₂O₂ kezelés csak kismértékben változtatta meg a CD40, CD80, CD86, illetve CD83 fehérjék expresszióját, ugyanakkor jelentős mértékben csökkentette a HLA-DQ protein szintjét a sejteken. Ha a pDC-eket R837-tel, azaz a TLR7 receptor egyik agonistájával kezeltük, akkor minden általunk vizsgált sejtfelszíni marker expressziós szintje ugrásszerűen megnőtt, viszont

együtt alkalmazva az aktivátort a H_2O_2 -vel, a H_2O_2 felfüggesztette a TLR7 agonista pDC-kre gyakorolt aktiváló hatását (**13. ábra**). Az R837 - vagy másnéven imiquimod - olyan szintetikus guanozin analóg, mely igen erős IFN-indukáló képességgel bír. Terápiás célból már régóta alkalmazzák a klinikumban, többek között a bőr rákos elváltozásainak kezelésére [131], illetve genitális humán papilloma vírusfertőzés ellen [132].

A fenotípusos vizsgálatok eredményei alapján fontosnak tartottuk kizárni a H_2O_2 kezelés R837 ligandra kifejtett esetleges oxidáló hatását, mely negatívan befolyásolhatja a ligand receptorhoz való kötődését. Így fenotípusos vizsgálatainkat megismételtük olyan kondíciók mellett is, ahol a pDC-khez nem az R837-tel együtt, hanem az R837-tel történő kezelést követően, 30 perccel később adtuk a H_2O_2 -ot. Ezen időintervallum alatt az R837 már hozzákötődik a receptorához, így kizárható hogy a H_2O_2 közvetlenül befolyásolja a ligand-receptor kölcsönhatást. Ilyen kísérleti kondíciók mellett is hasonló eredményeket kaptunk, mint az R837 és a H_2O_2 egyidejű alkalmazása esetén (az adatokat nem tüntettük fel), így valószínűsíthető, hogy a H_2O_2 kezelés nem az R837 ligand és a TLR7 receptor közötti interakció befolyásolásával, hanem más mechanizmussal módosítja pDC-k működését.

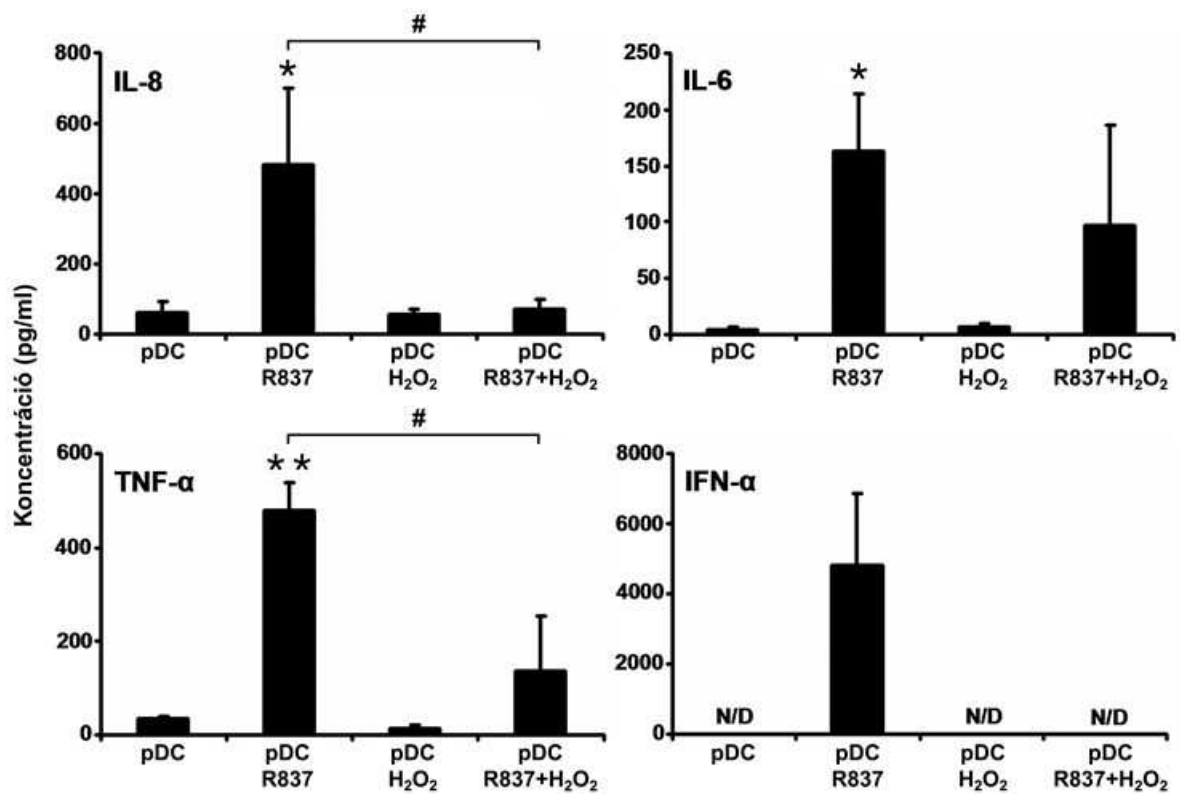


13. ábra pDC-k fenotípusos vizsgálata alacsony koncentrációjú H₂O₂ kezelést követően

A pDC-eket 0,01 μ M koncentrációjú H₂O₂ kezelésnek tettük ki TLR7 agonista (R837) jelenlétében, illetve anélkül, majd 24 órás inkubációt követően áramlási citometria segítségével vizsgáltuk a sejtek sejtfelszíni markereinek expressziójában bekövetkező változásokat. A fehér színű hisztogramok jelzik az izotípus kontrollokat, míg a számok a relatív fluoreszcencia értékeket (festett minták fluoreszcencia intenzitásának mediánja / az izotípus kontroll fluoreszcencia intenzitásának mediánja) mutatják egy reprezentatív kísérlet adatai alapján (N=4).

IV.1.3. Oxidatív stressz hatása a pDC-k citokin és kemokin termelésére

A kezeléseket követően a sejt kultúrák felülúszójából meghatároztuk a sejtek citokin (IL-6, TNF- α , IFN- α), illetve kemokin (IL-8) szekrécióját ELISA módszer segítségével. Önmagában a H₂O₂ kezelés nem indukálta egyik általunk vizsgált mediátor szekrécióját sem, míg a TLR7 agonista jelentős mértékben növelte a sejtek citokin, illetve kemokin termelését. A TLR7 agonista és a H₂O₂ együttes alkalmazása esetén a citokinek, illetve a kemokin mennyisége lecsökkent a felülúszókban a kizárólag TLR7 liganddal aktivált sejtekéhez képest, mely azt mutatja, hogy az oxidatív stressz gátolja a pDC-k aktiválódását. Az IFN- α esetében csak a TLR7 agonistával aktivált sejtek felülúszójából tudtunk kimutatni citokint (**14. ábra**).

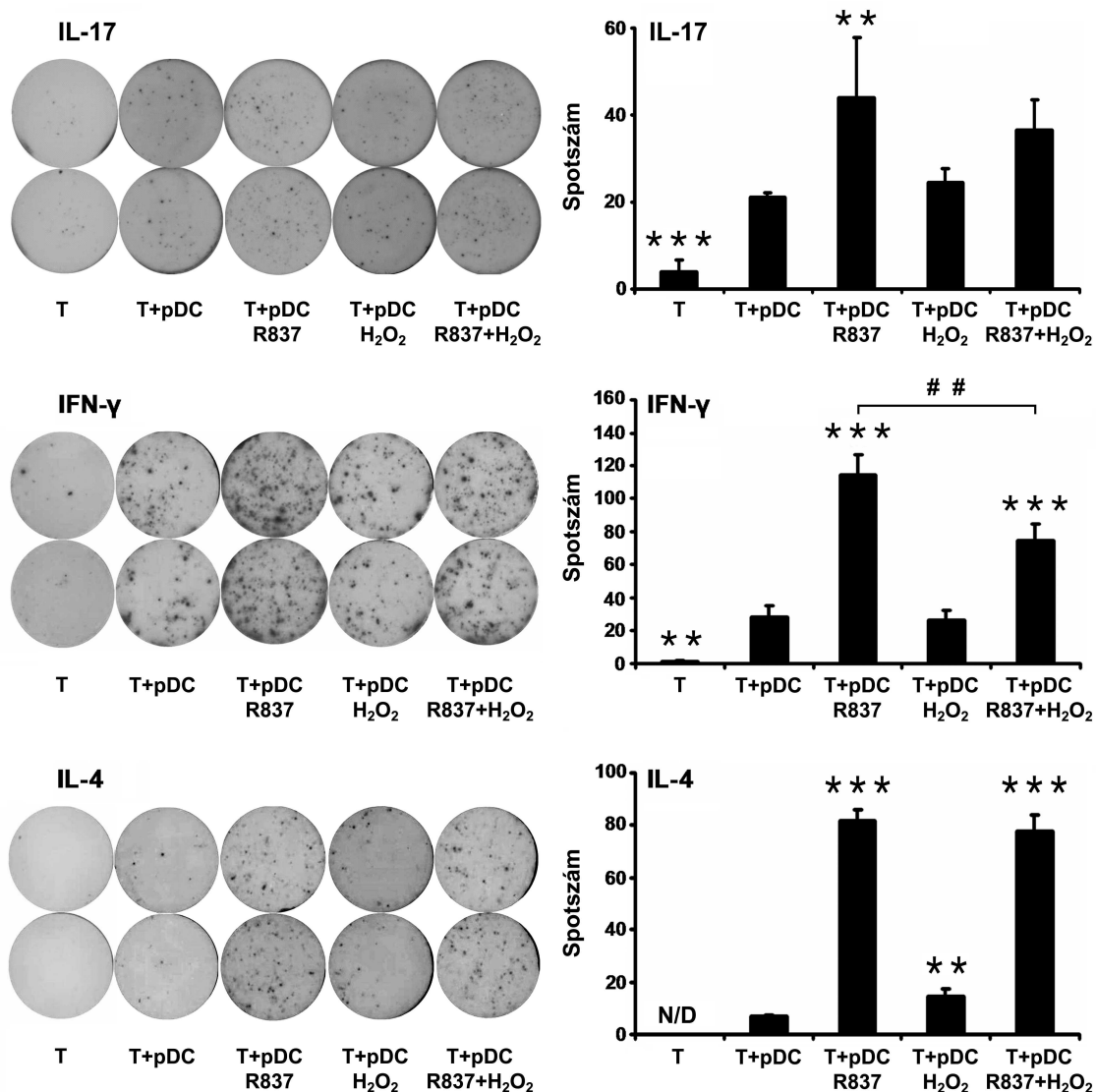


14. ábra A pDC-k citokin, illetve kemokin szekréciója alacsony koncentrációjú H₂O₂ kezelést követően

Aktiválatlan, illetve TLR7 liganddal (R837) aktivált pDC-eket kezeltünk 0,01 μ M koncentrációjú H₂O₂-vel, majd 24 óra inkubációt követően ELISA módszer segítségével határoztuk meg a sejtkultúrák felülcszójának citokin, illetve kemokin tartalmát. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. *P<0,05, **P<0,01 a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, #P<0,05 az R837-tel kezelt sejtekhez viszonyítva. N/D: nem detektálható.

IV.1.4. Oxidatív stressznek kitett pDC-k allogén T sejt aktiváló képessége

További kísérleteinkben az oxidatív stressznek kitett pDC-k allogén T sejt aktiváló képességét vizsgáltuk, melyhez H₂O₂-vel és R837-tel előkezelt pDC-eket együtt tenyésztettünk allogén CD3⁺ pan-T sejtekkel, majd 4 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T sejtek citokin termelését ELISPOT módszer segítségével. A vizsgált citokinek között szerepelt az IL-4, az IL-17 és az IFN- γ , mert ezek a citokinek felvilágosítást adhatnak az adaptív immunválasz polarizáltságát illetően. Az allogén T sejtekkel történő ko-kultivációt követően megfigyeltük, hogy a TLR7 agonistával kezelt pDC-k mindhárom citokin termelését fokozzák, míg az oxidatív stressznek kitett pDC-k hatékonyabban aktiválják az IL-4-termelő T sejteket, mint a kezeletlen pDC-k. A H₂O₂ kezelés ugyanakkor nem változtatta meg a pDC-k IFN- γ - vagy IL-17-termelő T limfocitákat aktiváló képességét (**15. ábra**).

