

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A magreceptorok hatása
a dendritikus sejtek differenciálódására és működésére**
A calcitriol és az immunfunkcióhoz
köthető gének szabályozása dendritikus sejtekben

Széles Lajos

Témavezető: Prof. Nagy László



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI
DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2009

BEVEZETÉS

A dendritikus sejtek

A dendritikus sejtek antigén-bemutató és T-sejt aktiváló képességük miatt alapvető szerepet játszanak az immunrendszerben. A dendritikus sejtek heterogén populációt alkotnak, ahol az egyes típusok jelentős különbségeket mutatnak lokalizáció és funkció tekintetében. Ugyanaz a dendritikus sejtípus különböző immunválaszokat válthat ki, annak a függvényében, hogy milyen környezeti ingerek érik, illetve, hogy milyen patogénnel került érintkezésbe. Az ún. éretlen dendritikus sejtek a test felszíni rétegeiben (pl. bőr, garat, nyelőcső felső szakasza, végbél) illetve a légző- és emésztőrendszer nyálkahártyájában találhatóak. Ezeken a helyeken az éretlen dendritikus sejtek különböző mechanizmusokkal képesek felvenni azokat az antigéneket, amelyek egyaránt származhatnak patogénekből és elhaló sejtekből. Az antigén felvétel, egyéb szignálok (pl. gyulladási citokinek) jelenlétében a dendritikus sejtek éréséhez vezet. Maga az érés egy összetett folyamat, amely során a dendritikus sejtek elveszítik antigén felvevő képességüket, nyirokcsomókba vándorolnak, és képessé válnak a feldolgozott antigének bemutatására és a T-sejtek aktiválására. A T-sejt aktiválás és a segítő T-sejt polarizáció (Th1/Th2) elsősorban 3-féle dendritikus sejtől származó szignál függvénye. Az 1. szignál a T-sejt receptort aktiváló antigén-MHC-II komplex. A 2. szignál a T-sejtek CD28 molekulájával kapcsolódó, CD80 és CD86 molekulák megerősítő jele. A 3. szignált oldékony vagy membránhoz kötött molekulák jelentik, amelyek polarizációs szignálként foghatóak fel (pl. IL-12 (Th1 polarizáció) és CCL2 (Th2 polarizáció)). A dendritikus sejtek CD1 molekulákon glikolipideket is képesek bemutatni, míg a MHC-I-en keresztül endogén vagy exogén antigének bemutatásával CD8+ citotoxikus T-sejteket aktiválnak. A hatékony immunválaszt kiváltó ún. immunogén dendritikus mellett megkülönböztetünk tolerogén dendritikus sejteket is, amelyek az immunválaszok csendesítésében vesznek részt. A tolerogén dendritikus sejtek és a T-sejtek kölcsönhatása a T-sejtek apoptózisában, T-sejt inaktiválásában vagy regulatorikus T-sejtek (Treg) aktiválásában nyilvánul meg. A dendritikus sejtek potenciális terápiás felhasználása így magában foglal olyan betegségeket, ahol az immunválaszok erősítése a cél (pl. daganatos megbetegedések és patogének elleni védelem), illetve ahol az immunválaszok gyengítésére van szükség (pl. allergia, transzplantáció és autoimmun betegségek).

