

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A mikrobióta baktériumok egyedi sajátosságainak és a retinoid környezet hatása a dendritikus sejtek által vezérelt immunválaszra

Bene Pál Krisztián

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT-ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2017

A mikrobióta baktériumok egyedi sajátosságainak és a retinoid környezet hatása a dendritikus sejtek által vezérelt immunválaszra

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

Írta: **Bene Pál Krisztián** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében.

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Szabó Judit, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar,
Immunológiai Intézet, ÉTK 2.209
2015. május 04. 11 óra.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora
Dr. Pós Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora
Dr. Pós Zoltán, PhD
Dr. Szatmári István, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar,
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstan Intézet tanterme
2017. június 16. 14.00 óra

1. BEVEZETÉS

Az antigén-specifikus immunválaszt az öröklött és a szerzett immunrendszer egymással együttműködve hozza létre. Az immunválasz elsődleges célja, hogy elpusztítsa a kórokozókat és a tumoros elváltozásokat mutató sejteket, amely folyamat egyik fő irányítói az öröklött immunrendszerhez tartozó dendritikus sejtek (DC).

A születést követően a bőr és a nyálkahártyák felszíne számos mikrobával kerül kölcsönhatásba, amelyet összefoglaló néven mikrobiótának hívunk. Ezen mikrobák egy része betegséget okozó patogén, vagy az emberi szervezettel együtt élő kommenzális mikroorganizmus. Ezen mikrobák egy része hasznos a szervezet számára, amely cserébe tápanyagokkal látja el a mikrobát a táplálkozás során. A szimbiózissal velünk együtt élő mikrobák meggátolják a patogének elszaporodását és anyagcseretermékeik révén a szervezet számára jótékony hatással is bírnak. Ilyen előnyös mikroba pl. a *Lactobacillus reuteri* tejsavbaktérium, amely a nyálkahártya felszínét borító mucin réteget bakteriális adhezinekkel képes kötni és így stabil *L. reuteri* populáció maradhat fent a bélrendszerben. De hogy ezen adhezinek milyen immunológiai sajátosságokkal bírnak, még kevésbé ismert.

Az egészséges és a betegséggel küzdő szervezetben a táplálkozás és a bél mikrobióta meghatározza a helyi és a szisztémás immunválasz fejlődését és kimenetét. Ugyanis a táplálékot, köztük A-vitamint tartalmazó és mikrobákban gazdag bél mikrokörnyezet számos ligandumot biztosít az immunsejtekben megjelenő, lipideket felismerő sejtmagi hormon és a mintázat felismerő receptorok számára. A DC-k alapvető szereppel bírnak a bél mikrobióta közösség és az emberi szervezet között kialakuló kölcsönhatások szabályozásában, de hogy a molekuláris szinten zajló folyamatokra miként hathat az A-vitamin utánpótlása, illetve a kommenzális mikrobióta közösség jelenléte egy kialakuló immunválasz során még egyelőre nincs részleteiben feltárva.

Ezen problémák megoldásának megközelítése során olyan kísérleti rendszert terveztünk, ahol megvizsgáltuk a mucint kötő bakteriális adhezinek szerepét az *L. reuteri* baktériumok által létrehozott immunválaszban, illetve megfigyeltük hogyan befolyásolja az A-vitamin származéka, az all-*trans* retinsav (ATRA) a primer DC-k által vezérelt immunválaszt a kommenzális és probiotikus hatású bélbaktériumokkal szemben.

1.1. A különböző DC populációk eltérő effektor és/vagy regulatórikus sajátosságokkal bírnak

A dendritikus sejt elnevezés egy heterogén sejtpopulációt takar. Ide értjük a konvencionális, a plazmacitoid és a monocita-eredetű DC-ket. Valamennyien a csontvelőben található CD34⁺ hematopoietikus őssejtekből erednek, amelyek tovább fejlődnek a közös mieloid progenitorrá. A közös mieloid progenitorból fejlődnek ki a monociták, amelyek a vérkeringésen keresztül eljuthatnak a fertőzött vagy sérült szöveti területre, ahol makrofággá vagy DC-vé alakulhatnak a citokínkörnyezettől függően.

A DC-k szerepét elsősorban *in vitro* előállításuk során deríthetjük ki. Gyulladásos és tolerogén DC-k állíthatók elő monocitákból, csontvelői sejtekből és embrionális őssejtekből a citokinek (IL-4, TNF- α , TGF- β), növekedési faktorok (M-CSF, GM-CSF) és egyéb anyagok (D-vitamin) különböző kombinációinak segítségével. A DC-véérés során a monocitákra jellemző molekulák folyamatosan eltűnnek (pl. a CD14 és a CD1d), míg a PRR (DC-SIGN), kostimulációs és antigén prezentációért felelős gének expressziója folyamatosan emelkedik. Az *in vitro* előállított moDC-k megtalálhatók a szervezetben és hatékonyan vesznek részt a szisztémásan és a nyálkahártyában zajló immunválaszban.

1.2. Egyes transzkripciós faktorok a DC fejlődését és immunogén sajátosságait elsődlegesen határozzák meg

A DC differenciációja során a genomban található gének az úgynevezett „mester” transzkripciós faktorok pontos expressziós szabályozása alatt állnak. Ilyen mester transzkripciós faktorok pl. a sejtmagi hormon receptor *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) γ , *retinoic-acid receptor* (RAR) és *retinoid X receptor* (RXR) vagy az *interferon regulatory factor* (IRF) 4, IRF8 és a Runx3, amelyek aktivitásuk és mennyiségük alapján alkalmazhatók az egyes DC populációk jellemzésére is.

A sejtmagi hormon receptorok endogén és exogén lipofil ligandumokkal rendelkeznek. Négy csoportra oszthatjuk őket: a homodimer szteroid hormonreceptorok, az RXR heterodimerek (PPAR, RAR, liver X receptor, *vitamin-D receptor/VDR*), a dimer és az orfán receptorok. Alapállapotban jellemzően a citoplazmában található inaktív formában hőszokk-fehérjékhez kötődve, vagy a sejtmagban a DNS-hez kötődve egy hiszton-deacetiláz aktivitással rendelkező korepresszor komplexben. A ligandum kötődését követően a citoszólikus hőszokk-proteinhez vagy a DNS-hez kötött, gátolt hormon receptorok felszabadulnak a gátlás alól és kifejtik génexpressziót szabályozó funkciójukat.

Az RXR és a RAR receptorok ligandumainak elsődleges forrásai a táplálék útján kerül be a szervezetbe, de ezek a molekulák endogén módon is termelődhetnek. A RAR-ok természetes liganduma az ATRA, amíg az RXR-ok a 9-*cisz* RA által aktiválódnak. A RAR receptorok kiemelkedő szereppel bírnak az embriogenezis, a sebgyógyulás, a bőrhámépződés, a mieloid sejtek, a vázrendszer és az idegrendszer fejlődése során. Ezenkívül a RAR izoformák irányítják a GM-CSF, a GM-CSFR, a PPAR γ és a CD1 gének expresszióját is DC-ben. A PPAR γ fehérje mennyisége megemelkedik az érő moDC-ben GM-CSF és IL-4 jelenlétében és együttműködik a retinoid receptorokkal. A ligandum kötődését követően a PPAR γ vezérli az endogén ATRA szintézisében szerepet játszó molekulák expresszióját, amely így a RAR α aktivációjához vezet. Érdekes módon az anyagcserében, a lipid antigének feldolgozásában és bemutatásában, az invariáns természetes öltő T

sejtek (iNKT) aktivációjában szerepet játszó gének egy csoportját a PPAR γ mellett a RAR α is irányítja.

1.3. A retinsav eredete

Az ATRA egy A-vitamin (retinol) származék, amely a táplálkozás során karotionoidok által kerül a szervezetbe és kiemelt szereppel bír a bél nyálkahártya, a bőr és a szem épségének megtartásában. Az bélrendszerben az ATRA előállítására a DC-k, makrofágok, bélhámsejtek és a bélhamban található őssejtek képesek. Az immunsejtekben működő, ATRA-szintézisben részt vevő enzimek működéséhez szükséges szubsztrátok elsődleges forrása a vérben kötött formában lévő retinol, amely az STR6 transzporter által kerül a sejtbe, ahol a CRBP1 és CRBP2 fehérjék kötik és tárolják a citoplazmában. A retinolt az alkohol-dehidrogenázok (ADH) és a retinol-dehidrogenázok (RDH) oxidálják retinallá, amely szubsztrátként szolgál a retinsavat előállító retinaldehid-dehidrogenázok (RALDH) számára. A RALDH enzimnek három izoformája ismert, amelyet az ALDH1A1, ALDH1A2 és az ALDH1A3 gének kódolnak. Ezen izoformák DC-ben és makrofágokban eltérő mértékben jelennek meg.

1.4. A dendritikus sejtek a C-típusú lektin receptoraik aktiválásán keresztül képesek az immunválasz polarizálására

A DC-k genetikailag konzervált PRR-kat jelenítenek meg, amelyeket szerkezetük alapján öt nagy családba sorolhatunk: az AIM2-szerű receptorok (ALR), a C-típusú lektin receptorok (CLR), a NOD-szerű receptorok (NLR), a RIG-I-szerű helikázok (RLH) és a Toll-szerű receptorok (TLR). Ezen receptorok patogén-, mikroba- vagy veszély-asszociált mintázatok felismerésére képesek (PAMP, MAMP, DAMP). A különböző felépítésű mikrobák más és más mintázat-felismerő receptor-kombinációkat aktiválnak és ez alapján véve meghatározza meg a DC által vezérelt immunválasz kimenetét. A C-típusú lektin receptorok mikrobiális és/vagy humán eredetű glikoproteineket vagy szénhidrátokat ismernek fel, úgymint a mannóz, fukóz, a szíalsav és β -glukánok. A DC-k a Dectin-2 és a DC-SIGN lektin receptorok által tudják megkülönböztetni az egészséges humán sejteket, a mikrobiális szervezeteket és a tumoros sejteket egymástól.