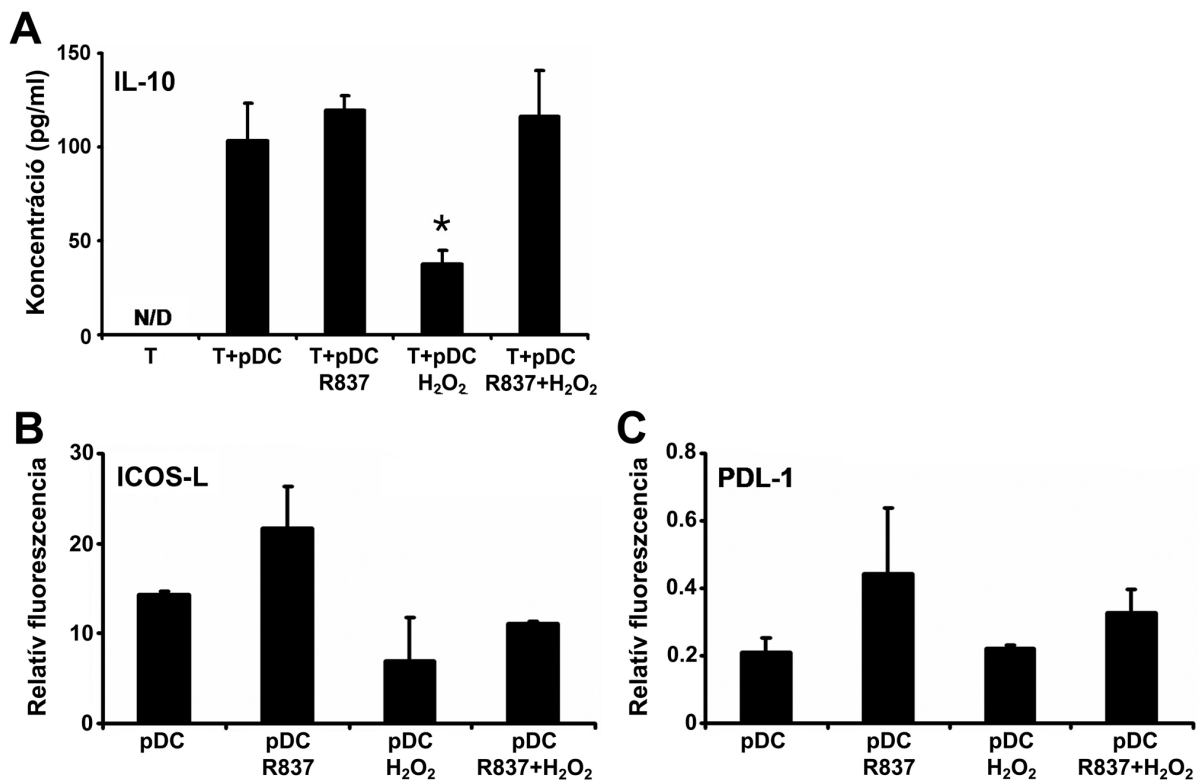


15. ábra Oxidatív stressznek kitett pDC-k allogén pan-T sejt aktiváló képességének vizsgálata. Aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával (R837) aktivált és H₂O₂-vel kezelt pDC-eket ko-kultiváltunk CD3⁺ pan-T sejtekkel, majd 4 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk az IL-17, az IFN-γ, illetve az IL-4 citokint termelő T sejtek arányát ELISPOT módszer segítségével. Az ábra bal oldalán egy-egy reprezentatív kísérlet spot ábrái szerepelnek, ahol minden egyes pont egy az adott citokint termelő T sejtnek felel meg (N=3). Az ábra jobb oldalán három független kísérlet átlaga mutatja az adott citokineket termelő T sejtek számát a sejt kultúrákban. **P<0,01, ***P<0,001 a kezeltlen pDC-T sejt ko-kultúrához viszonyítva, ###P<0,01 az R837 kezelt pDC-T sejt ko-kultúrához képest. N/D: nem detektálható, T: T sejt.

IV.1.5. Oxidatív stressz hatása a pDC-k naív T sejt polarizáló képességére

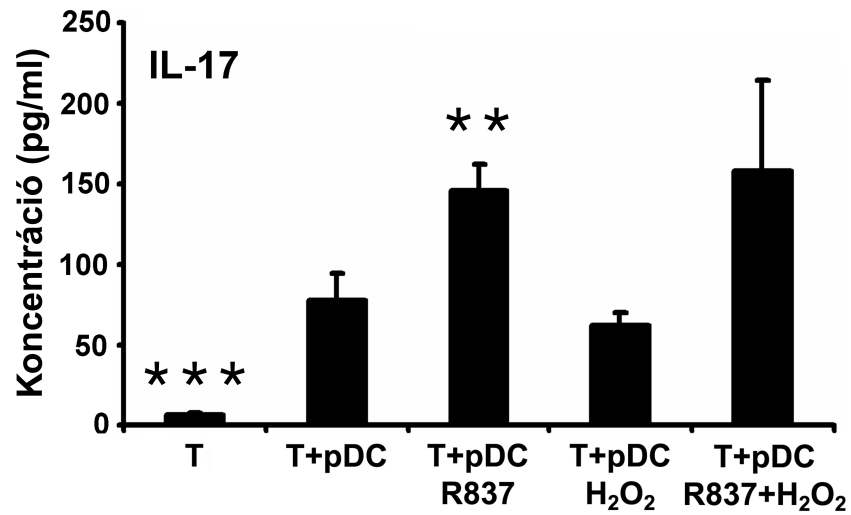
Az oxidatív stressznek kitett pDC-k naív T sejt polarizáló képességének meghatározásához H₂O₂-vel és R837-tel előkezelt pDC-eket együtt tenyésztettünk autológ naív T sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T sejtek tulajdonságait.

A H_2O_2 -vel előkezelt pDC-ket tartalmazó ko-kultúrák felülúszójában a Treg sejtek kialakulását jelző IL-10 citokin szintje alacsonyabb volt, mint a többi ko-kultúra esetében. A H_2O_2 -vel előkezelt pDC-k fenotípusa sem kedvez a Treg sejtek kialakulásának, mivel az oxidatív stressz nem fokozta a tolerogén markerek (ICOS-L, PDL-1) expresszióját a pDC-ken (**16. ábra**). Ezt követően megvizsgáltuk az IL-17 citokin szintjét a ko-kultúrák felülúszójában, és azt találtuk, hogy a H_2O_2 -vel előkezelt pDC-k nem indukálták az IL-17 citokin termelő T sejtek keletkezését (**17. ábra**). Ugyanakkor a kokultúrákban intracelluláris citokin festéssel kimutattuk, hogy a naív autológ T sejtekkel történő kokultiváció előtt oxidatív stressznek kitett pDC-k inkább Th2 (IL-4 termelő T sejtek), mint Th1 (IFN- γ termelő T sejtek) irányú polarizációt segítenek elő, valószínűleg a fokozott OX40-L kifejeződés következtében (**18. ábra**).



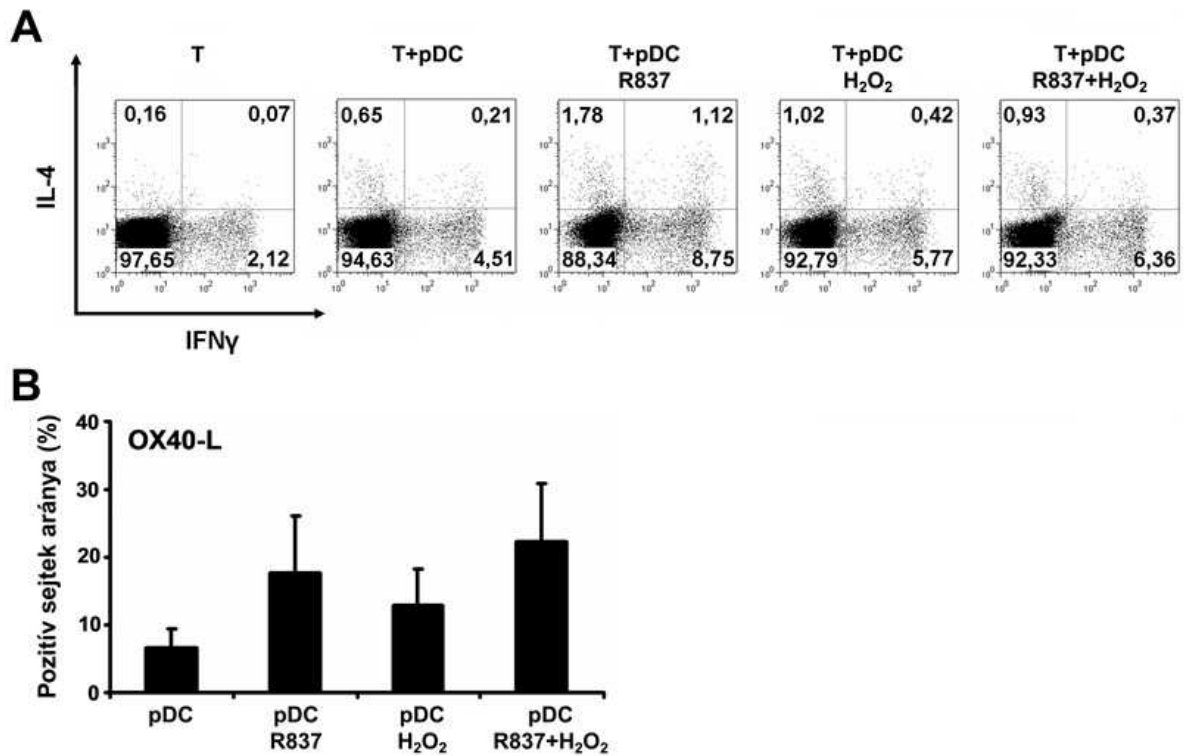
16. ábra Oxidatív stressznek kitett pDC-k naív, autológ T sejt aktiváló képességének vizsgálata, IL-10 termelő T sejtek kialakulása szempontjából

(A) Aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával (R837) aktivált, majd H₂O₂-vel kezelt pDC-ket ko-kultiváltunk naív, autológ CD4⁺CD45RA⁺ T sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a sejt kultúrák felülúszójának IL-10 tartalmát ELISA módszerrel. Az IL-10 detektálása a felülúszóban a ko-kultúrában megjelenő IL-10 termelő T sejtekre utal, mivel a primer pDC-k nem képesek ezen citokinek termelésére. A H₂O₂, illetve az R837 kezeléseket követően áramlási citométer segítségével vizsgáltuk az ICOS-L (B) és a PDL-1 (C) fehérjék kifejeződését a pDC-ken. Ezen proteinek expressziójának növekedése a pDC-k felszínén tolerogén fenotípus kialakulását jelzi. Az ábrák három független kísérlet átlagát mutatják. *P<0,05 a kezeltlen pDC-T sejt ko-kultúrához viszonyítva. N/D: nem detektálható, T: T sejt.



17. ábra Oxidatív stressz hatása a pDC-k Th17 sejt polarizáló képességére

Aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával (R837) aktivált, majd H₂O₂-vel kezelt pDC-eket ko-kultiváltunk naív, autológ CD4⁺CD45RA⁺ T sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően ELISA módszer segítségével megmértük a ko-kultúrák felülúszójának IL-17 citokin tartalmát. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. **P<0,01, ***P<0,001 a kezeletlen pDC-T sejt ko-kultúrához viszonyítva. T: T sejt.



18. ábra Oxidatív stressz hatása a pDC-k Th1/Th2 sejt polarizáló képességére

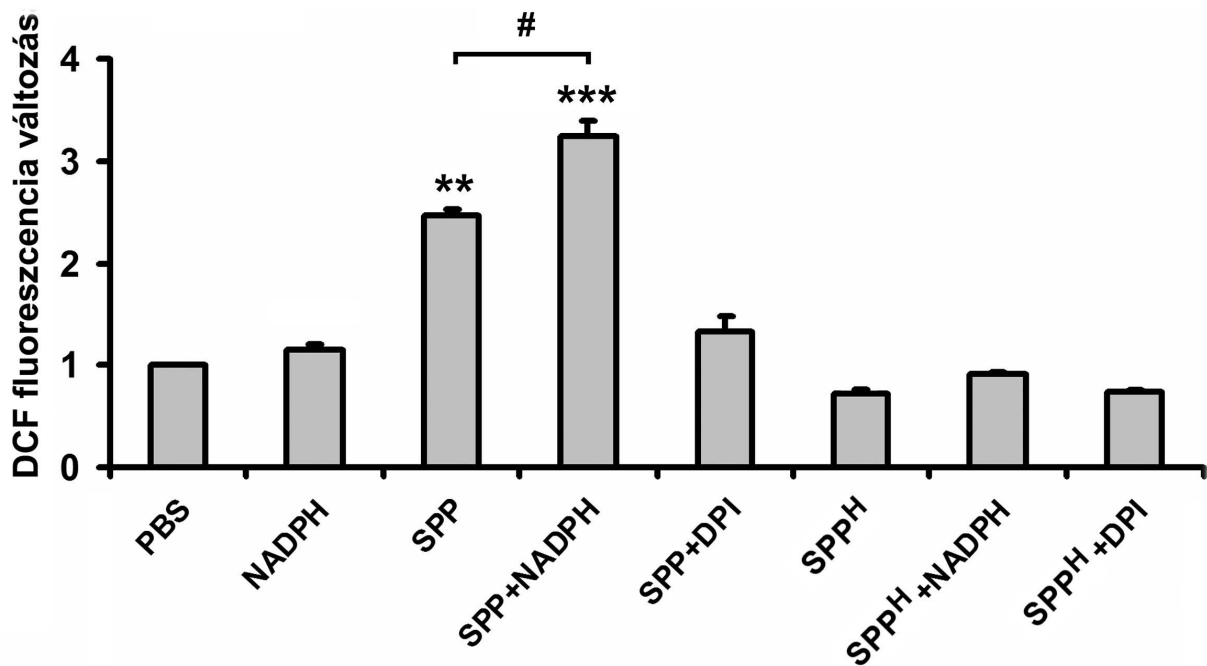
(A) Aktiválatlan, illetve TLR7 agonistával (R837) aktivált, majd H₂O₂-vel kezelt pDC-ket ko-kultiváltunk naív, autológ CD4⁺CD45RA⁺ T sejtekkel, majd 6 napos ko-kultivációt követően a T sejteket újraaktiváltuk nem antigén specifikus, poliklonális aktivátorokkal, majd intracelluláris citokin festést követően, áramlási citométer segítségével meghatároztuk az IFN- γ és IL-4 citokint termelő T sejtek arányát a ko-kultúrákban. A dot blot-okon látható számok az IFN- γ , illetve IL-4 pozitív T sejtek százalékos arányát jelzik egy reprezentatív kísérlet adatai alapján (N=3). (B) H₂O₂-vel, illetve R837-tel kezelt pDC-k OX40-L expressziójának vizsgálata áramlási citométer segítségével. Ennek a proteinnek a kifejeződése a pDC-ken elősegíti a naív T sejtek Th2 irányú differenciálódását. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. T: T sejt.