A magreceptorok

Az elmúlt évtizedben nagyszámú publikáció igazolta, hogy a magreceptorok nemcsak a limfociták és makrofágok, hanem a dendritikus sejtek működését is képesek befolyásolni. A magreceptorok lipidoldékony molekulák által aktivált transzkripciósfaktorok. Az aktiváló ligandok lehetnek zsírsavak, koleszterol, szteroidok és zsíroldékony vitaminok. Többek között az ösztrogén receptor, a glükokortikoid receptor, a retinsav receptor és a D-vitamin receptor tartozik ebbe a családba. Az emberi genomban 48 magreceptort kódoló gén található. Több magreceptor ligandját már jóval a receptor azonosítása előtt ismertek, mint pl. a glükokortikoidot és ösztrogént. Érdekes módon, egész sor magreceptor esetében viszont előbb klónozták a receptort, és aztán azonosították az aktiváló ligandot (un. „fordított endokrinológia”). A magreceptorok fontos szerepet játszanak számos biológiai folyamatban. Néhány receptor kulcsfontosságú bizonyos sejttípusok fejlődéséhez, illetve anyagcsere-útvonalak szabályozásában. A nemi hormonok nélkülözhetetlenek a nemi jelleg kialakulásához, a női nemi hormonok pl. szabályozzák a menstruációs ciklust, míg a tesztoszteronnak jelentős anabolikus hatása is van. A D-vitamin elengedhetetlen a kalcium és a foszfor hatékony felszívódásához és a csontképződés folyamatához, míg a PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor) az adipociták fejlődéséhez szükséges. Számos tanulmány igazolta, hogy ezek mellett a „klasszikus”-nak nevezhető funkciók mellett a magreceptorok számos immunsejt funkcióinak szabályozásában is részt vesznek. Kutatócsoportunk azt tanulmányozza, hogy milyen szerepet játszanak magreceptorok dendritikus sejtekben. Kísérleteink során elsősorban VDR (vitamin D receptor), LXR (liver X receptor), PPAR és RXR (retinoid X receptor) szerepét vizsgáljuk.

A magreceptorok szerepe a dendritikus sejtek funkcióinak szabályozásában

A kísérletek során receptor-specifikus, nagy affinitású agonisták használatával sikerült igazolni, hogy ezek a receptorok a dendritikus sejtek sejt felszíni markereit, citokin és kemokin termelését, antigén felvevő és bemutató, illetve a T-sejt aktiváló képességét szabályozzák. Kutatócsoportunk a VDR és a RAR mellett a PPAR, az LXR és az RXR által szabályozott célgéneket, útvonalakat és funkciókat tanulmányozza, elsősorban monocita-eredetű és vérből izolált mieloid dendritikus sejteken. Ezeknek a

receptoroknak a biológiai jelentőségét alátámasztották azok a vizsgálatok, melyek kimutatták, hogy a dendritikus sejtek nemcsak érzékenyek a magreceptor ligandokra, hanem képesek ezeket (elsősorban a kalcitriolt, a retinsavat és a kortizolt) szintetizálni is különböző előalakokból. Az így szintetizált ligandok valószínűleg részt vesznek nemcsak a sejtek autokrin szabályozásában, hanem parakrin módon is hatnak. Ennek fontos következményét a retinsav és a kalcitriol (1,25-dihidroxi-kolekalciferol vagy 1,25-dihydroxyvitamin D₃, továbbiakban 1,25-vitD) esetében írták le, amelyek szabályozzák azt, hogy a T-sejtek milyen kemokin-receptorokat és integrineket fejeznek ki, így nagy szerepük van a T-sejtek vándorlásában, az un. “homing”-ban.

Érdekes módon a magreceptorok sok esetben hasonló funkciókat szabályoznak. Ilyenek a különböző dendritikus sejt markerek (pl. a CD1A le- és a CD14 felregulálása), az antigén felvétel növelése és a T-sejt aktiváló képesség csökkentése. A microarray kísérleteink továbbá azt is megmutatták, hogy nemcsak funkcionális változásokban van jelentős hasonlóság, hanem a szabályozott célgénekben is. A munkacsoportunk korábbi vizsgálataira arra kerestek (és találtak) választ, hogy hogyan képes a PPAR γ számos RAR célgént szabályozni. Erre magyarázatul az szolgált, hogy a PPAR γ képes retinsav szintézist indukálni az abban szerepet játszó enzimek szabályozása révén. Jelenleg azt vizsgáljuk, hogy miért tapasztalható jelentős átfedés a RAR és VDR célgénjei között. Ennek ismertetése a kísérleti rész megbeszélésénél térünk ki. A VDR más szempontból is érdekesnek bizonyult, ezért részletesen tanulmányoztuk a 1,25-vitD hatását a differenciálódó monocita-eredetű dendritikus sejtekben.