1.5. A mikrobióta tagokkal szembeni immunválaszt a DC-k irányítják a nyálkahártya sajátos környezetében

A nyálkahártyában előforduló DC-k egy heterogén populációt alkotnak, amely egyaránt rendelkezhetnek mieloid vagy csontvelői eredettel. Közös jellemzőjük, hogy a bél mikrobióta közösség tagjaival illetve a táplálék-eredetű antigénekkal szemben kialakítják és fenntartják a tolerogén immunválaszt. A vékonybélben jelen lévő mononukleáris fagociták, úgymint a DC-k és makrofágok, nyálkahártyához asszociálható sejtfelszíni molekulákat jelenítenek meg, pl. a CX₃CR1

kemokin receptor vagy a CD103 integrin molekula. A nyálkahártya *lamina propria* nevű szövetében előforduló CD103⁺ és CX₃CR1⁺ DC-k a bélhámsejteken átnyúlva folyamatosan mintát vesznek a bélüregből és ellenőrzik a bélüregben található antigének összetételét. A CX₃CR1⁺ DC-k fő forrásai a vérből kilépő monociták, amelyek az idő előre haladtával lecsökkentik a CX₃CR1 receptor sejtfelszíni expresszióját. A nyálkahártyában a CX₃CR1⁺ DC-k aktív fagocitákat és potenciális Th17 típusú immunválaszt kialakító sejteket képeznek. A CD11b⁺CD103⁺ DC-k CCR7-függő módon képesek a közeli mezenterális nyirokcsomóba vándorolni és a luminális antigéneket bemutatják a nyirokcsomóban lévő T sejteknek. Az ATRA-termelő CD103⁺ DC-k perifériás regulatorikus T-limfocita (Treg) sejteket is képesek polarizálni, amelyek segítenek meggátolni a mikrobióta tagokra specifikus effektor T sejtek túlzott működését.

1.6. A nyálkahártya immunitás folyamatosan termel és tart fenn effektor és regulatorikus T-limfocita populációkat

A nyálkahártya által nyújtott speciális mikrokörnyezet biztosítja, hogy fennmaradjon az effektor, regulator és memória T sejtekből álló populáció. Ezen T sejtek főleg a bél mikrobióta és táplálék eredetű antigénekre specifikusak. Az effektor T sejtek, úgymint a Th1, Th17 és T folliculáris segítő (Tfh) sejtek sajátos módon folyamatosan jelen vannak a nyálkahártyákban, miközben IFN γ , IL-17, IL-12 és IL-22 citokineket termelnek, amelyek egyaránt hatnak a környező immunsejtekre illetve a bélhám közönséges és specializált sejtjeinek működésére. Ahhoz, hogy elkerülje a szervezet az effektor T sejtekből származó, gyulladásos citokinek által okozott szöveti károsodást, a helyi Treg sejtek gyulladást gátló IL-10 és TGF- β citokineket termelnek.

A nyálkahártya Treg sejtjei a timuszból eredhetnek vagy perifériásan is kialakulhatnak naív, segítő T-limfocitákból. A citokinkörnyezettől és az immunológiai vonatkozástól függően, a perifériás Treg sejtek képződését elősegíti az endogén módon termelt ATRA és a kommenzális bélbaktériumokból származó, a növényi rostok fermentációja során termelt rövid szénláncú zsírsavak (SCFA), mint a vajsav jelenléte. A vajsav fokozza a Treg sejtek fejlődését vezérlő Foxp3 transzkripciós faktor génhez tartozó promoter régió H3 hisztonjának acetilációját.

Az ATRA-nak viszont kettős hatása is lehet a naív Th sejt polarizációjára a koncentrációjától függő módon. A Treg differenciációt az ATRA és a TGF- β jelenlétében a mikrobiális antigéneket bemutató CD103⁺ *lamina propria* eredetű DC-k indítják be RAR-függő módon. Ez a mechanizmus alakítja ki a perifériás tolerancia egy fajtáját, az orális toleranciát a táplálék és mikrobióta eredetű antigénekkal szemben. Másrészt a retinol és az IL-6 együtt hatva a DC-k Th17 típusú immunválaszt alakítanak ki, amely effektor T sejt populáció különösen nagy szereppel bír a gombák elleni védekezés során.

1.7. A humán mikrobióta közösség

Az emberi szervezetben a bőr és a nyálkahártyák természetes védelmi vonalakat képeznek a környezettel szemben, amely felszínek egyben élőhelyül is szolgálnak számos mikroorganizmus számára, ideértve a baktériumokat, Archaeákat, egysejtű gombákat, amelyeket összefoglaló néven mikrobiótának nevezünk. A betegséget okozó patogén mikrobákkal szemben a mikrobióta tagok nem jelenítenek meg virulencia faktorokat és így nem tudnak szétterjedni a szervezetben. A bakteriofágok, az eukariótákat fertőző vírusok, a protozoák és a soksejtű paraziták nem tekintendők a normál mikrobióta tagjainak, azonban ezek a mikrobák számos egyén mikrobióta közösségében fellelhetők.

Születést követően a mikrobák azonnal kolonizálni kezdik az újszülött testfelszíneit, amelyeket kommenzális, szimbionta és opportunista patogén csoportokba oszthatunk a gazdaszervezettel való kölcsönhatásuk szerint. A rezidens, nem-patogén mikrobióta baktériumok elvonják a tápanyagot a patogének elől, illetve különböző antimikrobiális anyagokat termelnek, amely folyamatot kolonizációs rezisztenciának nevezünk, azaz gátolják a patogén mikrobák kolonizációját, elszaporodását. A felszíneket borító biológiai védelmet tovább erősíthetik a baktériumokat és/vagy egysejtű gombákat tartalmazó probiotikumok, illetve a normál mikrobióta közösség és a probiotikumok számára fontos tápanyagokat tartalmazó prebiotikumok. A mikrobióta tagok a szervezet számára hasznos anyagokat, úgymint vitaminokat, életteni hatással bíró rövid szénláncú zsírsavakat, oligoszacharidokat termelnek, amelyek közvetett módon befolyásolják a helyi és szisztémás immunválaszt, fenntartják a nyálkahártya épségét és előnyösen befolyásolják a szervezet különböző szervrendszereinek működését. A bél mikrobióta hiányában anyagcserezavarok, immundeficienciák alakulnak ki, illetve megnő az esélye az elhízásnak, az inzulin rezisztencia, az autoimmun és krónikus gyulladásos betegségek kialakulásának és az idegrendszeri, viselkedésszerű zavarok kifejlődésének az esélye.

Az *Enterobaktériumok* a γ -*Proteobaktériumok* egy nagy csoportját alkotják, ahová fakultatív anaerob baktériumok, úgymint a *Morganella morganii* és az *Escherichia coli* baktériumok is sorolhatók. Ezek Gram-negatív pálcika, kommenzális bélbaktériumok, amelyek főleg a vastagbélben fordulnak elő és általában részét képezik a normál bél mikrobiótának. Az *E. coli var. mutabilis* (*E. coli* *Schaedler*) eredetileg a nyolc baktériumtörzsből álló *Schaedler*-flóra egy tagja, amelyet egér bélből izoláltak. Az *E. coli* *Schaedler* és a *M. morganii* egyedülálló immunmoduláló hatással bírnak, elősegítve például az IgA-termelő plazmasejtek kialakulását.

Jelen tanulmányban két probiotikus hatású bélbaktériumot, nevezetesen a *Bacillus subtilis* és *L. reuteri* baktériumokat is vizsgáltunk a *Firmicutes* baktériumok csoportjából, amelynek tagjai egyébként nagy számban vannak jelen a béltraktusban. A *B. subtilis* Gram-pozitív, spóra formáló, obligát vagy fakultatív aerob baktérium. A *B. subtilis* 090 törzset széles körben használják az állatorvosi medicinában, mint probiotikum a MonosporynTM nevű termékben, amelyet az Ungvári Nemzeti Egyetemen fejlesztettek ki.

A környezet eltúlzott fertőtlenítése, trauma vagy a bélrendszerbe bejutott kemikáliák a bél mikrobióta diszbiózisához, azaz a mikrobiális közösség megváltozásához vezethet amely veszélyezteti a bél nyálkahártya épségét. A szervezet számára kedvezőtlen összetételű mikrobióta szerepet játszhat a krónikus gyulladással, autoimmun és idegrendszert érintő betegségek kialakulásában. A krónikus bélgyulladás egyik fajtájában, a Crohn-betegségben szenvedők esetében például a *Proteobaktériumok* aránya megemelkedik, míg a *Firmicutes* baktériumoké csökken. A probiotikus *E. coli* Nissle 1917 törzs alkalmazható krónikus bélgyulladásban szenvedők esetén, mivel megfékezi a patogén *E. coli* baktériumok elszaporodását. A fiatal korban kolonizáló, jótékony hatású vagy kommenzális *E. coli* 083 törzs és a *L. rhamnosus* baktériumok csökkentik az allergiás és atopiás dermatitis incidenciáját túlzott higiéniai körülmények között.

1.8. A *Lactobacillus reuteri* tejsavbaktérium evolúciósan együtt fejlődött az emberi szervezettel

A gerincesek bélrendszerében élő normál mikrobióta tagja a *L. reuteri* tejsavbaktérium, amely számos előnyös hatással rendelkezik a szervezet számára. Meggátolja a patogén mikrobák növekedését, fenntartja a bélhám integritását, helyi és szisztémás immunmoduláló hatással rendelkezik. A szervezet többi szervrendszerére kifejtett közvetett hatások elsősorban a termelt anyagoknak, úgymint a rövid szénláncú zsírsavaknak köszönhető, de a helyileg ható tejsav és a reuterin nevű antimikrobiális anyagok felelősek a patogének távol tartásáért. A *L. reuteri* baktériumok stabil genommal rendelkeznek, de bizonyos törzsek antibiotikum rezisztenciát is kódoló géneket hordoznak, amelyek nem alkalmazhatók probiotikumként.

Bizonyos probiotikus *L. reuteri* törzsek gyulladást fokozó hatással bírnak, pl. a *L. reuteri* 100-23 képes a Treg populációk kialakítására míg a *L. reuteri* 15007 szájon át történő adminisztrációja csökkenti az IFN γ gén expressziós szintjét és növeli a TGF- β expresszióját a mezenterális nyirokcsomóból származó sejtekben. A gyulladást csökkentő, humán béltraktust kolonizáló *L. reuteri* ATCC PTA 6475 és az ATCC PTA 5289 törzsek csökkentették a TNF- α szekrécióját LPS-sel stimulált monocita-szerű sejtekben. A legújabb szakirodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a tejsavbaktériumok immunmoduláló hatásában jelentős szereppel bírnak a sejtfalon megjelenő adhéziós fehérjék.