IV.2. Parlagfű SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-ok hatásainak vizsgálata humán cDC-ken

IV.2.1. SPP kezelés által indukált oxidatív stressz vizsgálata cDC-ken

Számos irodalmi adat utal arra, hogy az oxidatív stressz aktivációs szignálként hathat a cDC-kre. Kísérleteinkkel választ szerettünk volna kapni arra, hogy a parlagfű SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-oknak milyen szerepe lehet a cDC-k aktivációjában, illetve ezáltal a parlagfű által kiváltott allergiás reakciók szenzitizációs fázisában. Kísérleteinkhez *ex vivo* differenciáltott, monocita-eredetű DC-ket használtunk. Ezeknek a sejteknek a fenotípusa (CD1a⁺CD1c⁺/BDCA1⁺CD11c⁺MHC-II⁺) [133]

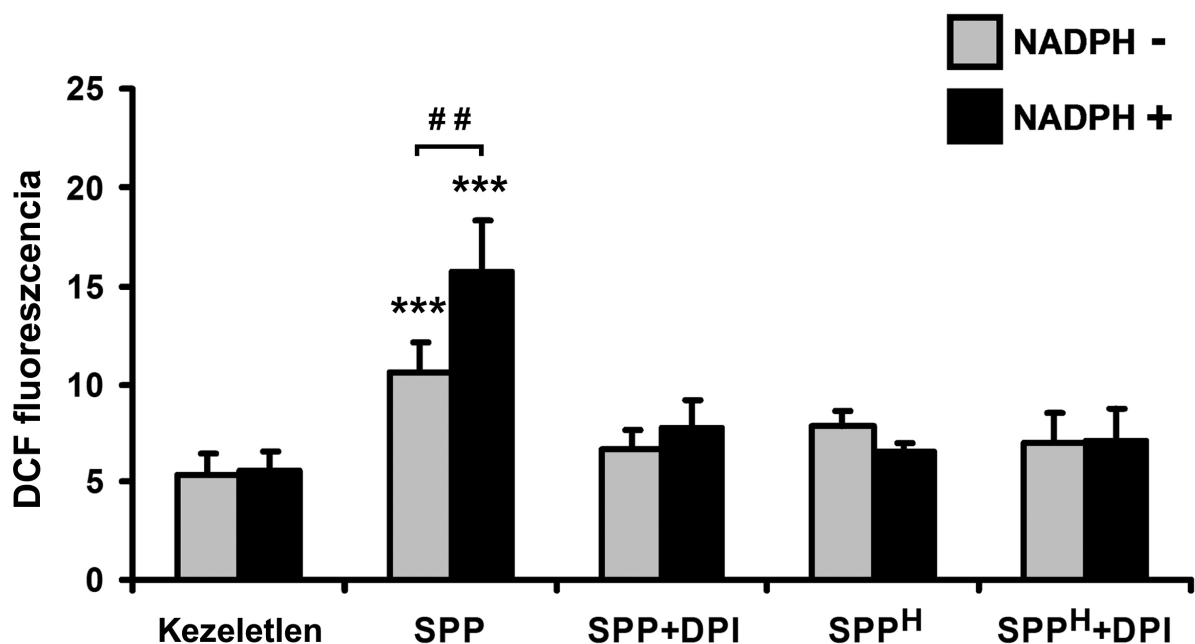
hasonlóságot mutat azon tüdőben lokalizálódó, mieloid eredetű cDC-kkel (BDCA1⁺CD11c⁺HLA-DR⁺), amelyekről leírták, hogy a legerősebb T sejt aktiváló képességgel rendelkeznek a légúti DC-k között [134, 135]. Munkánk során a cDC-eket parlagfű SPP izolátumokkal kezeltük meg, melyeket intakt parlagfű pollen hidratálása révén nyertük. Minden parlagfű SPP izolálást követően ROS-szenzitív, fluoreszcens H₂DCF-DA festék segítségével megvizsgáltuk a preparátumok NAD(P)H oxidáz aktivitását. A frissen izolált SPP mintákban a DCF fluoreszcencia 2,5-szörös emelkedést mutatott a PBS kontrollhoz viszonyítva, mely növekedés az enzim szubsztrátjának (NADPH) jelenlétében tovább fokozódott. Az SPP-k 72°C-on 30 percig történő inaktiválása, valamint az enzim specifikus, membrán szolubilis gátlószerének (DPI) [136] használata a fent leírt jelenséget felfüggesztette (**19. ábra**). A DPI egy olyan flavoprotein inhibitor, mely a humán NADPH oxidáz enzimen [137] kívül a növényi NAD(P)H oxidázoknak [138] is hatásos gátlószere, így alkalmasnak találtuk az SPP-k NAD(P)H oxidázának gátlására.



19. ábra Az SPP preparátumok NAD(P)H oxidázai által termelt ROS-ok detektálása

A frissen izolált SPP szuszpenziókhöz ROS-szenzitív, fluoreszcens H₂DCF-DA festéket adva, fluorimetriás módszerrel vizsgáltuk a preparátumokban a DCF fluoreszcencia emelkedését, mely az SPP-k NAD(P)H oxidáz aktivitására utal. Kísérleteinket az enzim szubsztrátjának (NADPH), illetve specifikus gátlószereinek (DPI) jelenlétében is elvégeztük. További kontroll kísérletekben az SPP-k hőinaktivált (SPP^H) formáját alkalmaztuk. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. **P<0,01, ***P<0,001, a PBS oldathoz viszonyítva, #P<0,05 az SPP szuszpenzióhoz viszonyítva.

A következő kísérletben a NAD(P)H oxidáz aktivitással bíró SPP szuszpenziókkal kezeltünk meg a ROS-szenzitív H₂DCF-DA festékkel töltött cDC-eket, majd vizsgáltuk az intracelluláris ROS szintjének változását a sejtekben. Az SPP kezelés szignifikáns növekedést eredményezett az intracelluláris DCF fluoreszcenciában, melyet az enzim szubsztrátjának, azaz a NADPH-nak a jelenléte tovább fokozott. A hőinaktivált SPP-vel (SPP^H) történő kezelés, illetve a DPI kezelés önmagában nem eredményezett DCF fluoreszcencia növekedést a kezeletlen mintákhoz képest (**20. ábra**). Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a cDC-k intracelluláris ROS szint növekedését főként az SPP-k NAD(P)H oxidáz aktivitása okozta.

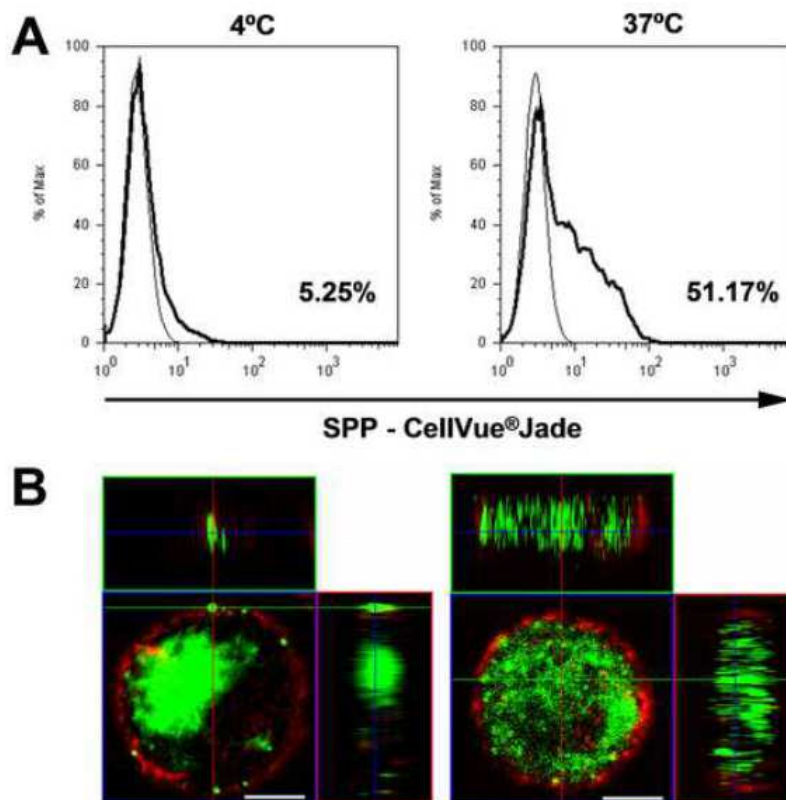


20. ábra Az SPP-vel kezelt DC-k intracelluláris ROS szintjének vizsgálata

A DC-eket ROS-szenzitív, fluoreszcens H₂DCF-DA festékkel töltöttük meg, majd SPP kezelést követően - NADPH jelenlétében, vagy anélkül - áramlási citometria segítségével vizsgáltuk a DCF fluoreszcenciában bekövetkező változásokat. Kontroll kísérletekben hőinaktivált SPP-eket (SPP^H), valamint a NAD(P)H oxidáz enzim specifikus gátlószerét (DPI) alkalmaztuk. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja. ***P<0,001, a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, ##P<0,01 az SPP-vel kezelt sejtekhez viszonyítva.

IV.2.2. A cDC-k SPP felvételének vizsgálata

Az intakt parlagfű pollenszemek méretüknél (25-30 µm) fogva nem felvehetők a DC-k számára. Ugyanakkor a pollenszemek hidratációja során kiszabaduló SPP-k átlagos mérete 0,5 – 4,5 µm közé esik, így a DC-k képesek lehetnek ezen részecskék fagocitózisára, mely folyamat központi szerepet játszhat az allergének későbbi prezentációja során. Így fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy a cDC-k milyen mértékben képesek felvenni az SPP-eket. Kísérleteinkben fluoreszcensen jelölt SPP-vel kezeltünk meg cDC-eket 4°C-on, illetve 37°C-on, majd 4 óra elteltével áramlási citométer segítségével vizsgáltuk az SPP pozitív sejtek arányát a sejt kultúrákban. Az SPP pozitív sejtek aránya a 37°C-on történt kezeléseket követően - donortól függően - 25-58 % -nak adódott (**21. A ábra**). A citometriás mérések alapján nem dönthető el, hogy az SPP pozitív sejtek valóban felvették-e a partikulákat, vagy azoknak csak a sejtmembránhoz való kötődése eredményezi a pozitivitást, így az SPP-k sejten belüli lokalizációját konfokális mikroszkópos felvételek segítségével is igazoltuk (**21. B ábra**).



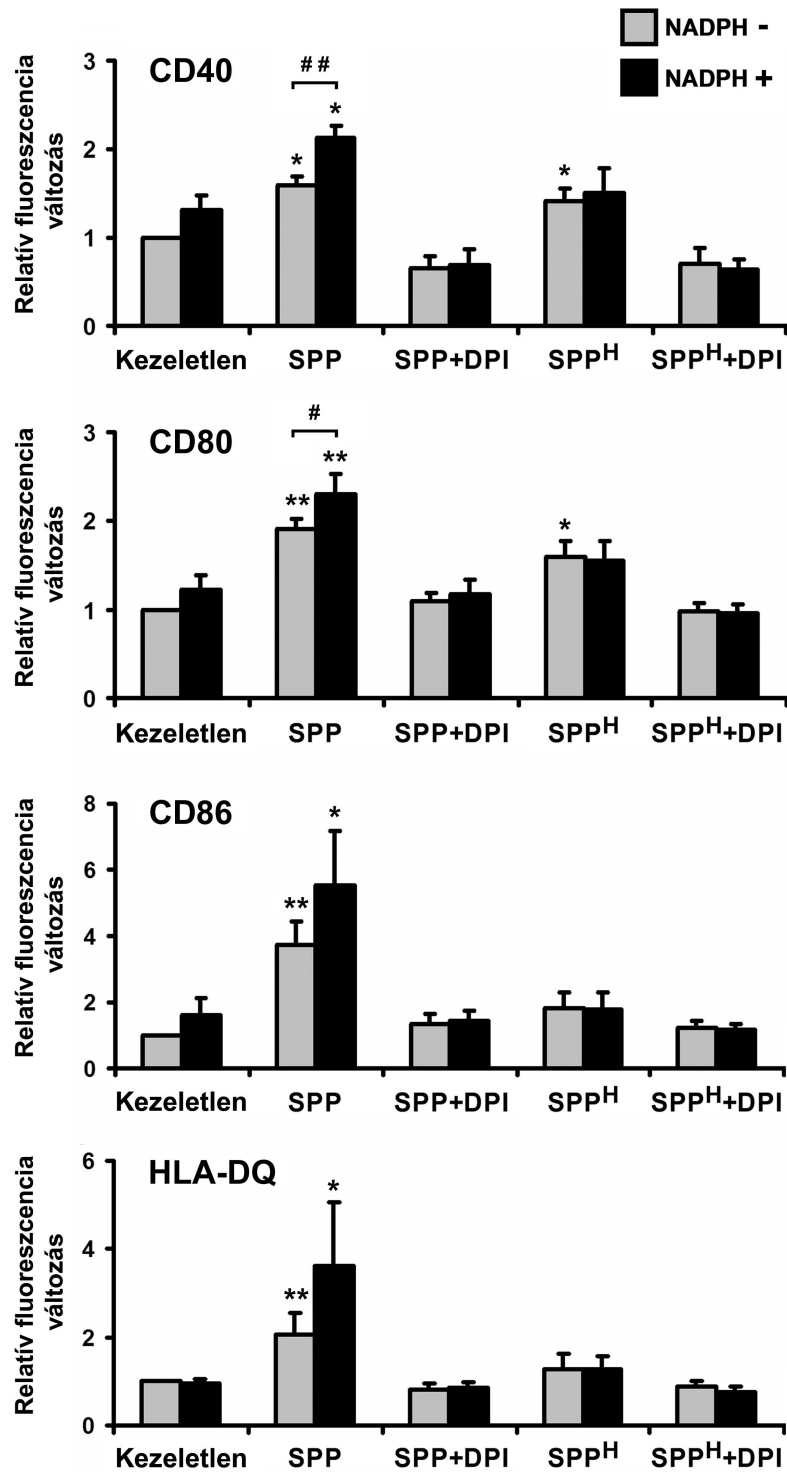
21. ábra A DC-k SPP felvételének vizsgálata

(A) A CDC-ket fluoreszcens CellVue® Jade festékkel konjugált SPP izolátumokkal kezeltük, majd 4 órás inkubációt követően áramlási citometria segítségével FL1 csatornában (530 ± 15 nm) vizsgáltuk az SPP pozitív sejtek százalékos arányát, melyet a hisztogramokon feltüntetett számok jelölnek egy reprezentatív kísérlet adatai alapján. (B) Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópot alkalmazva megvizsgáltuk a fluoreszcensen jelölt SPP-k (zöld szín) intracelluláris lokalizációját a PE-vel konjugált DC-SIGN markerrel jelölt CDC-kben (piros szín).

Az eredeti nagyítás mértéke: 40x. Méretarány vonal = 5 μ M.