A 1,25-vitD szerepe az immunrendszerben, különös tekintettel a dendritikus sejtekre

A 1,25-vitD immunsejtekre gyakorolt hatása több mint húsz éve ismert. A 1,25-vitD gátolja a T-sejtek proliferációját, IL-2 és IFN γ termelését illetve a CD8+ T-sejt mediált citotoxicitást. Ezzel szemben az IL-4 termelést fokozza. Összességben elmondható, hogy a Th1 és Th17 aktivitását gátolja, míg a Th2 és a Treg általi válaszokat elősegíti a 1,25-vitD. A B-sejtek proliferációját és a plazmasejtek differenciálódását, valamint az IgG szekréciót szintén gátolja. Érdekes módon, a monocitákban és makrofágokban a hatása inkább serkentő: a monociták proliferációját indukálja, IL-1 termelését pedig fokozza. A makrofágokban a “Toll-like receptor” (TLR)-ok aktiválása mind a VDR-t, mind a 1,25-vitD szintézisében szerepet játszó CYP27B1 enzimet indukálja. A

képződött 1,25-vitD pedig a cathelicidin antimikrobiális peptid transzkripcióját fokozva vezet az intracelluláris Mycobacterium tuberculosis elleni hatékonyabb védelemhez.

A dendritikus sejtekben a VDR aktiválásának több hatását is leírták. A 1,25-vitD gátolja a dendritikus sejtek differenciálódását és érését. Részben ezeknek köszönhetően a ligand-kezelt dendritikus sejtek T-sejt aktiváló képessége jelentősen lecsökken. A tolerogén dendritikus sejtekre számos jellegzetessége a 1,25-vitD-kezelt dendritikus sejteken is megfigyelhető. Ezek közé tartozik: az alacsony MHC-II, kostimulációs molekula (CD40, CD80, CD86) és IL-12 szint és a normál szinthez viszonyított magasabb inhibitor-molekula (pl. ILT3), IL-10 és CCL22 szint. VDR hiányos (génkiütött) egerekben a nyirokcsomók nagyobbak és több érett dendritikus sejtet tartalmaznak. Ez arra utal, hogy a 1,25-vitD hatással van a dendritikus sejtek fejlődésére *in vivo*. További állatkísérletek azt is megmutatták, hogy a 1,25-vitD és analógjai klinikai felhasználást is magukban rejtenek betegségek kezelésében (pl. autoimmun cukorbetegség) vagy a transzplantáció során, tolerancia elérésében.

A 1,25-vitD dendritikus sejtekre többféle molekuláris mechanizmuson keresztül gyakorol hatást (pl. differenciálódás és érés gátlása, NF- κ B útvonal gátlása, direkt transzkripciós szabályozás). Az alább tárgyalt kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a gének 1,25-vitD-függő szabályozása mennyire függvénye a differenciálódás gátlásának. Vajon a szabályozott gének elsősorban a differenciálódás/érés által is szabályozott gének köréből kerülnek ki, vagy a 1,25-vitD nagyfokú autonomitást élvez, és jelentős mértékben képes differenciálódás által nem érintett géneket is szabályozni? Hogy ezekre a kérdésekre választ kapjunk, monocita-eredetű dendritikus sejteken vizsgáltuk, hogy milyen géneket érint a differenciálódás és a 1,25-vitD, hogy a szabályozott géneknek a halmazai mennyire fednek át, illetve, hogy a immunfunkcióval rendelkező géneket képes-e a 1,25-vitD a differenciálódástól függetlenül is szabályozni.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Dendritikus sejt izolálás