1.9. A mucint kötő bakteriális adhezin fehérjék

A bélrendszert egy gélt formáló mucin réteg borítja, melynek fő alkotója a mucin glikoproteinek, de tartalmaz még antimikrobiális peptidokat és szekretoros IgA (sIgA)-t, így mintegy kémiai védelmet biztosít a mikrobákkal szemben. A mikrobák az evolúció során viszont olyan struktúrákat fejlesztettek ki, amelyek segítségével képesek megkapaszkodni és tartósan fennmaradni ezen a mucin rétegen. Ilyen struktúrák pl. az adhezinek, a pilusok és flagellák, amelyek előfordulnak patogén és kommenzális mikrobákon egyaránt. A *L. reuteri* baktériumok mucint kötő adhezinek (MucBP)

jelenítenek meg. Az egyik ilyen legjobban karakterizált adhezín a 353 kDa molekulásúlyú MUB fehérje, amelyet a *L. reuteri* ATCC 53608 törzs jelenít meg, illetve az ATCC 6475 felszínén megjelenő CmbA protein.

Ezen adhéziós fehérjék tehát valószínűleg nemcsak a baktériumok penetrációját szolgálják, hanem ligandumként is szolgálhatnak a DC-k felszínén lévő mintázat felismerő receptorok számára és módosíthatják a baktérium egyéb alkotórészei által aktivált PRR-okról érkező jelátviteli útvonalak által aktivált gyulladásozó és regulatórikus immunválaszt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

I. A *Lactobacillus reuteri* tejsavbaktériumon megjelenő mucint kötő adhezinek szerepének vizsgálata az moDC által vezérelt gyulladás és effektor segítő T sejt polarizáció során

A tejsavbaktériumok felszínén lévő adhéziós fehérjék és az immunválaszt koordináló moDC közötti kölcsönhatások pontos molekuláris kölcsönhatásai még nem tisztázottak. Így célul tűztük ki

- a különböző adhezinek (CmbA, MUB) megjelenítő vad típusú *L. reuteri* törzsek és mutáns variánsaik fagocitózisának vizsgálatát moDC-ben;
- az adhezinek megjelenítő és mutáns *L. reuteri* törzsek gyulladásos és Th polarizáló képességének összehasonlítását moDC-ben;
- a tisztított MUB fehérje gyulladást kiváltó képességének vizsgálatát moDC-ben;
- a C-típusú lektin receptorok szerepének molekuláris szinten való nyomon követését az moDC és az *L. reuteri* baktériumtörzsek kölcsönhatása során.

II. Az A-vitamin származék all-*transz* retinsav hatásának vizsgálata az moDC differenciációjára és a normál bél mikrobióta tagok által aktivált immunválaszra

Hipotézisünk szerint a vérből kilépő monociták DC-vé való fejlődését módosítja a vékonybél *lamina propria* szövetének citokinekkal, növekedési faktorokkal és retinsavval kondicionált mikrokörnyezete. Így valószínű, hogy az így kialakuló DC populáció a bélben élő mikrobióta tagokkal szemben eltérő immunválaszt kialakító képességgel rendelkezhetnek, mint a retinoidok hiányában fejlődő sejtek. Az moDC által irányított kommenzális és probiotikus bélbaktériumokra specifikus immunválasz jellemzéséhez célul tűztük ki:

- az moDC GM-CSF, IL-4 és 1 nM koncentrációjú ATRA jelenlétében vagy hiányában történő differenciációjának fenotípusos karakterizálását;
- az moDC kommenzális *E. coli* *Schaedler*, a *M. morgani* és a probiotikus *B. subtilis* bélbaktériumokat fagocitáló képességének monitorozását retinoid környezetben és hiányában;
- a kommenzális és probiotikus bélbaktériumok T sejt polarizáló képességének mérését retinsav jelenlétében vagy annak hiányában fejlődött moDC-ben;
- a retinsav lehetséges molekuláris célfehérjéinek felderítését az moDC differenciáció alatt.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Baktériumtörzsek

A tanulmány első részében a *L. reuteri* ATCC PTA 6475 (lar_0958⁺/CmbA⁺) és a *L. reuteri* ATCC PTA 6475 lar_0958-KO/CmbA-KO törzseket, valamint a *L. reuteri* ATCC 53608 (MUB⁺) és ezen törzs MUB-KO mutáns variánsát, az *L. reuteri* 1063N törzset használtuk. A *L. reuteri* törzseket Dr. Nathalie Juge biztosította részünkre (*Institute of Food Research*, Norwich, Egyesült Királyság).

A kísérletek második részében az alábbi kommenzális bélbaktériumokat használtuk fel: *E. coli* var. *mutabilis* (Schaeidler), *M. morgani* és *B. subtilis* 090, amely törzseket Dr. Nadiya Boyko szolgáltatta kísérleti felhasználásra (Ungvári Nemzeti Egyetem, Ukrajna).

3.2. Reagensok

Az anti-humán Dectin-2 IgG az InvivoGen (31400 Toulouse, Franciaország) terméke. Az anti-DC-SIGN monoklonális ellenanyag (120507-es klón) az Abcam (Cambridge, UK) terméke. Az ATRA, a szelektív, természetes RAR α -antagonista BMS-19614 (BMS614) és az anti-humán β -aktin a Sigma-Aldrich termékei (Schnelldorf, Németország). Az anti-IRF4 antitest a Cell Signaling Technology, Inc. terméke (Trask Lane, Danvers, MA, USA).

3.3. Humán moDC sejtek *in vitro* differenciációja

Az egészséges donorokból származó, leukocitákkal feldúsított vérkészítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat debreceni kirendeltségű Regionális Vérellátó Központja szolgáltatta részünkre kísérleti felhasználás céljából. A vérkészítmények felhasználására vonatkozó etikai engedélyt az Országos Vérellátó Szolgálat, a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar és a Regionális és Intézményi Kutatói Etikai Bizottság adta ki. A vérkészítmények előállítása és tárolása az Európai Unió hatályos irányelvei szerint történtek. A perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) grádiens alapú centrifugálással nyertük ki Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország) segítségével. A CD14⁺ monocitákat a PBMC-ből anti-CD14, paramágneses gyönggyel konjugált ellenanyagokkal nyertük ki pozitív szeparálással, VarioMACS mágneses állványon. Áramlási citometriás mérések alapján az izolált sejtek 96-99%-a CD14⁺ monocita. A monocitákat két napig tenyésztettük 12-lyukú tenyésztő lemezen, $5,0 \times 10^5$ sejt/ml sűrűségben, szérumentes AIM-V Gibco-féle tápfolyadékban (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), amelyet 80 ng/ml GM-CSF (Gentaur Molecular Products, Brüsszel, Belgium) és 100 ng/ml IL-4 (PeproTech EC, London, UK) citokinnel kondicionáltunk. Egyes moDC tenyészeteket 1 nM ATRA jelenlétében differenciáltattuk, amelyet a meghatározott kísérleteknél 75 perces inkubáció előzött meg 1 μ M BMS614 specifikus RAR α -antagonistával. A sejteket 37°C-on 5%-os CO₂ tartalom mellett tenyésztettük.

3.4. Baktériumok tenyésztése és felhasználásuk az moDC stimulációhoz

A *L. reuteri* baktériumokat Difco™ de Man, Rogosa & Sharpe (MRS, BD BioSciences, Franklin Lakes, NJ USA) tápfolyadékban tenyésztették 18 órán keresztül, rázatás nélkül 37°C-on aerob körülmények között. Az *E. coli* *Schaedler*, a *M. morgani* és a *B. subtilis* baktériumokat 2%-os Lysogeny Broth tápfolyadékban (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország) tenyésztették egy éjszakán keresztül, állandó rázatás mellett 37°C-on szintén aerob körülmények között. A baktérium szuszpenziókat 25 ml steril foszfát alapú pufferrel, PBS-sel mostuk háromszor és a kolóniaformáló egységek (CFU) számát spektrofotométerrel állapítottuk meg, ahol az $OD_{600nm} \times 2.5 \times 10^8$ CFU/ml. A humán moDC kultúrákat 250 ng/ml ultratiszta lipopoliszachariddal (LPS, InvivoGen) vagy élő kommenzális baktériumokkal aktiváltuk nem toxikus, moDC : CFU = 1 : 0,4 arányban, amelyet 1,5 vagy 24 órás koinkubáció követett.

3.5. Fagocitózis mérés

Az élő baktériumokat 3500 rpm sebességgel, 5 perces centrifugálással összegyűjtöttük és 25 ml PBS-sel mostuk. A baktériumokat 65°C-on, 45 perc elteltével inaktívtuk és 0,25 M karbonát-bikarbonát pufferben (pH 9,0) szuszpenzióba hoztuk. A hőinaktívált baktériumokat tartalmazó szuszpenziót (900 µl) 100 µl, 5 mg/ml koncentrációjú, dimetil-szulfoxidban oldott fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) inkubáltuk folyamatos keverés mellett 4°C-on egy éjszakán át. A FITC-cel jelölt, inaktívált baktériumokat intenzíven mostuk PBS-sel és 1,5 vagy 3 órán keresztül együtt inkubáltuk a moDC-vel 37°C vagy 4°C-on, moDC : CFU = 1 : 20 arány mellett. A FITC-baktérium konjugátomra pozitív moDC-eket áramlási citometriával mutattuk ki.

3.6. Áramlási citometriás mérések

A nyugvó és az aktivált moDC fenotípusos jellemzőit áramlási citometriával vizsgáltuk, amely során anti-humán CD1d-PE (fikoeritrin), CD103-FITC, HLA-DQ-FITC, PD-L1/CD274-PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), CD1a-APC (allofikocianin), CD40-FITC (BioLegend, San Diego, CA, USA), CX₃CR1-PE, CD80-FITC, CD83-FITC, CD86-PE, DC-SIGN-FITC, CCR7-PE, CD14-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ellenanyagokat és ezekkel megegyező izotípus kontrollakat használtunk. A Treg sejtek vizsgálatát áramlási citométerrel végeztük el, anti-humán CD25-PE (BD-Pharmingen), CD4-FITC (BioLegend), FoxP3-APC (R&D Systems) és anti-IL-10-AlexaFluor488 (BioLegend) jelölt ellenanyagok felhasználásával. Az aktivációt követően 24 órával az moDC életképességét 2 µg/ml 7-AAD (LKT Laboratories Inc., St. Paul, MN, USA) DNS-be interkaláló festék segítségével mértük áramlási citometriával. A fluoreszcencia intenzitásokat FACSCalibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel mértük, az adatokat FlowJo szoftverrel elemeztük (Tree Star, Ashland, OR, USA).