IV.2.3. Az SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-ok hatásai a CDC-k fenotípusos és funkcionális tulajdonságaira

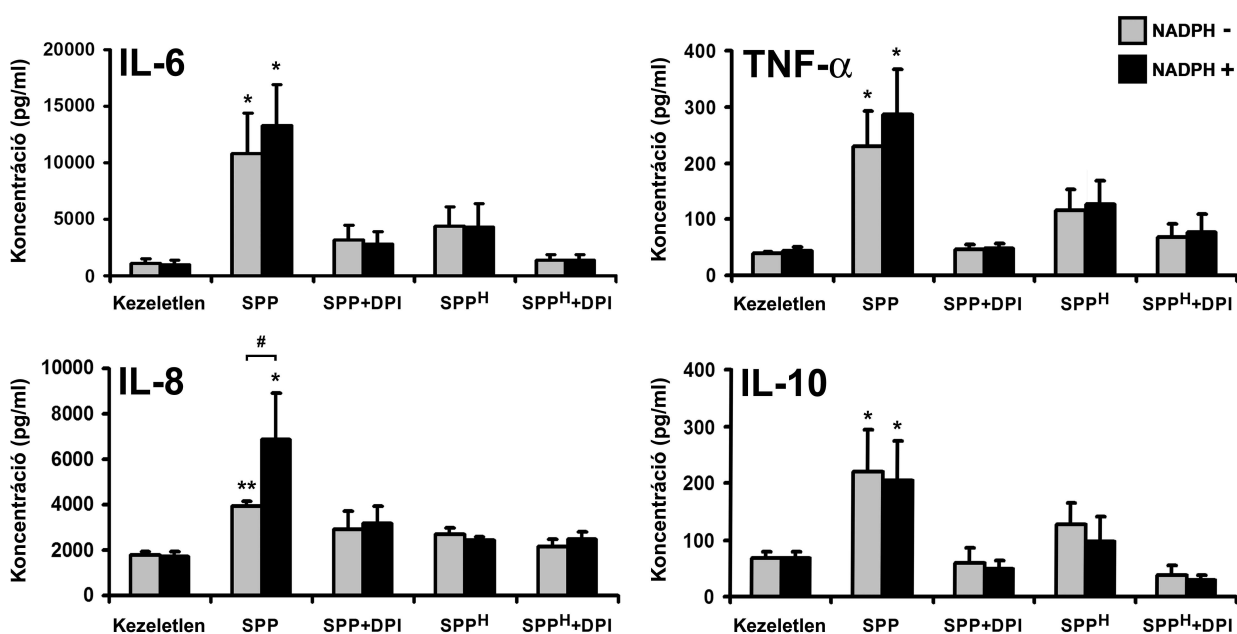
Az SPP kezeléseket követően megvizsgáltuk a sejtek fenotípusos változásait. A vizsgált sejt felszíni markerek között szerepeltek a CD40, CD80, CD86 kostimulatórikus molekulák, illetve az antigén prezentációban szerepet játszó HLA-DQ fehérje. Az SPP kezelés fokozta mind a négy sejt felszíni fehérje expresszióját. Ha az SPP kezelés NADPH jelenlétében történt, akkor további növekedés volt tapasztalható a fehérjék expressziós szintjében, de ez az emelkedés csak a CD40, illetve a CD80 molekulák esetében volt szignifikáns. Az SPP^H-val, illetve a NAD(P)H oxidáz gátlószerével, azaz DPI-vel történő kezelés nem eredményezett statisztikailag szignifikáns változásokat egyik sejt felszíni protein kifejeződésében sem (22. ábra).



22. ábra Az SPP kezelt cDC-k fenotípusos változásainak vizsgálata

A cDC-eket frissen izolált SPP-vel és az SPP-k hőinaktivált formájával (SPP^H) kezeltük meg a NAD(P)H oxidáz enzim specifikus gátlószerének (DPI) és az enzim szubsztrátjának (NADPH) jelenlétében, illetve anélkül. A 24 órás inkubációt követően áramlásos citometria segítségével vizsgáltuk a sejtfelszíni fehérjék expressziós szintjében bekövetkező változásokat. Az ábra négy független kísérlet átlagát mutatja. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, #P<0,05, ##P<0,01 az SPP kezelt sejtekhez viszonyítva.

Az SPP kezelt sejtek citokin, illetve kemokin szekrécióját vizsgálva megállapítottuk, hogy az SPP kezelés nem indukálja az IL-1 β , illetve az IL-12 pro-inflammatórikus citokinek termelődését (az adatokat nem tüntettük fel), viszont az IL-6, TNF- α , IL-8 és IL-10 fehérjék szekrécióját fokozza. A NADPH szubsztrát jelenléte további növekedést eredményezett az IL-6, TNF- α és IL-8 fehérjék szintjében, viszont ezen változás csak az IL-8 kemokin esetében volt statisztikailag szignifikáns. A fenotípusos változásokhoz hasonlóan az SPP^H, illetve a DPI kezelés nem mutatott szignifikáns változásokat egyik citokin, illetve kemokin esetében sem (23. ábra).



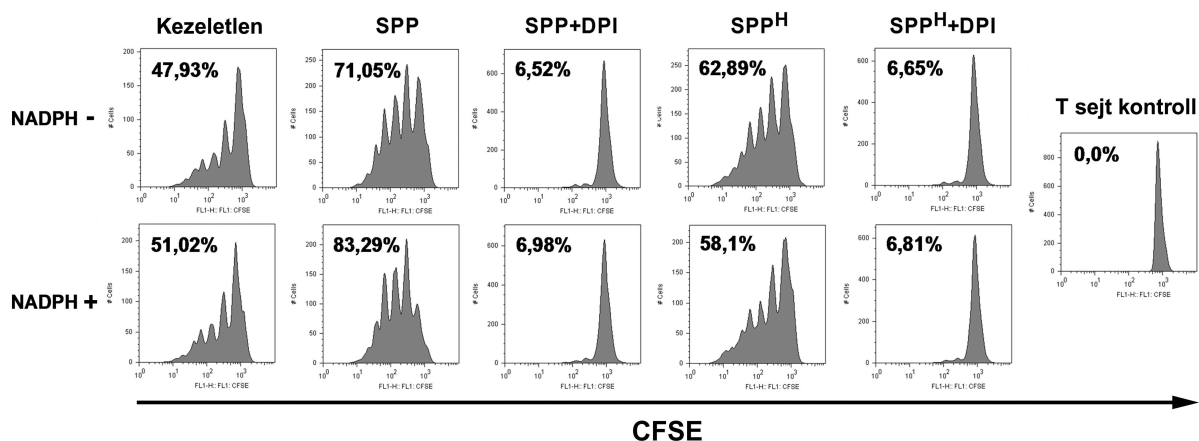
23. ábra Az SPP kezelt cDC-k citokin és kemokin szekréciójának vizsgálata

A 24 órás kezeléseket követően ELISA módszer segítségével vizsgáltuk a sejt kultúrák felülúszójában a cDC-k által termelt citokinek (IL-6, IL-10, TNF- α), illetve kemokin (IL-8) mennyiségét. Az ábra négy független kísérlet átlagát mutatja. *P<0,05, **P<0,01, a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, [#]P<0,05 az SPP kezelt sejtekhez viszonyítva.

IV.2.4. SPP kezelt cDC-k T sejt proliferáló képességének vizsgálata

A fenotípusos és funkcionális vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az SPP kezelés aktiválja a cDC-eket, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy ezen aktiváció milyen mértékű T sejt proliferációt képes indukálni allogén naív CD4⁺ T sejteken. Így SPP kezelt cDC-eket ko-kultiváltunk CFSE-vel jelölt naív T sejtekkel, majd 5 napos ko-kultivációt követően vizsgáltuk a T sejtek osztódását áramlási citométer segítségével. Az SPP kezelt cDC-k 71,1 %-os T sejt proliferációt idéztek elő, míg NADPH jelenlétében aktiválódott

cDC-k a T sejtek 83,3 %-át készítették osztódásra. Az SPP^H-vel előkezelt cDC-k a kezeletlen cDC-khez képest szintén fokozták a T sejt osztódást, de kisebb mértékben, mint az SPP kezelt cDC-k, illetve az SPP^H-val kezelt cDC-k esetében a NADPH jelenléte nem fokozta a T sejt proliferációt indukáló képességet. Ugyanakkor mind az SPP, illetve mind az SPP^H kezelt cDC-k DPI jelenlétében nem voltak képesek T sejt osztódást indukálni a ko-kultúrákban (24. ábra).



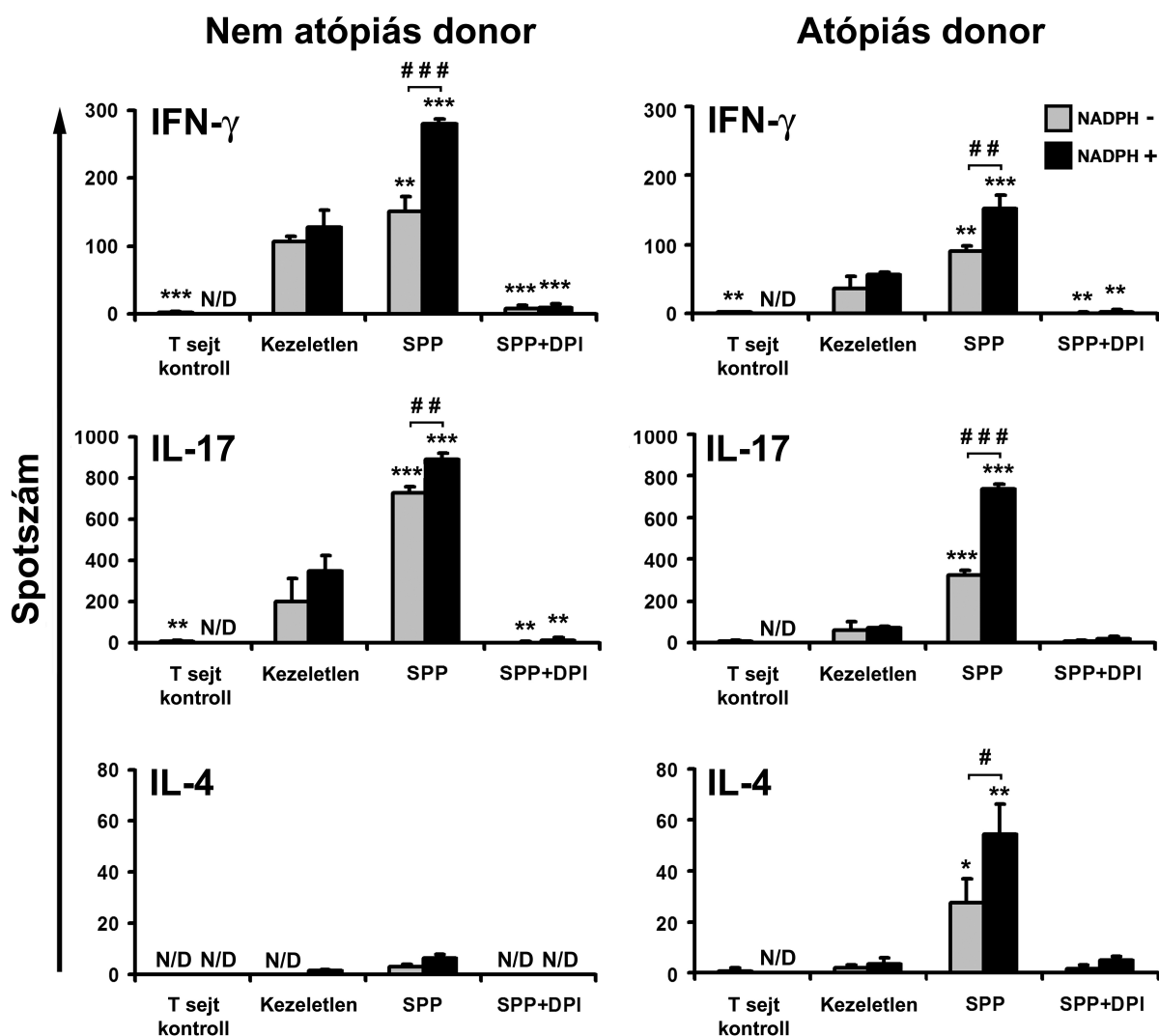
24. ábra Az SPP kezelt cDC-k naív, allogén T sejt proliferációt kiváltó képességének vizsgálata

A cDC-eket frissen izolált SPP-vel és az SPP-k hőinaktivált formájával (SPP^H) kezeltük meg a NAD(P)H oxidáz enzim specifikus gátlószerének (DPI) és az enzim szubsztrátjának (NADPH) jelenlétében, illetve anélkül. A 24 órás inkubációt követően a kezelt cDC-eket ko-kultiváltuk CFSE-vel jelölt naív, allogén CD4⁺ T sejtekkel, majd 5 napos ko-kultivációt követően áramlásos citometria segítségével vizsgáltuk a T sejtek proliferációját. Az ábrán a számok az osztódó T sejtek százalékos arányát jelzik egy reprezentatív kísérlet adatai alapján (N=4).

IV.2.5. SPP kezelés hatása a cDC-k allogén T sejt aktiváló képességére

Az SPP kezelt cDC-k allogén T sejt stimuláló képességének vizsgálatához SPP kezelt cDC-eket ko-kultiváltunk parlagfű allergiás, illetve nem allergiás egyének CD3⁺ pan-T sejtjeivel. A donorok atópiás státuszának megállapítása a szérum össz-IgE, illetve a parlagfű specifikus IgE szint alapján történt. A 6 napos ko-kultivációt követően megvizsgáltuk a T sejtek IL-4, IFN- γ , IL-17 citokin termelését ELISPOT módszer segítségével. A ko-kultúrák felülúszójából az IL-10 és TGF- β 1 mediátorokat ELISA módszerrel mértük. Az általunk vizsgált citokinek felvilágosítást adhatnak az adaptív immunválasz polarizáltságáról. Az allogén CD3⁺ pan-T sejtekkel történő ko-kultivációt követően a sejt kultúrákban nem voltak jelen IL-10 és TGF- β 1 termelő tolerogén T sejtek (az adatokat nem tüntettük fel), míg az SPP-vel kezelt cDC-k aktiválták az IFN- γ , illetve IL-17 szekretáló T sejteket függetlenül a donor atópiás státuszától. Ugyanakkor az IL-4 citokint termelő T sejtek aktivációját kizárólag parlagfűre allergiás egyének mintáiban

tudtuk detektálni. Ezekben a kísérleteinkben az SPP kezelt cDC-k a NADPH oxidáz szubsztrátjának, azaz exogén NADPH-nak a jelenlétében nagyobb mértékű T sejt aktivációt okoztak mindhárom T sejt populáció esetében. Ezzel szemben az SPP kezelt cDC-k specifikus NADPH oxidáz inhibitor jelenlétében nem indukálták a T sejtek aktivációját, mely arra enged következtetni, hogy az SPP NADPH oxidáza által termelt ROS-oknak részben szerepe lehet a cDC-k T sejt aktiváló képességében (25. ábra).



25. ábra Az SPP kezelés hatása a cDC-k allogén T sejt aktiváló képességére

A cDC-eket SPP-vel kezeltük meg 24 órán keresztül a NADPH oxidáz enzim specifikus gátlószerének (DPI) és az enzim szubsztrátjának (NADPH) jelenlétében, illetve anélkül. Ezt követően a kezelt DC-eket parlagfű allergiás (N=3), illetve nem allergiás (N=3) egyének allogén CD3⁺ pan-T sejtjeivel ko-kultiváltuk. A 6 napos ko-kultivációt követően ELISPOT módszer segítségével vizsgáltuk meg a T sejtek IFN- γ , IL-17, valamint IL-4 termelését. Az ábra egy-egy reprezentatív kísérlet három párhuzamosának átlagát mutatja. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 a kezeletlen DC-T sejt ko-kultúrákhoz viszonyítva, #P<0,05, ##P<0,01 az SPP kezelt DC-T sejt ko-kultúrákhoz viszonyítva. N/D: nem detektálható.

V. Megbeszélés

A pDC-k az immunrendszer ritka, különleges funkciókkal rendelkező, egyedülálló sejtpopulációját alkotják, melyekről korábban azt feltételezték, hogy az emberi szervezetben csak a vérben, csontvelőben és a limfoid szövetekben fordulnak elő. Nemrégiben derült fény arra, hogy antigén expozíció, illetve lokális gyulladás hatására képesek elhagyni a vérkeringést és a perifériás szövetekbe vándorolni. Ezen képességüket igazolják azon megfigyelések, miszerint SLE-ben szenvedőknél a pDC-k száma a perifériás vérben nagyon alacsony viszont a gyulladt bőrléziókban nagyszámban vannak jelen ezek a sejtek [139]. A normál bőrben gyakorlatilag nem lehet detektálni pDC-eket, de 6 órával az antigén expozíciót követően jelenlétük már kimutatható, és 72 órával az allergén bejutása után, már jelentős mennyiségben akkumulálódnak az érintett bőrfelületben, így valószínűleg nagy jelentőséggel bírnak az allergiás kontakt dermatitis pathogenezisében [106]. Kevés és változó számú pDC a normál orr-nyálkahártyában is kimutatható, kísérletesen kiváltott allergén expozíció esetén azonban a számuk drámaian megemelkedik [105].

Az antigén expozíciót követő gyulladásos folyamatok kialakulásában és fenntartásában fontos szerepe van az oxidatív stressznek. A gyulladásos sejtek, úgymint makrofágok, neutrofil, illetve eozinofil granulociták effektor működésekor keletkező oxigén eredetű szabadgyökök elsődleges célja a mikroorganizmusok, illetve célsejtek elpusztítása [140]. Ugyanakkor a sejten kívüli térbe jutva a ROS-ok károsíthatják a környező saját szöveteket is. A különböző makromolekulák (lipidek, proteinek, DNS) roncsolásán keresztül pedig láncreakciót indítanak el, melynek eredménye további sejtbéáramlás a gyulladás területére [116]. Kimutatták továbbá, hogy szerepük van egyes gyulladást fenntartó anyagok - például a prosztaglandin származékok - képződésében is [116]. A gyulladt perifériás szövetekbe vándorló pDC-k tehát az oxigén szabadgyökök emelkedett szintjével találkoznak, mely hatással lehet az immunválaszban betöltött funkcióikra. Több tanulmány is vizsgálta már az oxidatív stressz hatását cDC-ken, viszont a pDC-k oxidatív stresszre adott válaszát eddig még nem tanulmányozták. Bár a cDC-k, illetve a pDC-k közös prekursorokból származhatnak [141, 142], mégis számos tulajdonságuk tekintetében jelentősen különböznek egymástól. A pDC-k nem expresszálnak a sejtfelszínükön a cDC-kre jellemző mieloid markereket (CD11c, CD13, CD33), illetve mannóz receptort, ugyanakkor számos limfocita markert (CD2, CD5, CD7) fejeznek ki, valamint olyan faktorokat (pl. pre-TCR- α , λ 5, Spi-B), melyek eredetileg T és B sejtek fejlődése során játszanak szerepet [143, 144]. A pDC-k fenotípusos és

funkcionális sajátosságaikon kívül szöveti lokalizációjukban, illetve migrációs profiljukban is nagyban különböznek a cDC-ktől [145]. Ezen megfigyelések alapján elsőként kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e különbség a cDC-k, illetve a pDC-k oxidatív stressz tűrése között. Eredményeink azt mutatták, hogy a pDC-k jóval érzékenyebben reagálnak a kísérletesen kiváltott oxidatív stresszre, mint a cDC-k, mely megnyilvánult életképességük jelentős csökkenésében. Ezen megfigyelésünk összhangban van egy korábbi tanulmánnyal, amelyben kimutatták, hogy a különböző koncentrációjú H_2O_2 kezelés toxikus hatással van a limfoid eredetű sejtekre ($CD4^+$ T sejt, $CD8^+$ T sejt, B sejt, NK sejt) viszont a mieloid eredetű monocitákra nem [146]. A monocita-eredetű DC-k oxidatív stresszrel szemben tanúsított ellenállóképessége valószínűleg a sejtek nagyobb antioxidáns kapacitásának köszönhető. Bizonyított ugyanis a cDC-k nagymértékű peroxiredoxin termelése [147], valamint kataláz és sejt felszíni thiol expressziója [148], amelyek a pDC-kre nem jellemzőek.

Az irodalomban több adat is van arra nézve, hogy a $CD14^+$ monocitákból differenciáltatott DC-ken a H_2O_2 indukálja a MHC I fehérjék, illetve az MHC II osztályba tartozó HLA-DQ és HLA-DR sejt felszíni markerek expresszióját is [117]. Xantin-oxidáz/xantin rendszer segítségével létrehozott oxidatív stressz szintén fenotípusos változásokat eredményezett monocitákból származó DC-ken, ugyanis a kostimulatórikus molekulák ($CD80$ és $CD86$) és egy érési marker ($CD83$) sejt felszíni expressziója megnövekedett az enzim működése által generált $O_2^{\cdot-}$ hatására [118]. Ezen korábbi tanulmányok és a saját kísérleteink eredményei szerint a pDC-k a cDC-ktől eltérően reagálnak az oxidatív stresszre, mivel a H_2O_2 kezelés nem eredményezett szignifikáns növekedést egyik általunk vizsgált kostimulatórikus molekula expressziójában sem, illetve csökkentette az antigén prezentáló HLA-DQ molekula expresszióját. Ezenkívül az oxidatív stressz felfüggesztette a TLR7 receptor agonista (R837) pDC-kre gyakorolt aktiváló hatását is. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy az általunk kapott eredmények alacsony koncentrációjú H_2O_2 kezelés ($0,01 \mu M$) mellett születtek, míg a cDC-k esetében magas koncentrációjú H_2O_2 kezelést ($300 \mu M$ -os) alkalmaztak [117], mely szintén szerepet játszhat a két DC altípus oxidatív stresszre adott eltérő válaszaiban.

Az oxidatív stressznek kitett pDC-k kemokin, illetve citokin szekrécióját vizsgálva hasonló eredményeket kaptunk, mint a fenotípusos válaszok esetében. A H_2O_2 kezelés nem növelte az általunk vizsgált IL-8, IL-6, TNF- α és IFN- α szekrécióját, viszont gátolta a TLR7 ligand által kiváltott fokozott kemokin, illetve citokin termelést. Ezzel szemben, korábbi megfigyelések szerint a H_2O_2 kezelés hatására a cDC-k TNF- α , illetve IL-8 szekréciója fokozódik [119]. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az IL-6, IL-8, illetve

TNF- α szekréciója az NF- κ B szignáltranszdukciós útvonalon keresztül szabályozódik [149]. H₂O₂-vel kezelt aktivált, illetve memória T sejtek csökkent citokin termelését is az NF- κ B molekula gátolt funkciójával magyarázzák [150]. A pDC-k IFN termelése olyan szignál útvonalakon keresztül valósul meg, melyben központi szerepet játszik az IRF7 molekula [151]. Egér modellben kimutatták, hogy az öregedő pDC-k, melyeket az öregedési folyamatok következtében nagyobb mértékű oxidatív inzultus ért, csökkent IFN- α szekrécióval válaszolnak TLR9 receptor aktiválást követően, mely az IRF7 csökkent aktivációjának a következménye [152]. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy H₂O₂ kezelt pDC-k alacsony kemokin, illetve citokin szekréciójának molekuláris hátterében is az NF- κ B, illetve az IRF7 szignáltranszdukciós útvonalak blokádja állhat.

Az oxidatív stressznek a cDC-kre gyakorolt aktiváló hatását mutatja az is, hogy az oxidatív stressznek kitett cDC-k jelentős mértékben képesek indukálni a T sejtek proliferációját [117]. Ezek alapján megvizsgáltuk az oxidatív stressznek kitett pDC-k T sejt aktiváló, illetve proliferációt indukáló képességét. Ismert, hogy az éretlen állapotban lévő cDC-k IL-10 termelő T sejtek keletkezését váltják ki, míg a pDC-k csak érett állapotban, azaz antigén ingert követően képesek ezen T sejtek kialakulását előidézni [153]. Az érett pDC-ket ugyanis nagymértékű ICOS-L expresszió jellemzi, mely fehérje központi szerepet játszik az IL-10 termelő T sejtek kialakulásában [153]. Eredményeink azt mutatják, hogy a H₂O₂-vel kezelt pDC-ken ezen fehérje expressziója csökken, míg egy másik, a Treg polarizációnak kedvező molekula, a PDL-1 [154] sejt felszíni expressziója nem változik. Nem meglepő tehát, hogy a H₂O₂-vel kezelt pDC-knek a Treg sejtek kialakulását segítő potenciálja nagyon alacsony. Bár a pDC-k képesek Th17 irányú polarizációt is létrehozni [155], kísérleteinkben a H₂O₂-vel kezelt pDC-k nem indukálták a naív T sejtek Th17 irányú differenciálódását. Az oxidatív stressznek kitett pDC-k Th1/Th2 polarizáló képességét vizsgálva megállapítottuk, hogy a ROS-ok hatására a pDC-k inkább az anti-inflammatórikus Th2 irányú kialakulásának kedveztek, mind az autológ, mind az allogén T sejt aktiváció során. Ezt támasztotta alá azon megfigyelésünk is, miszerint a pDC-k OX40-L expressziója fokozódott H₂O₂ kezelést követően, ez a fehérje ugyanis kedvez a Th2 válasz kialakulásának DC-T sejt interakció során [156].

Kimutattuk továbbá, hogy a H₂O₂ kezelés negatív hatással volt a TLR7 agonistával aktivált pDC-k fenotípusos, illetve citokin válaszára, valamint csökkentette az aktivált pDC-k autológ, illetve allogén T sejt stimuláló képességét. Ezek alapján elmondható, hogy az *in vivo* körülmények között oxidatív stressznek kitett pDC-k valószínűleg anti-inflammatórikus, azaz gyulladást csökkentő tulajdonsággal bírnak, szemben a cDC-kkel, melyek főleg az inflammatórikus Th1 irányú válaszok kialakulásának kedveznek.

Megfigyeléseink összhangban vannak korábbi irodalmi adatokkal, melyek a pDC-knek a belélegzett antigének elleni adaptív immunválaszban betöltött szerepét vizsgálták [154, 157]. Egér modellben végzett kísérleteik szerint a cDC-k és a pDC-k is képesek antigént felvenni a tüdőben, és azt prezentálni a környéki nyirokcsomókban elhelyezkedő T limfociták számára. Amíg a cDC-k a T sejtek osztódását és aktivációját indukálták, a pDC-k gátolták az effektor T sejtek képződését és inkább a tolerancia kialakulásának kedveztek [157]. Szintén anti-inflammatórikus tulajdonsággal jellemezték a pDC-eket eregekben kiváltott allergiás légúti gyulladás esetében [154], mely kórképben bizonyítottan szerepe van az oxidatív stressznek [125]. Ezek a kísérletek is azt igazolják, hogy a pDC-knek inkább a gyulladást csökkentő szerepe lehet a perifériás szövetek között.

Ismert továbbá a pDC-k immunszuppresszív sajátossága szolid daganatos elváltozások esetében, ahol a tumor-eredetű makrofágok [158], illetve granulociták [159] ROS termelése oxidatív miliót hoz létre a tumor mikrokörnyezetében [160]. Több adat is alátámasztja, hogy az oxidatív stressz összefüggésbe hozható számos virális fertőzéssel [161, 162], melyek kivédésében az anti-virális aktivitással bíró pDC-knek fontos szerepe lenne. Eredményeink ugyanakkor arra engednek következtetni, hogy az oxidatív stressznek kitett pDC-knek csökkent válaszadó képességük miatt részben szerepe lehet a vírusfertőzések tüneteinek súlyosbodásában. Ezt látszik igazolni az a tanulmány is, amely szerint az oxidatív stresszt indukáló cigaretta füst gátolja a pDC-k TLR7 receptor általi aktivációját vírusinfekció esetében [163].

A pDC-k, illetve cDC-k oxidatív stresszre adott különböző válaszreakciója azt mutatja, hogy ezen két sejttípus eltérő funkciói kiegészítik egymást és *in vivo* körülmények között a pDC-k anti-inflammatórikus sajátosságának fontos szerepe lehet a gyulladással immunválasz egyensúlyának fenntartásában olyan patológiai körülmények esetében, ahol az oxidatív stressz meghatározó szereppel bír.