3.7. RNS izolálás, cDNS szintézis és valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR)

A teljes RNS mennyiséget a TriReagent (Molecular Research Centr, Inc., Cincinnati, OH, USA) lizáló reagenssel szabadítottuk fel a sejtekből. A teljes RNS-ből (1 µg) reverz transzkripció PCR technika segítségével cDNS-t készítettünk *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fischer Scientific) reagens kit felhasználásával. Génspecifikus TaqMan primereket és hidrolizisen alapuló, fluorokrómmal jelölt próbákat (Thermo Fischer Scientific) alkalmaztunk a célgének relatív expressziós szintjének meghatározására. A folyamathoz 12,5 µl templát cDNS-t, a qPCR reagenseket és Dream-taq DNA polimeráz enzimet tartalmazó reakció elegyet használtunk. A PCR reakciót ABI StepOnePlus készülékkel végeztük el. A h36B4 háztartási gén expressziós szintjéhez viszonyítottuk a célgének expressziós szintjét specifikus h36B4 primereket és jelölt próbát felhasználva (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). A ciklusok küszöbértékét a StepOne Software 2.1 segítségével határoztuk meg (Thermo Fischer Scientific).

3.8. A termelt citokinek és kemokinek koncentrációjának meghatározása

Az moDC felülűsóját az aktivációt követően 24 órával összegyűjtöttük és ELISA módszerrel meghatároztuk a termelt TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12(p70), IL-23(p19) citokinek és a CXCL-8 kemokin koncentrációját OptEIA kitek (BD Biosciences) segítségével, a gyártó protokolljában leírt utasításoknak megfelelően.

3.9. Az moDC által stimulált autológ T-limfociták polarizációjának vizsgálata

Az effektor segítő T sejt válasz monitorozásához a nyugvó, LPS-sel vagy élő bélbaktériummal stimulált moDC-eket perifériás vér limfocitákkal (PBL) inkubáltuk együtt négy napig AIM-V tápfolyadékban. Az moDC : T sejt arány 1 : 20 volt. A kokubációt követően az IFN γ -át és az IL-17 citokint termelő T sejtek számát ImmunoSpot (ELISPOT) módszerrel határoztuk meg (NatuTec GmbH, Frankfurt am Main, Németország). Negatív kontrollként szolgáltak azon sejtenyészetek, ahol nyugvó moDC-k voltak együtt inkubálva T sejtekkel, illetve T sejtenyészetek moDC nélkül. Az IL-17 citokin szekréció kimutatásához az ELISPOT lemezeket előzőleg az anti-IL-17 mellett 0,5 µg/ml anti-humán CD3 ellenanyaggal (BD Biosciences) is lefedtük. A lemezeket ImmunoScan lemez olvasóval és kiértékelő programmal (Cell Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA) analizáltuk.

A Treg sejteket hat napos kokultúrából mutattuk ki, ahol az moDC : T sejt arány 1: 10 volt. Az IL-10 termelő Treg sejteket áramlási citometriával határoztuk meg. A kokultúrában lévő sejtekhez a felvétel előtt hat órával monensin tartalmú Golgo-StopTM reagenst adtunk a gyártó utasítási szerint (BD Biosciences). Ezt követte a sejtek felszíni és intracelluláris jelölése ellenanyagokkal, ami során CitoFix/Cytoperm fixáló és permeabilizáló puffert (BD Biosciences) alkalmaztunk

3.10. Western blot

A sejteket Laemli pufferben lizáltuk, majd a fehérje extraktumokat 10%-os poliakrilamid gélben megfuttattuk és nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Az IRF4 fehérjét nyúlban termelt anti-humán IRF4 ellenanyaggal jelöltük a membránon, aminek jelenlétét poliklonális, tormaperoxidázzal konjugált másodlagos anti-nyúl ellenanyaggal (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) határoztuk meg lumineszcencián alapuló detektálási rendszerrel (SuperSignal ECL Sytem, Thermo Fischer Scientific). A célfehérje relatív expresszióját a β -aktin fehérje expressziójának segítségével határoztuk meg.

3.11. A C-típusú lektin receptorok által vezérelt gyulladáso s válasz *in vitro* vizsgálata

A CLR-ek az moDC által beindított gyulladáso s válasz szerepének vizsgálatához tisztított, endotoxin-mentes, bakteriális eredetű MUB adhezin fehérjét alkalmaztunk. A MUB fehérjét 38,5 μ g/ml koncentrációban gamma-sugárzással sterilizált OptEIA lemezekben immobilizáltuk 4°C-on, egy éjszakán át. A fedést követően a lemezt intenzíven mostuk steril PBS-sel.

Az moDC-eket 5 μ g/ml anti-humán DC-SIGN vagy anti-Dectin-2 neutralizáló ellenanyag jelenlétében vagy hiányában inkubáltuk egy órá n át jégen. Az inkubációt követően a sejteket 5 ml friss AIM-V tápfolyadékkal mostuk, majd 24 órá n át inkubáltuk a MUB-fedett és fedetlen OptEIA lemezen. A TNF- α és az IL-6 citokinek koncentrációját OptEIA kitek segítségével határoztuk meg.

A kísérletek másik részében az ellenanyaggal fedett és nem fedett moDC-eket élő *L. reuteri* bélbaktériumokkal, az ATCC 53608 vad típusú és az 1063N MUB-KO mutaá ns törzsekkel inkubáltuk 1,5 órá n keresztül moDC . CFU = 1 : 4 arányban. A koinkubációt követően az moDC-eket intenzíven mostuk 1000 rpm-en 5x5 percig 4°C-on, steril PBS-ben. Az moDC-eket végül autológ T-limfocita kokultúrában tenyésztettük tovább 1 : 20 arányban négy napig friss AIM-V médiumban. Az IFN γ termelő T-limfociták számát ELISPOT technikával határoztuk meg.

3.12. Statisztikai analízis

Student-féle párosítatlan, két szélű *t*-tesztet vagy variancia-analízist alkalmaztunk az adott paramétereken belül mért különbségek matematikai elemzéséhez. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket, ha a $p < 0,05$. Szignifikánsan eltérő szórásnégyzetek esetén a *t*-teszteknel Welch-korrekcíót alkalmaztunk. Az eredmények átlagát +SD-vel ábrázoltuk. A statisztikai analízist és ábrázolást Graphpad Prism 6.0 szoftverrel végeztük el (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A *Lactobacillus reuteri* baktériumokon megjelenő mucint kötő adhezinek szerepének vizsgálata az moDC által vezérelt gyulladási válaszban

4.1.1. A mucin adhezinek fokozzák az *L. reuteri* bélbaktériumok felvételét moDC-ben

Az *L. reuteri* ATCC PTA 6475 törzs CmbA adhezint, míg az ATCC 53608 törzs MUB adhezint jelenít meg a sejtfalán. Jól ismert tény, hogy a fagocitózis folyamata már a kezdetén meghatározza a kialakuló antigén-specifikus immunválasz minőségét. A *L. reuteri* fagocitózisának monitorozásához a vad típusú és a 6475-KO valamint az 1063N MUB-KO mutáns variánsokat használtuk.

A FITC-cel jelölt baktériumokat 1,5 órán át, 37°C-on inkubáltuk együtt az moDC tenyészetekkel. Az 1063N törzset tízszer kisebb hatékonysággal internalizálták az moDC-k, mint a vad típusú törzset, és a PTA 6475 törzset kétszer hatékonyabban, mint a 6475-KO CmbA mutáns variánsát. Ezentúl a MUB-mutáns 1063N törzset tízszer kisebb mennyiségben fagocitálták az moDC-k, mint a 6475-KO mutáns törzset. 4°C-on a fagocitózis folyamata gátolható, így vizsgálható azon moDC, amelynek felszínére adherens baktériumok kötődtek ki. Ebben az esetben a vad típusú baktériumok is több moDC-hez kötődtek ki, mint a mutáns törzsek baktériumai. Ezek az eredmények tehát azt mutatják, hogy a bakteriális sejtfalon megjelenő mucint kötő fehérjék elősegítik a tejsavbaktériumok felvételét moDC-ben.

4.1.2. A *L. reuteri* felszínén megjelenő mucint kötő adhezinek módosítják az moDC által vezérelt gyulladási folyamatokat

Az élő *L. reuteri* tejsavbaktériumok moDC-t aktiváló képességét további vizsgálatoknak vetettük alá. Megvizsgáltuk miként indukálják 24 óra alatt a CD83, a CD80 és CD86 ko-stimulációs és az MHCII molekula HLA-DR sejtfelszíni megjelenését moDC-n. Eredményeink szerint valamennyi törzs képes volt az aktivációs marker CD83 sejtfelszíni megjelenítésére, ami a nyugvó sejtek csak kis százalékán jelenik meg, de jelentős csökkenést tapasztaltunk az 1063N törzs által indukált aktivációban a vad típusú variánshoz képest. A *L. reuteri* – moDC kokultúrákban szintén tapasztaltuk a CD80, CD86 és a HLA-DR molekulák sejtfelszíni növekedését és a MUB jelenléte erősebb választ mutatott a mutáns törzshöz viszonyítva.

Az moDC által termelt pro-inflammatórikus és T-limfocitákat polarizáló citokinek mennyiségét megvizsgáltuk a *L. reuteri* baktériummal való stimulációt követően. Eredményeink szerint a *L. reuteri* ATCC PTA 6475 hatékonyabban aktiválta a TNF- α termelődését, mint az ATCC 53608 törzs. A két mutáns törzs pedig kisebb mértékű TNF- α szekréciót okozott, mint a vad típusú variánsaik. A *L. reuteri* 1063N mutáns továbbá kisebb mennyiségben indukálta az IL-1 β és az IL-6 citokinek termelődését is, csakúgy mint az anti-inflammatórikus IL-10 citokinét a vad típusúhoz képest. Érdekes

módon a két vizsgált vad típusú törzs hasonló mértékben aktiválta az moDC-k immunoregulátor funkciójával bíró IL-10 termelését, míg a 6475-KO esetében a gyulladáshoz szükséges citokinek szekréciója csökkent. Ezenfelül valamennyi törzs képes volt kimutatható IL-12 és IL-23 szekréció beindítására moDC-ben. Ezen eredmények alapján kijelenthető, hogy a mucint kötő adhezinek erősítik a *L. reuteri* által kiváltott gyulladáshoz szükséges citokintermelést moDC-ben.

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a mucint kötő adhezinek hogyan befolyásolják az moDC effektor Th sejteket polarizáló képességét. Az eredmények szerint a vad típusú törzsekkel aktivált moDC-k emelték az IFN γ -t termelő T sejtek számát és polarizálták az IL-17-et termelő T-limfocitákat is. Ezzel szemben az *L. reuteri* 6475-KO és az 1063N törzsek ugyan kisebb számban, de képesek voltak Th1 típusú IFN γ termelő T sejt populációt létrehozni, de a Th17 típusú immunválasz elmaradt. Összefoglalva, az moDC által irányított T sejt válasz polarizációját meghatározzák a tejsavbaktériumok felszínén megjelenő adhezinek.

4.1.3. A MUB fehérjének a *L. reuteri* baktérium által kiváltott immunválaszt módosító képessége az moDC felszínén megjelenő DC-SIGN és Dectin-2 mintázat felismerő receptorokkal való kölcsönhatásának eredménye

A vad típusú *L. reuteri* ATCC PTA 53608 által kiváltott, fokozott gyulladáshoz szükséges molekularis háttérnek vizsgálata során megfigyeltük, hogy az immobilizált MUB fehérje képes a proinflammatorikus TNF- α és az IL-6 citokinek termelésének kiváltására az aktivációt követően 24 órával moDC-ben. Ez a hatás csökkenthető volt, ha előtte az moDC-eket neutralizáló anti-DC-SIGN vagy anti-Dectin-2 ellenanyaggal fedtük be. Az immobilizált MUB adhezin nem volt képes az IL-1 β vagy az IL-12 citokinek szekréciójának kiváltására moDC-ben.

Érdekes módon a vizsgált C-típusú lektin receptorok gátlása nem befolyásolta a hőinaktivált *L. reuteri* ATCC 53608 baktériumok fagocitózist moDC-ben. A DC-SIGN és a Dectin-2 receptorok T sejt választ befolyásoló képességének vizsgálata során élő *L. reuteri* ATCC 53608 és 1063N baktériumokat alkalmaztunk. A használt ellenanyagok neutralizálják, illetve blokkolják a receptor jelátviteli funkcióját a ligandum kötődése alatt. Az eredmények alapján az moDC-k Th1 irányú polarizációs képessége csökkent a vad típusú, MUB-ot megjelenítő *L. reuteri* baktériummal történő expozíciót követően, ha előtte blokkoltuk a DC-SIGN vagy a Dectin-2 receptorok jelátviteli képességét. Viszont nem változott az moDC által mediált Th1 irányú immunválasz mértéke a mutáns törzs esetében megfigyelt körülmények között. Összefoglalva kijelenthető, hogy az moDC Dectin-2 és a DC-SIGN lektin receptorainak kölcsönhatása a tejsavbaktériumokon megjelenő MUB adhezinnel kiemelten fontos a hatékony Th1 típusú immunválasz létrehozásához.

4.2. A kommenzális bélbaktériumok immunválaszt kialakító képességének vizsgálata retinoid környezetben és annak hiányában

Vizsgálataink során feltártuk, hogy a normál mikrobióta bizonyos tagjai közvetlen immunmoduláló képességgel bírnak, ahogy ezt a *L. reuteri* baktériumok sejtfali adhezinjeik esetében is tapasztaltuk. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a kommenzális bélbaktériumok, úgymint a *Proteobaktériumokhoz* tartozó *E. coli* *Schaedler* és a *M. morganii*, illetve a probiotikus *B. subtilis* miként váltanak ki immunválaszt moDC-ben és ezt hogyan módosítja a retinoid környezet, amelyhez hasonló folyamat játszódhat le a bélrendszerben a táplálkozás során bevitt A-vitamin esetében.

4.2.1. Különböző moDC populációkban eltérő mértékben jelennek meg a főbb transzkripciós faktorok és a CD1 glikolipid receptorok

GM-CSF, IL-4 és 1 nM ATRA jelenlétében differenciálódó két napos moDC-k emelkedett relatív mRNS expressziót mutattak a sejtmagi hormoni receptorokra nézve. A PPAR γ , a RAR α és az RXR α az ALDH1A2 gén expressziójával együtt emelkedett szintet mutatott a retinsav nélkül fejlődött moDC-hez képest. A CD1d mRNS és sejtfelszíni expresszióját az ATRA fenntartotta, míg a CD1a-t gátolta, azaz az ATRA módosítja a moDC differenciációját. Megjegyzendő, hogy a DC marker DC-SIGN és a CD11b esetében nem tapasztaltunk különbséget a két moDC populáció között.

A DC-eket nem csak a sejtfelszíni molekulák, hanem a transzkripciós faktorok alapján is azonosíthatjuk. Az általunk létrehozott *in vitro* modell rendszerben a retinsavval előkezelt moDC-k IRF4 expressziója alulmaradt a retinsav nélkül kialakultakhoz képest, azaz az moDC-k differenciációs programját meghatározza a jelenlévő retinoidok, például a retinsav jelenléte. Így két, fenotípusosan eltérő moDC populációt sikerült azonosítani a vizsgálati rendszerünkben: CD1a⁻CD103⁺CD1d⁺ moDC, mint RAR α ^{hi}IRF4^{lo} sejtek, és a CD1a^{+/+}CD103⁻CD1d⁻ moDC-eket mint RAR α ^{lo}IRF4^{hi} sejtek.

4.2.2. A kommenzális bélbaktériumok hatására a RAR α ^{lo}IRF4^{hi} moDC nagyobb hatékonysággal stimulálja a T-limfocitákat, mint a RAR α ^{hi}IRF4^{lo} sejt

A legújabb irodalmi adatok szerint az moDC által vezérelt gyulladáscsökkentő választ elsődlegesen határozhatják meg a felvett mikroba egyedi sajátosságai. A Th1 típusú választ az *Enterobaktériumok* közé sorolható *E. coli* *Schaedler* és a *M. morganii* váltotta ki, míg a Th17 és IL-10 termelő Treg típusú választ valamennyi tesztelt bakteriális törzs képes volt létrehozni. Érdekes módon az ATRA-val kondicionált moDC-k kisebb mértékben voltak képesek Th1, Th17 és Treg típusú immunválaszt kialakítani.

4.2.3. A kommenzális bélbaktériumok ATRA-függő módon módosítják a CD1 és a nyálkahártyához-asszociált molekulák sejtfelszíni megjelenését

Az általunk vizsgált bélbaktériumok közül egyedülálló módon az *E. coli* *Schaedler* tudta csökkenteni a CD1a⁺ moDC-k számát, míg a *B. subtilis* a retinsavval előkezelt sejtek felszínén lévő CD1d protein expresszióját csökkentette. A *M. organii* nem volt hatással sem a CD1a, sem a CD1d sejtfelszíni megjelenésére. Érdekes módon a retinsav emelte a nyálkahártya immunsejtjein megjelenő CD103 integrin molekula expresszióját, amely a kommenzális bélbaktériumok jelenlétében lecsökkent. Ezzel ellentétesen regulálódott a CX₃CR1 expressziója, amit retinsav önmagában nem indukált, szemben a bélbaktériumokkal, és amely hatást a retinsav viszont fokozni tudott. Összességében tehát a retinsav a nyálkahártyákban is előforduló DC populációt hoz létre, amely populációnak a lipid antigének prezentációjában szerepet játszó molekulák megjelenését tovább módosítják az élő bélbaktériumok.

4.2.4. Az moDC fagocitáló képességét a bélbaktériumok egyedi sajátosságai és a retinoid környezet együtt határozzák meg

Az moDC fagocitáló képességét is megvizsgáltuk a FITC-cel jelölt, hőinaktivált *E. coli* *Schaedler* és a *B. subtilis* baktériumok esetében, ahol 3 órás expozíciós időt alkalmaztunk a 37°C-on vagy a 4°C-on tartott humán moDC sejtenyészetek esetében. Ahogy vártuk, a hőinaktivált baktériumok felvételét a RAR α ^{hi}IRF4^{lo} sejtek szignifikánsan nagyobb hatékonysággal végezték a retinsav nélkül fejlődött sejtekhez képest. A 4°C-on inkubált moDC kultúrák esetében találtunk olyan moDC-eket, amelyek felszínére kikötődött az inaktivált baktérium, de erre az ATRA nem volt hatással. Ezen adatok összességében azt mutatják, hogy a bél eredetű, bakteriális stimuláció során az ATRA a nagyobb fagocitáló képességgel bíró CD1a⁺CD1d⁺ moDC populáció kialakulását okozza, mely során a nyálkahártyához-asszociált CD103 molekula sejtfelszíni expressziója lecsökken.

4.2.5. A RAR α ^{hi}IRF4^{lo} moDC aktivációja erősebb gyulladáshoz vezető környezetet hoz létre a RAR α ^{lo}IRF4^{hi} sejtekhez viszonyítva

A kommenzális *E. coli* *Schaedler* és a probiotikus hatású *B. subtilis* egyaránt képes volt a CD83 sejtfelszíni aktivációs molekula expressziójának emelésére, míg a CCR7 moDC-vándorlást irányító kemokin receptor sejtfelszíni intenzitása csak az *E. coli* *Schaedler* és az LPS hatására emelkedett jelentősen, amely hatást az ATRA gátolt. Ezzel a folyamattal párhuzamosan, az *E. coli* *Schaedler*, és kisebb mértékben ugyan, de a *B. subtilis* is képes volt a pro-inflammatórikus TNF- α , IL-1 β és az IL-6 citokinek szekréciójának beindítására moDC-ben, amely hatást az ATRA jelentősen fokozott.

Tehát az eddigi adatok alapján a retinsavval előkezelt moDC-k a kommenzális bélbaktériumokkal való találkozást követően aktívabb fagocitáknak bizonyulnak, amelyek kisebb CCR7-vezérelte vándorlási képességgel, de nagyobb gyulladást létrehozó potenciállal rendelkeznek,

mint az ATRA nélkül fejlődött moDC-k. Továbbá a *B. subtilis* képes gyulladásoos citokinek termelésének kiváltására, elsősorban az IL-6 esetében, de az IL-1 β és a TNF- α termelése kis mértékű mind az *E coli*-hoz, mind az LPS-hez viszonyítva.