A pDC-kkel ellentétben a cDC-k immunválaszban betöltött funkcióit viszonylag jobban ismerjük a rendelkezésre álló irodalmi adatokból. A fentebb említettek alapján elmondható, hogy a cDC-k esetében a gyulladással immunreakciók során megjelenő oxidatív stressz aktivációs szignált jelenthet. Munkacsoportunk egy korábbi kísérletsorozatban azt találta, hogy mivel az aeroallergének által indukált légúti allergiás gyulladással oxidatív stresszel asszociáltak, az oxidatív stressz szerepet játszhat a pollen allergének általi cDC aktiválásban és ezáltal az adaptív immunválasz kiváltásában. [125].

A légutakban a gyulladással sejteken kívül környezeti faktorok is hozzájárulhatnak az oxidatív stressz létrejöttéhez. A gépjárművek kipufogógázai, az ózon, a dohányfüst fokozzák a ROS-ok szintjét a nyálkahártyákban, így súlyosbítják az allergiás légúti

gyulladás, illetve az asthma tüneteit [124]. Atópiás egyének esetében a pollen allergének is nagymértékű légúti gyulladást válthatnak ki. Megfigyelték azonban, hogy a légúti allergének koncentrációja a levegőben nincs szoros kapcsolatban a pollenszemek számával ugyanis paradox módon, könnyű nyári záporokat követően, miközben jelentősen csökken a pollenszemek mennyisége a levegőben, ugrásszerűen megnő a légúti allergiás tünetek előfordulása a pollen-szenzitized egyének körében [164]. Ilyenkor ugyanis a talajszintre mosódott és ott az esővízben hidratálódott pollenszemek jelentős mennyiségű SPP-t bocsátanak ki magukból, melyek a légáramlatok közvetítésével a légutakba jutva képesek kiváltani az allergiás reakciókat. A légutak hámrétege alatt hálózatot képező DC-k a hámsejtek között kibocsátott nyúlványaikkal folyamatosan képesek mintát venni a külső környezetből [126], így tehát közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a belélegzett SPP-ekkel, melyek méretüknél ($<5 \mu\text{m}$) fogva képesek az alsóbb légutakba is lejutni, szemben az intakt pollenszemekkel ($20\text{-}30 \mu\text{m}$).

Számos allergiás reakciót kiváltó fűfélékről is ismert, hogy hidratációt követően képes SPP-k kibocsátására [165-169], mi ugyanakkor munkánk során parlafű pollenszem szuszpenziókból izoláltunk SPP-eket, ugyanis a parlafű pollen az egyik leggyakoribb aeroallergének számít nemcsak Magyarországon, hanem egész Európában is [170]. Ezen parlafű SPP-k a munkacsoport korábbi megfigyelései alapján hordozzák az intakt pollenszemekre jellemző allergéneket (például az Amb a 1 fehérjét), továbbá NAD(P)H oxidázokat is, amely enzimek ROS-ok generálása révén hozzájárulnak az allergén expozíciót követő oxidatív stressz kialakulásához [123, 125]. Amikor az általunk frissen izolált SPP preparátumokhoz a NAD(P)H oxidáz szubsztrátját (NADPH) és egy redox-szenzitív fluoreszcens festéket adtunk ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$), jelentős fluoreszcencia intenzitásváltozást tudtunk detektálni, ami arra utal, hogy a kísérleteinkhez használt SPP preparátumokban is jelen vannak a NAD(P)H oxidázok. Megfigyeléseink szerint az SPP expozíció a cDC-kben intracelluláris ROS emelkedést eredményezett, ami összhangban van azon korábbi eredményekkel, amelyek szerint az SPP kezelés hasonló hatást fejtett ki epitheliális sejteken [123]. Az SPP-k hőinaktivált formája, illetve a NAD(P)H oxidáz enzim specifikus inhibitora (DPI) gátolta a fentebb említett hatást, míg az enzim szubsztrátjának jelenlétében nagyobb mértékű intracelluláris ROS emelkedést lehetett elérni a sejtekben, mely azt mutatja, hogy az oxidatív stressz indukálásában jelentős szerepe lehet az SPP-k NAD(P)H oxidázai által termelt ROS-oknak. Kimutattuk továbbá, hogy a humán cDC-k képesek a parlafű pollenből származó SPP-k felvételére, hasonló módon mint különböző fűfélékből származó SPP-k esetében az alveoláris makrofágok [171], a monocitákból differenciáltatott makrofágok, illetve DC-k [172], melyet más

munkacsoportok igazoltak. Ebben a folyamatban nagy valószínűséggel szerepet játszik a sejtek felszínén expresszáldó surfactant protein D, melyről leírták, hogy a humán bronchiális hámsejtek ezen fehérjék közvetítésével képesek megkötni a SPP-eket [173].

Munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy az intakt parlagfű pollenszemekkel történő közvetlen kölcsönhatás eredményeként a DC-k felszínén megnövekszik az aktivációs, illetve érési markerek expressziója [174]. Jelen eredményeink szerint az intakt pollenszemekből felszabaduló SPP-k is hasonló fenotípusos változásokat eredményeznek a cDC-ken. Ha a kezelést NADPH hozzáadásával végeztük el, a fehérjék expressziója tovább fokozódott, DPI jelenlétében viszont a fehérjék kifejeződése az alapszint közelében maradt. Mivel a szubsztrát jelenlétében fokozódott, a NAD(P)H oxidáz gátlószere hatására viszont csökkent a vizsgált fehérjék expressziója, elmondható, hogy az észlelt fenotípusos változásokban – legalább részben – az SPP-k NAD(P)H oxidázai által termelt ROS-ok játszanak szerepet. Érdekes módon, az SPP-k NAD(P)H oxidázainak hőinaktiválása csak kismértékben csökkentette az általunk vizsgált CD40, illetve CD80 kostimulatórikus molekulák kifejeződését. Ezen jelenség hátterében valószínűleg az áll, hogy a hőinaktiválás ugyan gátolja az SPP-k enzimaktivitását [123], viszont nem befolyásolja immunogenitásukat, mint ahogy azt számos pollen antigén esetében is már igazolták [175]. A CD86 kostimulatórikus fehérje esetében ugyanakkor a hőinaktiválás lecsökkentette a protein expressziót, hasonlóan a HLA-DQ molekulához. Ezen eltérő mintázat lehet az oka annak, hogy a CD86 molekula más úton szabályozza az allergiás folyamatok kialakulását, mint a CD40 és CD80 kostimulatórikus sejt felszíni fehérjék [176].

Az oxidatív stressz a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) által mediált jelátvivő útvonalon és az NF- κ B transzkripció faktoron keresztül számos gyulladáscsökkentő citokin és kemokin termelődését tudja kiváltani, illetve fokozni [119]. SPP expozíciót követően fokozódott az általunk vizsgált összes mediátor szekréciója, hasonlóan korábbi kísérleteinkhez, melyben a cDC-eket intakt pollenszemekkel kezeltük [174]. Igazoltuk, hogy az általunk vizsgált citokinek, illetve kemokinek szekréciójának fokozódása oxidatív stressz függő módon megy végbe, mivel az SPP-k ROS termelésének gátlása csökkentette, míg a NAD(P)H oxidáz enzim szubsztrátjának jelenléte fokozta az általunk megfigyelt jelenséget.

Mivel a cDC-eket professzionális APC-kként tartják számon [50], valamint a ROS esszenciális mediátora az antigén prezentációs folyamatoknak [177], kíváncsiak voltunk, hogy az SPP-kezelt cDC-k milyen mértékben képesek T sejt proliferációt kiváltani. Eredményeink azt mutatják, hogy az SPP kezelés nagymértékben fokozta a cDC-k T sejt aktiváló képességét, melyet a NAD(P)H oxidáz enzim gátlása felfüggesztett. Ha az SPP-

kezelt cDC-ket atópiás, illetve nem atópiás egyének allogén CD3⁺ pan-T sejtjeivel ko-kultiváltuk - melyek egyaránt magukban foglalnak naív, illetve memória T sejteket is - a cDC-k aktiváltak IFN- γ és IL-17 szekretáló T sejteket is, függetlenül a donor atópiás státuszától. Ez alátámasztja több korábbi vizsgálat megfigyeléseit is, melyek szerint allergén-specifikus T sejtek egészséges donorok vérében is jelen vannak [178, 179]. Ugyanakkor az IL-4 citokint termelő T sejtek aktivációját kizárólag parlagfűre allergiás egyének mintáiban tudtuk detektálni, mely arra enged következtetni, hogy az SPP-kezelt cDC-k aktiválják a parlagfű pollen allergén-specifikus Th2 effektor sejteket. Ezen megfigyelésünk összhangban van azzal a kísérletsorozattal, amelyben kimutatták, hogy poratka allergénnel történő kezelés csak allergiás gyermekek esetében vált ki Th2 citokin szekréciót [179].

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy az intakt parlagfű pollenből felszabaduló SPP-k képesek cDC aktiválásra, melyben részben szerepet játszanak az SPP-k NAD(P)H oxidáza által termelt ROS-ok. Ma már széleskörűen elfogadott, hogy a DC aktiváláshoz legalább két különböző szignál együttes jelenléte szükséges. Egyrészt magának az antigénnek a receptor-mediált felvétele, másrészt különböző exogén vagy endogén veszély jeleknek az érzékelése [180]. Ezek alapján elmondható, hogy az SPP-k felvételén kívül a cDC-k aktiválásához szükséges második szignált az SPP-k ROS termelő sajátossága biztosíthatja. Mivel ezen SPP-k méretüknél fogva az alsóbb légutakba is képesek lejutni, esszenciális szerepük lehet a DC aktiváción keresztül az adaptív immunválasz kiváltásában és ezáltal a pollen-indukált allergiás reakciók szenzitizációs fázisában.

Munkánkkal sikerült azon oxidatív stresszel asszociált immunológiai folyamatok újabb részleteit feltárni, amelyekben jelentős szerepet játszanak a DC-k. Eredményeink rávilágítanak arra is, hogy az oxidatív stressznek kitett szöveti környezetben a DC alpopulációk összehangolt, egymást kiegészítő, inflammatórikus, illetve gyulladást csökkentő sajátosságai szükségesek ahhoz, hogy a patogének eliminálása a saját szervezetet károsító hatások nélkül valósulhasson meg.

VI. Összefoglalás

A gyulladásos folyamatokban jelentős szerepet játszik az oxidatív stressz, így munkánk során átfogóbban kívántuk tanulmányozni a reaktív oxigéngyökök humán dendritikus sejtek (DC-k) működésére gyakorolt hatását.

Eredményeink szerint a plazmacitoid DC-k (pDC-k), a konvencionális DC-khez (cDC-k) viszonyítva érzékenyebben reagáltak a kísérletesen kiváltott oxidatív stresszre, mivel már alacsonyabb hidrogén peroxid koncentráció mellett is jelentősen csökkent az életképességük. Kimutattuk továbbá, hogy pDC-k esetében a hidrogén peroxid kezelés csökkentette az antigén prezentációban résztvevő fehérjék expresszióját, nem váltott ki gyulladásos kemokin, illetve citokin termelést, nem indukált I-es típusú interferon szekréciót, illetve felfüggesztette a Toll-like receptor 7 agonista pDC-kre gyakorolt aktiváló hatását. Az adaptív immunválasz polarizálódásának vizsgálatára irányuló kísérleteink alapján elmondható, hogy *in vivo* a gyulladásos sejtek által termelt reaktív gyököknek kitett pDC-knek a gyulladásokat csökkentő hatása lehet, az oxidatív stressz hatására főként inflammatórikus választ indukáló cDC-kkel szemben.

További kísérleteinkben a cDC-k fenotípusos, illetve funkcionális sajátosságait vizsgáltuk pollen allergének által kiváltott allergiás folyamatokban. Korábbi megfigyelések szerint a pollenszemekből felszabaduló allergének, illetve a pollen NAD(P)H oxidázok által termelt reaktív oxigéngyökök súlyos légúti allergiás gyulladás kiváltására képesek atópiás egyéneknél. Ugyanakkor az intakt pollenszemek méretüknél fogva nem jutnak le az alsóbb légutakba, ahol közvetlen kapcsolatba kerülhetnek a DC-kkel, így a pollen-indukált allergiás reakciók szenzitizációs fázisának mechanizmusa még tisztázatlan. Munkánk során igazoltuk, hogy a pollenszemekből a hidratáció során felszabaduló szubpollen partikulák jelentős szerepet játszhatnak ezekben a folyamatokban. A cDC-k ugyanis képesek voltak a parlagfű szubpollen partikulákat fagocitálni, mely megemelkedett intracelluláris reaktív oxigéngyök koncentrációval, megnövekedett antigén prezentációval, citokin és kemokin szekrécióval, valamint fokozott T sejt aktiváló képességgel társult. Megállapítottuk továbbá, hogy a szubpollen partikulák NAD(P)H oxidázai által termelt reaktív oxigéngyökök részt vehetnek a légúti DC-k aktiválásában, és ezáltal fontos szerepet játszhatnak az allergiás reakciók szenzitizálódási szakaszában.

Munkánk során sikerült részletesebben megismernünk a humán DC-k egyes altípusainak oxidatív stresszre adott válaszreakcióit, mellyel reményeink szerint hozzájárulunk olyan immunológiai kórképek patomechanizmusának jobb megértéséhez, melyekben az oxidatív stressz jelentős szereppel bír.

Summary

Several lines of evidence indicate that inflammatory processes are associated with oxidative stress. Thus, in this work we have focused on the possible effects of reactive oxygen species on the function of human dendritic cell subsets.

First, we have observed that plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are more sensitive to cell death induced by oxidative stress than conventional dendritic cells (cDCs). Furthermore, we have found that hydrogen peroxide treatments decreased the expression of molecules associated with antigen presentation on pDCs, and did not induce chemokine and cytokine including type I interferon production of the cells. In addition, exposure to hydrogen peroxide totally suppressed the Toll-like receptor 7 ligand-induced pDC activation. Results of our experiments on the T-cell-polarizing abilities of hydrogen peroxide-treated pDCs suggest that pDCs exposed to oxidative stress *in vivo* may have an anti-inflammatory role in regulating adaptive immune responses in contrast to oxidative stress-exposed cDCs displaying pro-inflammatory properties.