4.2.6. Az *E. coli* Schaedler és a *B. subtilis* bélbaktériumok hatékony T sejt stimuláló moDC populációt hoznak létre, amely hatást az ATRA jelenléte korlátoz

A HLA-DR és a HLA-DQ, valamint a kostimulátor CD80, és CD86 molekulák sejt felszíni megjelenését az LPS és a tesztelt mikrobióta tagok egyaránt megemelték. A Th sejtek további polarizációjához bizonyos citokinek jelenléte is szükséges. Az immunválaszt a Th1 irányba eltoló IL-12 esetében a *B. subtilis* nem okozott citokin szekréciót, ellentétben az *E. coli Schaedlerrel* és az LPS-sel. Az IL-23 esetében az IL-12-höz hasonlóan alakult a citokintermelés, ugyanakkor a retinsav gátolta az IL-12 termelést. A retinsav fokozta az IL-23 termelést, hasonlóan a pro-inflammatórikus citokinekéhez. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a kommenzális bélbaktériumok hatékony T sejt stimuláló moDC-t hoznak létre, ahol az antigén prezentációért felelős MHCII molekulák alacsony szintű expressziója a T-sejt polarizáció csökkent hatékonyságát vonja maga után.

4.2.7. A RAR α ^{hi}IRF4^{lo} moDC által létrehozott, limitált effektor T sejt választ és a fokozott gyulladásoos környezet meggátolható a RAR α specifikus gátlása által

Kimutattuk, hogy ha a RAR α receptor ATRA-hoz való kötődését gátoljuk egy specifikus antagonistával a kialakuló moDC fenotípusosan megegyezik a csak GM-CSF és IL-4 jelenlétében fejlődött moDC-vel. Az antagonista önmagában nem befolyásolta az moDC differenciációját. Ezenkívül az ATRA által létrehozott, és emelkedett gyulladásoos potenciállal bíró moDC populáció kialakulása is megelőzhető a RAR α gátlásával. Így a TNF- α , az IL-1 β , az IL-6 és az IL-23 citokinek koncentrációja azonos szintre került vissza azon moDC tenyészetek felülúszójában mért citokinek koncentrációjával, amelyek a retinsav hiányában differenciálódtak.

Eredményeink szerint a RAR α működése az moDC immunogenitását is befolyásolja, de ennek pontos molekuláris háttere nem tisztázott egyelőre. Ma már azonban ismert, hogy az IRF4 transzkripciós faktor pozitívan szabályozza az MHCII gének transzkripcióját és fokozza a DC immunogenitását, azaz hatékony T sejt aktiváló képességgel bírnak az IRF4 fehérjét magas szinten expresszáló DC-k. Az általunk vizsgált modellben az moDC-k magasabb szinten jelenítik meg az IRF4 fehérjét retinsav hiányában, és ezt a szintet az MHCII-vel párhuzamosan a bélbaktériumok fokozták. Ugyanakkor a retinsav csökkenti mind mRNS mind fehérje szinten is az IRF4 expresszióját. Feltételezhetjük, hogy az moDC gyulladásoos és immunogén sajátosságait az IRF4 és a RAR α transzkripciós faktorok együttműködése határozhatja meg, amelyek működését viszont az érő moDC mikrokozonyzetében lévő lipidek illetve retinoidok befolyásolnak.

5. MEGBESZÉLÉS

Jelen tanulmány során annak vizsgálatát tűztük ki célul, hogy milyen molekuláris kölcsönhatások irányítják a normál mikrobióta tagok által aktivált és moDC által vezérelt T sejt immunválaszt. A humán bélrendszerben élő mikrobióta egy rendkívül heterogén mikrobiális közösséget alkot, amelynek összetétele egyénre szabott jellemzőket is mutat. Részt vesz az immunrendszer helyes fejlődésében és meggátolja a patogén mikrobák kolonizációját és a betegségek kialakulását. Továbbá egyes immunomodulátor fajok, illetve törzsek képesek megváltoztatni a nyálkahártyában lévő rezidens effektor és Treg sejtek összetételét. A patogén fajok által beindított immunválasz már jól ismert a szakirodalomban, de hogy a normál mikrobióta tagok milyen különbséget mutathatnak és ezen különbségek milyen okokból fakadnak még egyelőre kevésbé ismert. Ezen probléma mentén haladva megvizsgáltuk, hogy a különböző módon differenciálódott monocita-eredetű dendritikus sejtek (moDC) hogyan reagálnak a különböző bélbaktérium fajokra, név szerint a kommenzális *E. coli*, *M. morgani*, a probiotikus *L. reuteri* és *B. subtilis* fajokra, és hogy ezt a választ miként befolyásolják a bélbaktériumok egyedi sajátosságai, például az adhéziós fehérjék jelenléte, illetve a retinoid tartalmú mikrokörnyezet.

A probiotikus hatású tejsavbaktériumok a normál mikrobióta tagjainak tekintendők és számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Meggátolják a patogén mikrobák kolonizációját és elszaporodását antimikrobiális anyagok termelésén keresztül, segítik a nyálkahártya épségének fenntartását és számos kísérleti modell szerint csökkentik a krónikus bélgyulladás tüneteit a gyulladásszerű és regulatórikus citokinek termelésének szabályozása által. A tejsavbaktériumok heterogén populációt alkotnak, ahol az egyes tagok más és más immunmoduláló hatással bírnak. Ezen hatások lehetnek közvetlenek, azaz az antimikrobiális anyagok, pl. a reuterin vagy a tejsav termelésén keresztül gátolják a patogén szaporodását, vagy közvetettek, ahol a termelt anyagcseretermékek pl. a SCFA segíti a Treg sejtek fejlődését. A *L. reuteri* 6475 és az ATCC PTA 5289 törzsek csökkentik az LPS által kiváltott gyulladásszerű TNF- α termelődését monocita-eredetű sejtekben, ellenben a *L. reuteri* ATCC 55730 és a CF48-3A törzsek immunválaszt stimuláló hatással bírnak. A pro-inflammatórikus citokinek szekréciójának csökkenését Crohn-beteg gyermekekből származó monocita-eredetű makrofágokban is észlelték miután *L. reuteri* ATCC PTA 6475 törzsszel aktiválták őket. A *L. reuteri* DSM 12246 törzs pedig az IL-12, TNF- α és IL-6 citokinek termelését kis mértékben tudja kiváltani csontvelő eredetű DC-ben. A tejsavbaktériumok, köztük az *L. reuteri* esetében is a sejtfalon megjelenő és szolubilis formában is termelődő exopoliszacharidok szintén közvetett immunmoduláló hatással bírnak, de hogy ezek a bakteriális eredetű molekulák hogyan hatnak kölcsön a professzionális antigén prezentáló sejtekkel, még egyelőre nem tisztázott.

Az eredmények alapján állítható, hogy a bakteriális adhezinek, amelyek gazdaszervezetre specifikusan jelennek meg a tejsavbaktériumokon, részt vesznek a *L. reuteri* ATCC PTA 6475 és az

ATCC 53608 törzsek immunválaszt módosító hatásában, miközben emelik a baktérium adhéziós képességét és az moDC általi fagocitózisukat, fokozzák a pro-inflammatórikus citokinek szekrécióját és egyszerre biztosítanak Th1 és Th17 típusú immunválaszt az adhezint hordozó *L. reuteri* baktérium ellen. Mindkét adhezint hordozó vad típusú törzs aktiválta az moDC-eket, de törzsspecifikus különbségek is észrevehetőek. A TNF- α szekrécióját elsősorban a CmbA adhezint megjelenítő PTA 6475 törzs váltotta ki, míg a MUB-ot expresszáló ATCC 53608 törzs az IL-1 β és az IL-6 termelődést okozta leginkább az moDC-ben. Tehát következésképpen az egyes törzsspecifikus eltérések nagyban befolyásolják a mikroba ellen kialakuló gyulladásos válasz kimenetelét, és a *L. reuteri* baktériumok immunogenitását fokozzák a felszínükön jelen lévő és a C-típusú lektin receptorokkal (CLR) kölcsönható adhezin fehérjék.

A CLR-ok a PRR-ok egy családját alkotják, amelyek különféle endogén és exogén ligandumokkal rendelkeznek. Ezen ligandumok származhatnak a gazdaszervezetből, tumoros sejtekből vagy patogénekből. Bemutattuk, hogy a bakteriális sejtfall eredetű MUB adhezin oldott és immobilizált formában is képes kiváltani a gyulladásos citokinek termelődését moDC-ben. Ezentúl a TNF- α és az IL-6 szekréciója gátolható, ha a MUB és a DC-SIGN vagy a Dectin-2 közötti kölcsönhatás blokkoló antitestekkel meggátoljuk. A CLR molekulák és a MUB közötti erős kölcsönhatás magyarázza, hogy a *L. reuteri* ATCC 53608 miért indukál erősebb Th1 választ.

A DC-SIGN receptor a DC-n keresztül toleranciát biztosít számos tejsavbaktériummal szemben, pl. a *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri* és a *L. casei* esetében is. Érdekes módon a tejsavbaktériumok felszínén megjelenő fehérjék, úgymint az *L. rhamnosus* pilusai és a *L. acidophilus* S-rétegű proteinjei kölcsönhatnak a DC-SIGN receptorral. A *L. rhamnosus* baktériumból származó, tisztított SpCBA pilusok szénhidrát komponenseit köti meg a DC-SIGN a TLR-2-vel kollaborációban és így indukálja az IL-6, IL-10 és IL-12 citokinek expresszióját DC-ben. Eredményeink szerint a Dectin-2 szintén részt vesz a MUB által aktivált gyulladásos folyamatokban.

Jelenlegi tudásunk szerint a Dectin-2-ről eddig még nem bizonyosodott be, hogy részt vesz a tejsavbaktériumok által indukált immunválasz módosításában. Korábbi, gomba patogénekkal való vizsgálatok során kiderült, hogy a Dectin-2 felelős az IL-23 és IL-1 β citokinek termelődésének beindításáért és a Th17 típusú T-limfocita polarizáció kialakításáért. Az *L. reuteri* 1063N mutáns variáns kevésbé volt hatékony az IL-1 β szekréció kiváltásában, de az IL-23 koncentrációk között nem találtunk eltérést a vad típusú és mutáns *L. reuteri* törzs esetében. A Dectin-2 és a MUB kölcsönhatásának gátlása szintén gátolta az IL-6 szekréciójának beindítását, tehát az IL-6 potenciális tényező lehet az *L. reuteri* által indukált Th17 típusú immunválasz kialakulásában.

Bemutattuk, hogy a *L. reuteri* ATCC PTA 6475 és az ATCC 53608 törzsek moDC-ben beindítják a gyulladásos citokinek termelését, a kostimulációs molekulák sejt felszíni expresszióját és a Th1 és Th17 irányú polarizációt. Az eddigi eredmények szerint, két magyarázattal tudunk szolgálni a fentebb tárgyalt eredmények *in vivo* relevanciáját illetően.

- 1) Állandó környezeti feltételek mellett lehetséges, hogy a korlátozottan létrejövő, fiziológiás gyulladás szükségszerű az immunológiai memória kialakításához és a nempatogén/kommenzális bélbaktériumok elleni tolerogén immunválasz kialakításához, amely irányítható a baktériumok számának kordában tartásával és/vagy a mucint kötő adhezinek segítségével, amelyek a CLR-ok által megkönnyítik a DC-k általi felvételüket.
- 2) Másrészt a mucint kötő adhezinek stabilan a nyálkahártyán tartják a tejsavbaktériumokat, így kevésbé elérhetők a bélhámban vagy a bélhám alatt található fagocita sejtek számára, és nem képesek gyulladásos válasz kiváltására a nyálkahártyában. Ha a nyálkahártya integritása sérül, a tejsavbaktériumok kölcsönhatásba léphetnek a környező DC-kkel és a CLR-oon keresztül emelkedett gyulladásos választ váltanak ki. Így ez az esemény a gazdszervezet számára biztosíthatja a jelet a barrier funkciók zavaráról.

Összefoglalva, a *L. reuteri* baktériumok immunmoduláló képességgel rendelkeznek, amelyet az moDC felszínén megjelenő C-típusú lektin receptorokkal való direkt kölcsönhatása során fejtenek ki. A *L. reuteri* baktériumon megjelenő mucint kötő adhezinek mintegy természetes adjuvánsként fokozzák az antigén-specifikus immunválasz mértékét és elősegítik a kellő mennyiségű effektor és memória T sejt populációk kialakulását az moDC által.

Kísérleteink során szintén kimutattuk, hogy az moDC differenciációját és funkcióit módosíthatják a jelenlévő retinoidok, pl. a retinsav (ATRA) fiziológiásan releváns koncentrációban alkalmazva. Az ATRA hatását azonban a RAR α receptor specifikus gátlásával el lehet kerülni. A retinoidokban gazdag mikro környezet a nyálkahártya antigén prezentáló sejtjeire jellemző CD103 integrin molekula expresszióját fokozza, míg a lipid antigének prezentációjában szerepet játszó CD1d fennmarad és a CD1a gátlódik.

Elsőként hasonlítottuk össze az moDC differenciációért felelős transzkripciós faktorok, úgymint az IRF4, PPAR γ és RAR α gének expressziós szintjét. Eredményeink szerint az IRF4 proteint magasan expresszáló moDC-k nagyobb hatékonysággal voltak képesek Th1, Th17 és Treg választ kialakítani, mint azok az moDC-k, amelyek kisebb mértékben jelentik meg az IRF4 proteint, tehát az IRF4 molekula jelenléte és aktivitása növeli az moDC immunogenitását. A mikrobióta tagok által stimulált RAR α ^{hi}PPAR γ ^{hi}IRF4^{lo} moDC-ben csökkent a T-sejtet stimuláló képesség, mindamelllett, hogy ezek sejtek magasabb gyulladást kialakító potenciállal rendelkeztek. Korábbi eredmények szerint a PPAR γ -t magasan expresszáló, CD1d⁺ moDC-k tolerogén tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezen eredmények összességében azt mutatják, hogy a DC immunogén, tolerogén és gyulladásos kapacitását nagyban befolyásolja a DC fejlődésének aktuális mikro környezete és ezen tulajdonságok szorosan köthetők az IRF4 működéséhez. Csontvelői eredetű DC-ben kimutatták, hogy az Irf4 deficienciája csökkent Treg választ eredményez a tolerogén tulajdonságokért felelős PD-L2 és RALDH2 enzimek csökkent expressziója mellett, ugyanakkor a T sejt stimulációhoz

nélkülözhetetlen MHCII molekulák expressziója is csökkent LPS-sel való aktivációt követően. Ezen molekuláris események mellett a TNF- α és IL-12 génexpressziós növekedése történik BM-DC-ben.

Bemutattuk, hogy az ATRA felgyorsítja az moDC *E. coli* *Schaedler* és *B. subtilis* baktériumokat fagocitáló képességét. Korábbi kutatások szerint a megnövekedett PPAR γ expresszió és aktivitás korrelált az moDC antigént internalizáló képességével. Ezenfelül azt is bemutattuk, hogy ezen aktívan fagocitáló, CD1d⁺ moDC-k a mikrobióta tagok jelenlétében megemelik a CX₃CR1 kemokin receptor sejtfelszíni megjelenését is, amely sejtpopuláció hasonló funkciót és fenotípust mutatott a nyálkahártya CD11b⁺CX₃CR1⁺CD103⁻ mieloid eredetű mononukleáris fagocitárhoz viszonyítva. A vizsgálataink során kimutattott CD1d⁺CX₃CR1⁺CD11b⁺ moDC-k által is termelt gyulladásozó citokineknek, köztük az IL-23-nak kiemelt szerepe van a nyálkahártya egészségnek fenntartásában és egyszerűsített a patológiás folyamatokban is. Például a krónikus bélgyulladás (*inflammatory bowel disease*, IBD) esetében a mikrobióta által beindított, megnövekedett IL-23 termelődést tapasztaltak. Ugyanakkor a mikrobióta egyes tagjai normál körülmények között a *lamina propriában* található CX₃CR1⁺ és CD11b⁺CD103⁺ DC sejteken keresztül szintén IL-23 szekréciót vált ki, amely fokozza a bélhám épségének megőrzéséhez és visszaállításához nélkülözhetetlen IL-22 szekréciót az ILC (*innate lymphoid cells*) sejtekben.

Az élő bélbaktériumok jelenlétében az ATRA jelentősen megnövelte a Th17 irányba polarizáló moDC-eredetű citokinek mennyiségét, habár a Th17 sejt kialakító képessége ezen moDC-nek csökkent. Ez a megfigyelés összhangban áll korábbi eredményeinkkel, miszerint a retinsavval előkezelt, és retinsavat termelő vastagbél hámszejtjei által kondicionált moDC csökkenti CCR7-függő vándorlási és Th17 sejtet polarizáló képességét. Érdekes módon, az egér szervezetben alapuló differenciációs modellek szerint az IRF4 transzkripciós faktornak és az IL-6 citokinnek kiemelt szerepe van a CD11b⁺CD103⁺ DC Th17 polarizáló képességében, amely DC populáció működésében megegyezik a humán CD103⁺SIRP α^{hi} DC populációval.

Megállapítottuk, hogy a retinoid környezet megemeli a RAR α mRNS relatív expressziós szintjét, miközben a RAR β izoforma expressziója nem aktív és nem is indukálható az moDC fejlődése során. Tehát az ATRA okozta fenotípusos és funkcionális eltéréseket a RAR α specifikus gátlásával, egy természetes antagonistával lehet megelőzni. Kimutatták, hogy a mikrobióta tagok képesek befolyásolni a retinoidok által indukált jelátviteli mechanizmusokat a kommenzális bélbaktériumok által termelt SCFA, például a vajsav által. Sőt, a táplálkozás során bevitt A-vitamin szintén hat a mikrobióta közösség összetételére és így közvetve a gazdaszervezet energia-metabolizmusára és annak hatékonyságára. Az A-vitamin hiány, illetve A-vitamin deficiencia esetén a *Firmicutes* és *Proteobaktériumok* száma csökken az immunsejtekben expresszálandó Myd88 és TRIF-függő módon. Crohn-betegségben szenvedő gyermekek esetében pedig megállapították, hogy a mikrobióta közösség növeli a CD14⁺ makrofágok retinsav szintézisét a RALDH1 enzim működésén keresztül, amely gyulladásozó fenotípust a RAR α határoz meg. Ezen betegekben azt is feljegyezték, hogy a

CD103⁺ és CD103⁻ DC-k az ALDH1A2 (RALDH2-öt kódoló gén) expressziós szintje emelkedett volt. A retinoidok növelik az immunrendszer antitumor immunválasztát a mikrobióta által indukált vastagbélrák esetében, mivel a RAR α -vezérelt MHCI megjelenése növekszik és ezzel emeli a citotoxikus T-limfociták tumoros sejtet ölő hatékonyságát.

Konklúzióként tehát kijelenthetjük, hogy az általunk kifejlesztett, nagy érzékenységgű humán moDC-alapú *in vitro* kísérleti rendszer alkalmas a normál mikrobióta tagok által kiváltott immunválasz karakterizálására. Továbbá az A-vitamin származéka, az all-*transz* retinsav jelenléte a RAR α receptortól függően módosítja a differenciálódó dendritikus sejtek fejlődését és funkcióit, úgymint a sejtek fagocitáló, gyulladást kialakító, T-limfocitákat stimuláló és polarizáló képességét. Így a kommenzális bélbaktériumok a retinoid környezetben lévő moDC által gyulladós, de tolerogén immunválaszt alakítanak ki.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A táplálkozás során bevitt tápanyagok és a kommenzális bélbaktériumok meghatározó szereppel bírnak a nyálkahártyában zajló és a szisztémás immunológiai folyamatokra, úgymint a specializált dendritikus sejt (DC) és segítő T-limfocita populációk kialakulására, a kostimulátor molekulák megjelenítésére és a citokinek illetve a kemokinek termelésére. A DC funkcionális elemzése során ezeket a sejtéletani mechanizmusokat nyomon követhetjük, amelyek kimenete szorosan összefügg a sejtfejlődés aktuális állapotától és a mikrobák által létrehozott gyulladásos jelátviteli pályák aktiváltsági szintjétől. Célunk olyan érzékeny *in vitro* rendszer kialakítása volt, amely alkalmas a mikrobióta és a humán immunrendszer alkotói közötti kölcsönhatások megfigyelésére.