In our further experiments we have studied the phenotypic and functional changes of cDCs in allergic reactions induced by pollen allergens. It has been previously described that the pollen allergens and oxidative stress generated by pollen NAD(P)H oxidases act together to initiate robust airway inflammation in sensitized individuals. Although there is evidence that pollen antigens can induce allergic inflammation throughout the respiratory tract, whole pollen grains are considered too large to reach the lower airways and to interact with the lung cDCs. Thus, several unresolved questions remain relating to the development of adaptive immune responses against pollen-derived proteins. In our work we have proved that subpollen particles (SPPs) of respirable size released from hydrated pollen grains are fully capable of activating human cDCs and initiating the sensitization phase of allergic reactions. We have demonstrated that phagocytosis of SPPs by cDCs resulted in an increase in the intracellular level of reactive oxygen species, improved the cytokine and chemokine secretion of the cells, and enhanced the antigen-presenting and T-cell stimulatory capacity of cDCs. Furthermore we have demonstrated that the oxidative stress generated by the SPPs' NAD(P)H oxidase activity possesses a pivotal role in activation of airway cDCs, hereby it contributes to the initiation of adaptive immune responses against innocuous pollen proteins.

In conclusion, here we provide a detailed characterization of the phenotypic and functional changes of different dendritic cell subtypes responding to oxidative stress. Our findings may contribute to better understanding the pathomechanisms of immune disorders closely associated with oxidative stress.

VII. Irodalomjegyzék

VII.1. A doktori értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Halliwell, B., *Free radicals and antioxidants: a personal view*. Nutr Rev, 1994. 52(8 Pt 1): p. 253-65.
2. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. 408(6809): p. 239-47.
3. Inai, Y., et al., *Oxygen-dependent-regulation of Ehrlich ascites tumor cell respiration by nitric oxide*. Cell Struct Funct, 1996. 21(2): p. 151-7.
4. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 1998. 10(2): p. 248-53.
5. Tyler, D.D., *Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver*. Biochem J, 1975. 147(3): p. 493-504.
6. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. 59(3): p. 527-605.
7. Aust, S.D., D.L. Roerig, and T.C. Pederson, *Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes*. Biochem Biophys Res Commun, 1972. 47(5): p. 1133-7.
8. Capdevila, J., et al., *The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450*. Biochem Biophys Res Commun, 1981. 101(4): p. 1357-63.
9. Freeman, B.A. and J.D. Crapo, *Biology of disease: free radicals and tissue injury*. Lab Invest, 1982. 47(5): p. 412-26.
10. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 279(6): p. L1005-28.
11. Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance, *The cellular production of hydrogen peroxide*. Biochem J, 1972. 128(3): p. 617-30.
12. Tolbert, N.E. and E. Essner, *Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes*. J Cell Biol, 1981. 91(3 Pt 2): p. 271s-283s.
13. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. Blood, 1999. 93(5): p. 1464-76.
14. Segal, A.W. and K.P. Shatwell, *The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes*. Ann N Y Acad Sci, 1997. 832: p. 215-22.
15. Khansari, N., Y. Shakiba, and M. Mahmoudi, *Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer*. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2009. 3(1): p. 73-80.
16. Ran, Q., et al., *Glutathione peroxidase 4 protects cortical neurons from oxidative injury and amyloid toxicity*. J Neurosci Res, 2006. 84(1): p. 202-8.
17. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(17): p. 7915-22.
18. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. 82(2): p. 291-5.
19. Devasagayam, T.P., et al., *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects*. J Assoc Physicians India, 2004. 52: p. 794-804.
20. Esterbauer, H., G. Wag, and H. Puhl, *Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis*. Br Med Bull, 1993. 49(3): p. 566-76.
21. Cross, C.E., et al., *Oxygen radicals and human disease*. Ann Intern Med, 1987. 107(4): p. 526-45.
22. Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross, *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?* J Lab Clin Med, 1992. 119(6): p. 598-620.
23. Rhee, S.G., *Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger*. Exp Mol Med, 1999. 31(2): p. 53-9.

24. Singh, I., et al., *Cytokine-mediated induction of ceramide production is redox-sensitive. Implications to proinflammatory cytokine-mediated apoptosis in demyelinating diseases.* J Biol Chem, 1998. 273(32): p. 20354-62.
25. Wissing, D., H. Mouritzen, and M. Jaattela, *TNF-induced mitochondrial changes and activation of apoptotic proteases are inhibited by A20.* Free Radic Biol Med, 1998. 25(1): p. 57-65.
26. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): p. 11715-20.
27. Duranteau, J., et al., *Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes.* J Biol Chem, 1998. 273(19): p. 11619-24.
28. Hwang, A.B. and S.J. Lee, *Regulation of life span by mitochondrial respiration: the HIF-1 and ROS connection.* Aging (Albany NY), 2010. 3(3): p. 304-10.
29. McDonald, P.P., A. Bald, and M.A. Cassatella, *Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils.* Blood, 1997. 89(9): p. 3421-33.
30. Reth, M., *Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation.* Nat Immunol, 2002. 3(12): p. 1129-34.
31. Shanker, A., *Adaptive control of innate immunity.* Immunol Lett., 2010. 131(2): p. 107-12.
32. Itano, A.A. and M.K. Jenkins, *Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node.* Nat Immunol, 2003. 4(8): p. 733-9.
33. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse.* Nat Rev Immunol, 2003. 3(12): p. 973-83.
34. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.* J Exp Med, 1973. 137(5): p. 1142-62.
35. del Hoyo, G.M., et al., *Characterization of a common precursor population for dendritic cells.* Nature, 2002. 415(6875): p. 1043-7.
36. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.* J Exp Med, 1997. 185(6): p. 1101-11.
37. Corcoran, L., et al., *The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells.* J Immunol, 2003. 170(10): p. 4926-32.
38. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.* Nat Rev Immunol, 2007. 7(1): p. 19-30.
39. Banchereau, J., *The long arm of the immune system.* Sci Am, 2002. 287(5): p. 52-9.
40. Bell, D., J.W. Young, and J. Banchereau, *Dendritic cells.* Adv Immunol, 1999. 72: p. 255-324.
41. Huang, F.P. and G.G. MacPherson, *Continuing education of the immune system--dendritic cells, immune regulation and tolerance.* Curr Mol Med, 2001. 1(4): p. 457-68.
42. Schuler, G. and R.M. Steinman, *Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro.* J Exp Med, 1985. 161(3): p. 526-46.
43. Sixt, M., et al., *The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node.* Immunity, 2005. 22(1): p. 19-29.
44. Wilson, N.S., et al., *Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature.* Blood, 2003. 102(6): p. 2187-94.
45. Henri, S., et al., *The dendritic cell populations of mouse lymph nodes.* J Immunol, 2001. 167(2): p. 741-8.
46. Scott, C.L., A.M. Aumeunier, and A.M. Mowat, *Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance?* Trends Immunol., 2010. 32(9): p. 412-9.

47. Kassianos, A.J., et al., *Human CD1c (BDCA-1)+ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to Escherichia coli*. Eur J Immunol., 2010. 42(6): p. 1512-22.
48. Lauterbach, H., et al., *Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC*. J Exp Med, 2010. 207(12): p. 2703-17.
49. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 275-306.
50. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces*. Nat Immunol, 2009. 10(12): p. 1237-44.
51. Shortman, K. and W.R. Heath, *The CD8+ dendritic cell subset*. Immunol Rev, 2010. 234(1): p. 18-31.
52. Matthews, K., et al., *Potent induction of antibody-secreting B cells by human dermal-derived CD14+ dendritic cells triggered by dual TLR ligation*. J Immunol, 2012. 189(12): p. 5729-44.
53. MacDonald, K.P., et al., *Characterization of human blood dendritic cell subsets*. Blood, 2002. 100(13): p. 4512-20.
54. Xu, Y., et al., *Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking*. J Immunol, 2007. 179(11): p. 7577-84.
55. Wollenberg, A., et al., *Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases*. J Invest Dermatol, 2002. 118(2): p. 327-34.
56. Hansel, A., et al., *Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses*. J Allergy Clin Immunol, 2011. 127(3): p. 787-94 e1-9.
57. Gogolak, P., et al., *Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma*. Blood, 2007. 109(2): p. 643-52.
58. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets*. Immunology, 2013. 140(1): p. 22-30.
59. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 335-76.
60. van Vliet, S.J., et al., *Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity*. Curr Opin Immunol, 2007. 19(4): p. 435-40.
61. Barber, G.N., *Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIM2 and the regulation of interferon production and inflammatory responses*. Curr Opin Immunol., 2010. 23(1): p. 10-20.
62. Terhorst, D., et al., *The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases*. Am J Clin Dermatol, 2010. 11(1): p. 1-10.
63. Thompson, A.J. and S.A. Locarnini, *Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response*. Immunol Cell Biol, 2007. 85(6): p. 435-45.
64. Jeras, M., M. Bergant, and U. Repnik, *In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses*. Transpl Immunol, 2005. 14(3-4): p. 231-44.
65. Fitzgerald, K.A., D.C. Rowe, and D.T. Golenbock, *Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex*. Microbes Infect, 2004. 6(15): p. 1361-7.
66. Ziegler-Heitbrock, H.W. and R.J. Ulevitch, *CD14: cell surface receptor and differentiation marker*. Immunol Today, 1993. 14(3): p. 121-5.

67. Farhat, K., et al., *Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling*. J Leukoc Biol, 2008. 83(3): p. 692-701.
68. Feili-Hariri, M., D.H. Falkner, and P.A. Morel, *Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy*. J Leukoc Biol, 2005. 78(3): p. 656-64.
69. Traidl-Hoffmann, C., T. Jakob, and H. Behrendt, *Determinants of allergenicity*. J Allergy Clin Immunol, 2009. 123(3): p. 558-66.
70. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R.A. Kastelein, *The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses*. Immunity, 2003. 19(5): p. 641-4.
71. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. 3(6): p. 549-57.
72. Lugo-Villarino, G., et al., *T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(13): p. 7749-54.
73. Lazarevic, V., et al., *T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat*. Nat Immunol., 2010. 12(1): p. 96-104.
74. Del Prete, G., *Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy*. Allergy, 1992. 47(5): p. 450-5.
75. Murray, H.W., et al., *Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular Toxoplasma gondii*. J Immunol, 1985. 134(3): p. 1982-8.
76. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. 4(3): p. 313-9.
77. Glimcher, L.H. and K.M. Murphy, *Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up*. Genes Dev, 2000. 14(14): p. 1693-711.
78. Zhu, J., et al., *Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion*. J Immunol, 2001. 166(12): p. 7276-81.
79. Sokol, C.L., et al., *Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response*. Nat Immunol, 2009. 10(7): p. 713-20.
80. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. 441(7090): p. 235-8.
81. Manel, N., D. Unutmaz, and D.R. Littman, *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat*. Nat Immunol, 2008. 9(6): p. 641-9.
82. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. 24(2): p. 179-89.
83. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. 204(8): p. 1849-61.
84. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. 24(6): p. 677-88.
85. Ivanov, II, et al., *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. 126(6): p. 1121-33.
86. Kaplan, M.H., *Th9 cells: differentiation and disease*. Immunol Rev., 2010. 252(1): p. 104-15.
87. Zhang, N., H.F. Pan, and D.Q. Ye, *Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention*. Mol Cell Biochem., 2010. 353(1-2): p. 41-6.

88. Akdis, M., et al., *Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells*. J Exp Med, 2004. 199(11): p. 1567-75.
89. Woodfolk, J.A., *T-cell responses to allergens*. J Allergy Clin Immunol, 2007. 119(2): p. 280-94; quiz 295-6.
90. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2009. 123(4): p. 735-46; quiz 747-8.
91. Commins, S.P., L. Borish, and J.W. Steinke, *Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines*. J Allergy Clin Immunol., 2010. 125(2 Suppl 2): p. S53-72.
92. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(11): p. 853-65.
93. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production*. J Exp Med, 2000. 192(11): p. 1545-52.
94. Fazilleau, N., et al., *Follicular helper T cells: lineage and location*. Immunity, 2009. 30(3): p. 324-35.
95. Cerwenka, A., T.M. Morgan, and R.W. Dutton, *Naive, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial*. J Immunol, 1999. 163(10): p. 5535-43.
96. Soumelis, V. and Y.J. Liu, *From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation*. Eur J Immunol, 2006. 36(9): p. 2286-92.
97. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. 5(10): p. 987-95.
98. Cao, W., et al., *BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells*. PLoS Biol, 2007. 5(10): p. e248.
99. Jarrossay, D., et al., *Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. 31(11): p. 3388-93.
100. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, 2001. 194(6): p. 863-9.
101. Benko, S., et al., *Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors*. Biol Chem, 2008. 389(5): p. 469-85.
102. Gonzalez-Navajas, J.M., et al., *Immunomodulatory functions of type I interferons*. Nat Rev Immunol., 2010. 12(2): p. 125-35.
103. Izaguirre, A., et al., *Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2003. 74(6): p. 1125-38.
104. Kerkmann, M., et al., *Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2003. 170(9): p. 4465-74.
105. Jahnsen, F.L., et al., *Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy*. J Immunol, 2000. 165(7): p. 4062-8.
106. Bangert, C., et al., *Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease?* J Invest Dermatol, 2003. 121(6): p. 1409-18.

107. Yoneyama, H., et al., *Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules*. *Int Immunol*, 2004. 16(7): p. 915-28.
108. Shinohara, M.L., et al., *Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells*. *Nat Immunol*, 2006. 7(5): p. 498-506.
109. Gilliet, M., W. Cao, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(8): p. 594-606.
110. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. *Nat Immunol*, 2004. 5(12): p. 1219-26.
111. Kadowaki, N., et al., *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. *J Exp Med*, 2000. 192(2): p. 219-26.
112. Ito, T., et al., *Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery*. *Immunity*, 2008. 28(6): p. 870-80.
113. Faget, J., et al., *ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells*. *Cancer Res.*, 2010. 72(23): p. 6130-41.
114. Demoulin, S., et al., *Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms*. *J Leukoc Biol.*, 2010. 93(3): p. 343-52.
115. Conrad, C., et al., *Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells*. *Cancer Res.*, 2010. 72(20): p. 5240-9.
116. Bowler, R.P. and J.D. Crapo, *Oxidative stress in allergic respiratory diseases*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 110(3): p. 349-56.
117. Rutault, K., et al., *Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells*. *Free Radic Biol Med*, 1999. 26(1-2): p. 232-8.
118. Kantengwa, S., et al., *Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. 167(3): p. 431-7.
119. Verhasselt, V., M. Goldman, and F. Willems, *Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells*. *Eur J Immunol*, 1998. 28(11): p. 3886-90.
120. Laihia, J.K. and C.T. Jansen, *Up-regulation of human epidermal Langerhans' cell B7-1 and B7-2 co-stimulatory molecules in vivo by solar-simulating irradiation*. *Eur J Immunol*, 1997. 27(4): p. 984-9.
121. Alderman, C.J., et al., *The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function*. *Free Radic Biol Med*, 2002. 32(5): p. 377-85.
122. King, T.P., *Chemical and biological properties of some atopic allergens*. *Adv Immunol*, 1976. 23: p. 77-105.
123. Bacsí, A., et al., *Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 118(4): p. 844-50.
124. Riedl, M.A. and A.E. Nel, *Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008. 8(1): p. 49-56.
125. Boldogh, I., et al., *ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation*. *J Clin Invest*, 2005. 115(8): p. 2169-79.
126. Takano, K., et al., *HLA-DR- and CD11c-positive dendritic cells penetrate beyond well-developed epithelial tight junctions in human nasal mucosa of allergic rhinitis*. *J Histochem Cytochem*, 2005. 53(5): p. 611-9.
127. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma*. *Immunity*, 2009. 31(3): p. 412-24.