A *Lactobacillus reuteri* tejsavbaktériumok a bél mikrobióta közösség előnyös tagjai közé tartoznak, amelyek evolúciósan alkalmazkodtak a gerincesek bélrendszeréhez a nyálkahártyát kötő adhezinjek segítségével. Eredményeink szerint, nem várt módon a *L. reuteri* baktériumok monocitaredetű (mo) DC-vezérelt gyulladásos T sejt választ indítottak be, amelyet a bakteriális mucint kötő fehérjék, a CmbA és a MUB tovább fokozott. Ezenfelül bizonyítást nyert, hogy a C-típusú lektin receptorok és a bakteriális MUB adhezin kölcsönhatásának gátlása csökkenti moDC-ben a gyulladásos citokinek termelését és az moDC által irányított immunválasz Th1 irányú polarizációját. A MUB, mint természetes adjuváns hozzájárul és erősíti a két szervezet közötti szimbiotikus kapcsolat fenntartását és fokozza a szervezet moDC-vezérelt, előnyös mikrobák által kiváltott effektor immunválaszát és immunológiai memóriát kialakító képességét.

További megfigyelésünk szerint a fiziológiásan releváns koncentrációjú A-vitamin származék, az *all-transz* retinsav (ATRA) $RAR\alpha$ -függő módon irányítja a tolerogén $CD1a^+CD1d^+CD103^+/RAR\alpha^{hi}IRF4^{lo}$ moDC differenciációját, míg ATRA hiányában a monociták $CD1a^{med}CD1d^+CD103^+/RAR\alpha^{lo}IRF4^{hi}$ DC-vé fejlődnek. Az *E. coli* *Schaedler* és a *M. morgani* kommenzális bélbaktériumok az immunogén $RAR\alpha^{lo}IRF4^{hi}$ moDC által Th1 és Th17 típusú immunválaszt polarizálnak, míg a probiotikus hatású *B. subtilis* jelenlétében a Th1 válasz elmarad. Továbbá megállapítottuk, hogy a $RAR\alpha^{hi}IRF4^{lo}$ sejtek egy nem-vándorló, de ezzel együtt egy tolerogén és gyulladásos DC alpopulációt alkotnak.

Összefoglalva, a bél mikrobióta tagok által kiváltott, moDC-vezérelt adaptív immunválasz erősíthető mucint kötő adhezinekkel, mint természetes adjuvánsokkal, valamint a nyálkahártyákra jellemző retinoid környezetben a $RAR\alpha$ specifikus gátlásával.

7. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/96/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bene Krisztián
Neptun kód: NP2LRX
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10055079

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bene, K.**, Varga, Z., Petrov, V. O., Boyko, N. V., Rajnavölgyi, É.: Gut Microbiota Species Can Provoke both Inflammatory and Tolerogenic Immune Responses in Human Dendritic Cells Mediated by Retinoic Acid Receptor Alpha Ligation.
Front. Immunol. 8 (427), 1-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00427>
IF: 5.695 (2015)
2. **Bene, K.**, Kavanaugh, D. W., Leclaire, C., Gunning, A. P., MacKenzie, D. A., Wittmann, A., Young, I. D., Kawasaki, N., Rajnavölgyi, É., Juge, N.: Lactobacillus reuteri Surface Mucus Adhesins Upregulate Inflammatory Responses Through Interactions With Innate C-Type Lectin Receptors.
Front. Microbiol. 8, 321, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00321>
IF: 4.165 (2015)





További közlemények

3. Pethő, Z., Balajthy, A., Bartók, Á., **Bene, K.**, Somodi, S., Szilágyi, O., Rajnavölgyi, É., Panyi, G., Varga, Z.: The anti-proliferative effect of cation channel blockers in T lymphocytes depends on the strength of mitogenic stimulation.
Immunol. Lett. 171, 60-69, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.02.003>
IF: 2.483 (2015)
4. Szabó, A., **Bene, K.**, Gogolák, P., Réthi, B., Lányi, Á., Jankovics, I., Dezső, B., Rajnavölgyi, É.: RLR-mediated production of interferon-beta by a human dendritic cell subset and its role in virus-specific immunity.
J. Leukoc. Biol. 92 (1), 159-169, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0711360>
IF: 4.568

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,911

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,86

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.04.26.



FONTOSABB SZÓBELI ELŐADÁSOK

Krisztián Bene, Davon Kavanaugh, Nathalie Juge, Éva Rajnavölgyi: The human dendritic cell-mediated inflammatory response is initiated by the molecular interaction between mucus adhesins and C-type lectin receptors. *10th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 07-08. January 2017.*

Krisztián Bene, Varga, Zs., Boyko, N., Rajnavölgyi, E.: The human dendritic cell-mediated inflammation and T-lymphocyte polarization are modulated via the specific ligation of retinoic-receptor alpha. *3rd Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology, Budapest, 01-03. December 2016.*

Krisztián Bene, Boyko, N., Rajnavölgyi, E.: Human intestinal dendritic cells dictate inflammation and T-cell polarization. *42th Symposium of Hungarian Society for Immunology, Pécs, Hungary, 15-18. October, 2013.*

Krisztián Bene, Boyko, N., Rajnavölgyi, E.: Regulation of inflammatory responses in human intestinal monocyte-derived dendritic cells. *IL-1 mediated inflammation and diabetes, Nijmegen, The Netherlands, 10-11. October 2013.*

Krisztián Bene, Gregus, A., Debreceni, Z., Boyko, N., Rajnavölgyi, E.: The response of human monocyte-derived dendritic cells to selected microbes in the presence of retinoic acid. *TORNADO Meeting, Stockholm, Sweden, 31. August-02. September 2012.*

FONTOSABB POSZTER ELŐADÁSOK

Krisztián Bene, Davon Kavanaugh, Sabrina Etzold, Nathalie Juge, Éva Rajnavölgyi: Mucus-binding proteins expressed by *Lactobacilli* initiate human dendritic cell-mediated inflammatory response and autologous T-cell polarization *in vitro*. *The 2nd Microbiome R&D and Business Collaboration Forum: Europe, London, May 7-8, 2015*.

Krisztián Bene, Boyko, N., Rajnavölgyi, E.: Regulation of inflammatory responses to commensal bacteria by human monocyte-derived dendritic cells. *13th International Symposium on Dendritic Cells, Tours, France, 14-18, September 2014*.

Krisztián Bene, Nadiya Boyko, Éva Rajnavölgyi: Dendritic cell-mediated T-cell polarization in the gut. *11th International Conference on Innate Immunity, Olympia, Greece, 01-06, June 2014*.

Krisztián Bene, Nadiya Boyko, Éva Rajnavölgyi: Human monocyte-derived dendritic cell-mediated inflammation in the gut microenvironment. *Semmelweis Symposium, Budapest, Hungary, 07-09, November 2013*.

Krisztián Bene, Márta Tóth, Nadiya Boyko, Éva Rajnavölgyi: Characterization of commensal bacteria based on their effects on human dendritic cell-induced T-lymphocyte polarization. *15th International Congress of Immunology, Milan, Italy, 22-27, August 2013*.

Krisztián Bene, Nadiya Boyko, Éva Rajnavölgyi: Development and regulation of inflammatory responses in human intestinal monocyte-derived dendritic cells. *8th ENII Summer School, Alghero, Italy, 27, May- 03, June 2013*.

Krisztián Bene, Andrea Gregus, Zsuzsanna Debreceni, Nadiya Boyko, Éva Rajnavölgyi: The effects of commensal bacteria on human dendritic cell differentiation and activation. *International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics, Kosice, Slovakia, 12-14, June 2012*.

8. KULCSSZAVAK

Dendritikus sejt, gyulladás, T-limfocita, mikrobióta, RAR α , all-*transz* retinsav, C-típusú lektin receptorok, mucint kötő adhezinek, *Lactobacillus reuteri*, *Escherichia coli* *Schaedler*, *Morganella morganii*, *Bacillus subtilis*.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném megköszönni azoknak az embereknek a támogatását, akik végigkísértek az életem ezen fontos és izgalmas periódusán.

Először is hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Rajnavölgyi Évának, aki folyamatosan támogatott az alap-, mester-, doktori és doktorjelölti képzésem során. Ötleletim megvalósítását mindig lelkesen támogatta és segítette a közös munka tudományos módon való végrehajtását. Segítségével és támogatásával számos rangos nemzetközi konferencián, illetve nyári iskolán vehettem részt, ahol alkalmam volt tovább növelni ismereteimet a biológia, az immunológia és tágabb értelemben a molekuláris orvostudományok területén, illetve lehetőségem volt több nagyszerű tudományos vitában is részt venni.

Külön köszönettel tartozom Dr. Szabó Attilának, aki bevezetett a precíz laboratóriumi munka világába és mentoromként mindent megtett a tudományos munkám elősegítéséért.

Különösen köszönettel tartozom Prof. Dr. Bíró Tamásnak, aki folyamatosan segítette doktori tanulmányaim befejezését és építő jellegű kritikáival támogatta a minél színvonalasabb tudományos tevékenységem elvégzését.

A Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetének *valamennyi* dolgozója részére hálával tartozom, beleértve az oktatásért és az adminisztrációért felelős munkatársakat csakúgy, mint a laboratóriumi asszisztenciának, akik mindig készséggel álltak rendelkezésemre és professzionális módon segítettek munkámat. Hálás köszönettel tartozom kiváló tanítványaimnak, Varga Zsófiának (Biológus BSc, Molekuláris biológus MSc), Al-Taani Szábitnak (Általános orvostanhallgató) és Szemere Zsuzsának (Biológus BSc), hogy részt vettek tudományos munkásságomban és alkalmam nyílt átadni az eddig megszerzett tapasztalatot, tudást.

Szerencsés módon olyan munkahelyi környezetben dolgozhattam, ahol lehetőségem volt izgalmas tudományos és a minket körülvevő világról vitát folytatni dr. Agod Zsófia, Dr. Fekete Tünde, Dr. Pázmándi Kitti, Tóth Márta és Türk-Mázló Anett társaságában. Ezenkívül ez a köszönetnyilvánítás nem lenne teljes, ha nem mondanék köszönetet kedves barátaimnak, akik mindig érdeklődéssel követték eddigi munkásságom és támogattak a jó és kevésbé kedvező időkben egyaránt. Külön köszönöm Dr. Szabó Krisztinának, jóbarátomnak és kollégámnak, hogy mindvégig támogatott ezen időszakban.

S végül, de nem utolsó sorban őszinte hálával tartozom családomnak, különösen édesanyámnak, Zsuzsának, és testvéremnek, Szabinának, hogy egyetemi és doktori tanulmányaim alatt mindvégig önzetlenül támogatták szakmai előmenetelem.

A tudományos mű elkészítését és a kutatást a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. Továbbá a kutatás a TORNADO FP7-KBBE-2007-2A, a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 és a TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0023 projektek segítségével, az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap és az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.