128. Gunawan, H., et al., *Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed*. Allergol Int, 2008. 57(1): p. 83-91.
129. Auerbach, A. and M.L. Hernandez, *The effect of environmental oxidative stress on airway inflammation*. Curr Opin Allergy Clin Immunol., 2010. 12(2): p. 133-9.
130. Sadowska, A.M., Y.K.B. Manuel, and W.A. De Backer, *Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review*. Pulm Pharmacol Ther, 2007. 20(1): p. 9-22.
131. Beutner, K.R., et al., *Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream*. J Am Acad Dermatol, 1999. 41(6): p. 1002-7.
132. Slade, H.B., *Cytokine induction and modifying the immune response to human papilloma virus with imiquimod*. Eur J Dermatol, 1998. 8(7 Suppl): p. 13-6; discussion 20-2.
133. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. 179(4): p. 1109-18.
134. Demedts, I.K., et al., *Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. 32(3): p. 177-84.
135. Demedts, I.K., et al., *Different roles for human lung dendritic cell subsets in pulmonary immune defense mechanisms*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. 35(3): p. 387-93.
136. Cross, A.R. and O.T. Jones, *The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase*. Biochem J, 1986. 237(1): p. 111-6.
137. Li, Y. and M.A. Trush, *Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 253(2): p. 295-9.
138. Sagi, M. and R. Fluhr, *Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection*. Plant Physiol, 2001. 126(3): p. 1281-90.
139. Blomberg, S., et al., *Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2001. 10(7): p. 484-90.
140. Slauch, J.M., *How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question*. Mol Microbiol., 2010. 80(3): p. 580-3.
141. Naik, S.H., et al., *Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo*. Nat Immunol, 2007. 8(11): p. 1217-26.
142. Onai, N., et al., *Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow*. Nat Immunol, 2007. 8(11): p. 1207-16.
143. Spits, H., et al., *Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2*. J Exp Med, 2000. 192(12): p. 1775-84.
144. Bendriss-Vermare, N., et al., *Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells*. J Clin Invest, 2001. 107(7): p. 835-44.
145. Randolph, G.J., J. Ochando, and S. Partida-Sanchez, *Migration of dendritic cell subsets and their precursors*. Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 293-316.
146. Weng, H., et al., *Differential DNA damage induced by H2O2 and bleomycin in subpopulations of human white blood cells*. Mutat Res, 2008. 652(1): p. 46-53.

147. Rivollier, A., et al., *High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: possible implications in atherosclerosis*. Mol Cell Proteomics, 2006. 5(4): p. 726-36.
148. Thoren, F.B., et al., *Cutting edge: Antioxidative properties of myeloid dendritic cells: protection of T cells and NK cells from oxygen radical-induced inactivation and apoptosis*. J Immunol, 2007. 179(1): p. 21-5.
149. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. 18(49): p. 6853-66.
150. Malmberg, K.J., et al., *Inhibition of activated/memory (CD45RO(+)) T cells by oxidative stress associated with block of NF-kappaB activation*. J Immunol, 2001. 167(5): p. 2595-601.
151. Tailor, P., T. Tamura, and K. Ozato, *IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells*. Cell Res, 2006. 16(2): p. 134-40.
152. Stout-Delgado, H.W., et al., *Aging impairs IFN regulatory factor 7 up-regulation in plasmacytoid dendritic cells during TLR9 activation*. J Immunol, 2008. 181(10): p. 6747-56.
153. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, 2007. 204(1): p. 105-15.
154. Kool, M., et al., *An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation*. J Immunol, 2009. 183(2): p. 1074-82.
155. Yu, C.F., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation*. J Immunol., 2010. 184(3): p. 1159-67.
156. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs*. J Immunol, 2004. 172(7): p. 4253-9.
157. de Heer, H.J., et al., *Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen*. J Exp Med, 2004. 200(1): p. 89-98.
158. Kono, K., et al., *Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Eur J Immunol, 1996. 26(6): p. 1308-13.
159. Schmielau, J. and O.J. Finn, *Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients*. Cancer Res, 2001. 61(12): p. 4756-60.
160. Lande, R. and M. Gilliet, *Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses*. Ann N Y Acad Sci., 2010. 1183: p. 89-103.
161. Schwarz, K.B., *Oxidative stress during viral infection: a review*. Free Radic Biol Med, 1996. 21(5): p. 641-9.
162. Israel, N. and M.A. Gougerot-Pocidallo, *Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection*. Cell Mol Life Sci, 1997. 53(11-12): p. 864-70.
163. Castro, S.M., K. Chakraborty, and A. Guerrero-Plata, *Cigarette smoke suppresses TLR-7 stimulation in response to virus infection in plasmacytoid dendritic cells*. Toxicol In Vitro., 2010. 25(5): p. 1106-13.
164. Wark, P.A., et al., *Airway inflammation in thunderstorm asthma*. Clin Exp Allergy, 2002. 32(12): p. 1750-6.
165. Schappi, G.F., et al., *Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1*. Allergy, 1999. 54(5): p. 478-83.
166. Grote, M., et al., *Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (Lolium perenne) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy*. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(6 Pt 1): p. 1140-5.

167. Grote, M., et al., *Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy.* J Allergy Clin Immunol, 2001. 108(1): p. 109-15.
168. Taylor, P.E., et al., *Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2002. 109(1): p. 51-6.
169. Taylor, P.E., et al., *Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens.* Clin Exp Allergy, 2004. 34(10): p. 1591-6.
170. D'Amato, G., et al., *Allergenic pollen and pollen allergy in Europe.* Allergy, 2007. 62(9): p. 976-90.
171. Erpenbeck, V.J., et al., *Surfactant protein D increases phagocytosis and aggregation of pollen-allergen starch granules.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. 288(4): p. L692-8.
172. Schleh, C., et al., *Surfactant Protein D modulates allergen particle uptake and inflammatory response in a human epithelial airway model.* Respir Res., 2010. 13: p. 8.
173. Schleh, C., et al., *Allergen particle binding by human primary bronchial epithelial cells is modulated by surfactant protein D.* Respir Res., 2010. 11: p. 83.
174. Csillag, A., et al., *Pollen-induced oxidative stress influences both innate and adaptive immune responses via altering dendritic cell functions.* J Immunol., 2010. 184(5): p. 2377-85.
175. Baer, H., et al., *The heat stability of short ragweed pollen extract and the importance of individual allergens in skin reactivity.* J Allergy Clin Immunol, 1980. 66(4): p. 281-5.
176. Okano, M., et al., *Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phases of allergic rhinitis in mice.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. 164(8 Pt 1): p. 1501-7.
177. Maemura, K., et al., *Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells.* Immunol Cell Biol, 2005. 83(4): p. 336-43.
178. Kimura, M., et al., *Development of the capacity of peripheral blood mononuclear cells to produce IL-4, IL-5 and IFN-gamma upon stimulation with house dust mite in children with atopic dermatitis.* Int Arch Allergy Immunol, 2002. 127(3): p. 191-7.
179. Bullens, D.M., et al., *House dust mite-specific T cells in healthy non-atopic children.* Clin Exp Allergy, 2005. 35(12): p. 1535-41.
180. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 685-711.

VII.2. A Kenézy Élettudományi Könyvtár által kiállított saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/95/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Pázmándi Kitti Linda

Neptun kód: I70KZ3

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

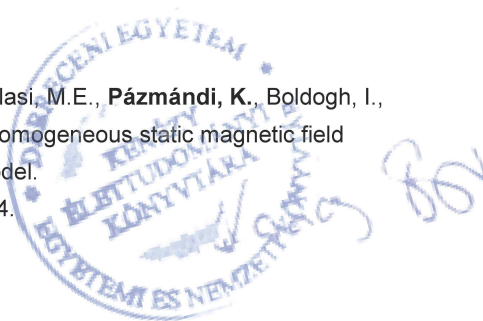
Mtmt azonosító: 10034553

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pázmándi, K.**, Magyarics, Z., Boldogh, I., Csillag, A., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Modulatory effects of low-dose hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells.
Free Radic. Biol. Med. 52 (3), 635-645, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.022>
IF:5.271
2. **Pázmándi, K.**, Kumar, B.V., Szabó, K., Boldogh, I., Szóór, Á., Vereb, G., Veres, Á., Lányi, Á., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Ragweed subpollen particles of respirable size activate human dendritic cells.
PLoS One. 7 (12), e52085, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052085>
IF:3.73

További Közlemények

3. Csillag, A., Kumar, B.V., Szabó, K., Szilasi, M., Papp, Z., Szilasi, M.E., **Pázmándi, K.**, Boldogh, I., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A., László, J.F.: Exposure to inhomogeneous static magnetic field beneficially affects allergic inflammation in a murine model.
J. R. Soc. Interface. 11 (95), 20140097-20140097, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0097>
IF:4.907 (2012)





DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



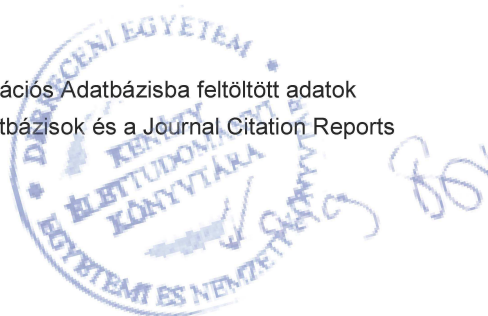
4. Szabó, A., Magyarics, Z., **Pázmándi, K.**, Gopcsa, L., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: TLR ligands up-regulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner.
Immunol. Cell Biol. "accepted by publisher", 2014.
IF:3.925 (2012)
5. Szabó, A., Gogolák, P., **Pázmándi, K.**, Kis-Tóth, K., Riedl, K., Wizel, B., Lingnau, K., Bácsi, A., Réthi, B., Rajnavölgyi, É.: The Two-Component Adjuvant IC31H Boosts Type I Interferon Production of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells via Ligation of Endosomal TLRs.
PLoS One. 8 (2), e55264-, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055264>
IF:3.73 (2012)
6. Csillag, A., Boldogh, I., **Pázmándi, K.**, Magyarics, Z., Gogolák, P., Sur, S., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Pollen-Induced Oxidative Stress Influences Both Innate and Adaptive Immune Responses via Altering Dendritic Cell Functions.
J. Immunol. 184 (5), 2377-2385, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803938>
IF:5.745
7. Magyarics, Z., Csillag, A., **Pázmándi, K.**, Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening.
Cytometry A. 73 (3), 254-258, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20529>
IF:3.259

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30.567

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9.001

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.05.06



VIII. Tárgyszavak

Dendritikus sejt, oxidatív stressz, gyulladás, szubpollen partikulák, szenzitizáció, allergia, sejt aktiváció, immunreguláció, adaptív immunválasz

Keywords

Dendritic cells, oxidative stress, inflammation, subpollen particles, sensitization, allergy, cell activation, immune regulation, adaptive immune response

IX. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Bácsi Attilának, aki kiemelkedő szakmai tudásával, elmés és olykor zseniális meglátásaival munkámat az elmúlt évek során fáradtságot nem kímélve mindvégig segítette, és aki mind szakmailag és mind emberileg ösztönzően hatott rám és nélkülözhetetlen támogatást nyújtott eredményeim eléréséhez.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Rajnavölgyi Évának, aki intézetvezetőként lehetővé tette számomra az Immunológiai Intézetben a doktori értekezésemhez szükséges kísérletes munkák elvégzését, és aki biztosította szakmai fejlődésemet az immunológia tudományterületén.

Külön köszönet illeti Dr. Magyarics Zoltánt, akitől szakdolgozói időszakom alatt rengeteg segítséget kaptam az új módszerek elsajátításában, illetve a kísérletes munkák megtervezésében és technikai kivitelezésében.

Köszönettel tartozom Veres Ágotának, Brahma V. Kumarnak, Szabó Krisztinának, valamint munkacsoportunk minden tagjának a laboratóriumi munkák terén nyújtott lelkes segítségükért, akik áldozatos munkájukkal hozzájárultak kísérleteim gyors és hatékony megvalósításához.

Köszönetet mondok továbbá az Immunológiai Intézet összes dolgozójának, illetve kollaborációs partnereinknek, akik munkájukkal vagy szakmai tudásukkal mind hozzájárultak doktori értekezésem elkészüléséhez.

Köszönöm Családomnak és Barátaimnak a mérhetetlen szeretetet, támogatást és biztatást, ami erőt adott nekem és az évek során mindvégig ösztönözte munkámat és céljaim elérését.

X. Függelék

1. **Pázmándi K.**, Magyarics Z., Boldogh I., Csillag A., Rajnavölgyi É., Bácsi A.:
Modulatory effects of low-dose hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells.
Free Radic. Biol. Med. 52 (3), 35-645, 2012.
2. **Pázmándi K.**, Kumar B.V., Szabó K., Boldogh I., Szöőr Á., Veres G., Veres Á.,
Lányi Á., Rajnavölgyi É., Bácsi A.: Ragweed subpollen particles of respirable
size activate human dendritic cells.
PLoS One. 7 (12), e52085, 2012.