A humán monocitákat “buffy coat”-ból izoláltuk, Ficoll grádiens centrifugálással és anti-CD14-hez kapcsolt mágneses gyöngy segítségével (VarioMACS separation system, Miltenyi Biotec). A vérből CD1a+ mieloid dendritikus sejteket izoláltunk anti-CD1a gyöngyök segítségével. A sejteket RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) tápoldatban tartottuk. A tápoldat 10%-os FBS-t valamint penicillin/streptomycin-t (Sigma-Aldrich) tartalmazott. A CD1a+ mieloid dendritikus sejtek koncentrációja $3,5 \times 10^5$ /ml volt. A monociták 10^6 /ml koncentrációban differenciáltattuk, IL-4 (PeproTech) és GM-CSF (Leucomax; Gentaur Molecular Products) jelenlétében. A differenciáltatás teljes időtartama 5 napig tartott, a harmadik napon a citokinek adását megismételtük. A dendritikus sejtek érését proinflammatorikus citokinekkal (10 ng/ml TNF α , 10 ng/ml IL-1 β , 1000 U/ml IL-6 (PeproTech) és 1 μ g/ml prostaglandin E $_2$ (Sigma-Aldrich)) indukáltuk. Emellett további TLR-ligandok hatását is teszteltük 18 órás kezelés során, a következő végkoncentrációban: 100 ng/ml LPS (Sigma- Aldrich), 2 μ g/ml CL075 (InvivoGen) és 20 μ g/ml polyI:C (Sigma-Aldrich).

A dendritikus sejtek ligandkezelése

A kísérleteinkhez (a dózisfüggés vizsgálatát kivéve) 1,25-vitD-t (Biomol) 10 nM-os, míg a 25-hydroxyvitamint (25-vitD) (Biomol) 100nM koncentrációban használtuk. A dózisfüggések esetében 1pM – 100 nM közötti koncentrációkat alkalmaztunk. A VDR antagonistá ZK159222-t (Bayer Schering Pharma) 1 μ M-os koncentrációban alkalmaztuk. Az oldószerkontroll DMSO:etanol 1:1 arányú keveréke volt. A RAR α aktiválásához 100nM-os AM580-t használtunk.

Microarray kísérletek

A dendritikus sejté differenciálódó monocitákat az izolálás után 14 órával kezeltük meg 10 nM 1,25-vitD-vel, 100 nM AM580-al vagy az oldószerrel. A sejteket 12 órával vagy 5 nappal később gyűjtöttük be. RNS-t izoláltunk a monocitákból, és ligandok jelenlétében vagy hiányában differenciálódó dendritikus sejtekből, (6×10^6 sejt / minta) Rneasy kit (Qiagen) segítségével. A microarray kísérleteket 3 donorból származó

mintákkal végeztük el. A mintákat Affymetrix Plus 2.0 microarray-kre az EMBL heidelbergi laboratóriumában hibridizálták.

A microarray adatok kiértékelése

Az adatokat GeneSpring 7.3 programmal (Agilent) értékeltük ki. A nyers szignálértékeket globális (un. “per chip”) és génenként elvégzett (un. “per gene”) normalizálás után elemeztük tovább. Először eltávolítottuk azoknak a géneknek az adatait, amelyek nem adtak megfelelően magas jelet (nem normalizált szignál-intenzitás érték minimum 200 a 15 mintából legalább 3-ban). A szignifikánsan változó géneket reprezentáló próbákat oly módon azonosítottuk, hogy egyrészt kétszeres fel- vagy leregulálást kellett mutatniuk a kontrollhoz képest, másrészt a t-teszttel a szignifikancia értéknek 0.05 alatt kellett lennie. Az AM580 és/vagy 1,25-vitD által szabályozott géneket ANOVA t-teszt alkalmazásával azonosítottuk. A különböző grafikus megjelenítéshez un. heat map és a “pontfelhő” (kétdimenziós “scatterplot”) ábrázoláshoz a mintákat a kontrollokra normalizáltuk. A gének funkcionális csoportosításához a “PANTHER classification system” on-line programot használtuk.

Real time quantitative RT-PCR

A gének transzkripció aktivitását, az mRNS szintet “real time quantitative RT-PCR” (qPCR) segítségével mértük génspecifikus TaqMan próbák (Applied Biosystems) segítségével. A gének expressziós szintjét CT (comparative cycle threshold) módszerrel határoztuk meg és ciklofilinre normalizáltuk. Minden mérést legalább 3 biológiai mintán végeztünk el. A diagrammokon egy-egy biológiai minta technikai triplikáinak átlagai \pm SD szerepelnek.

1,25-vitD ELISA

A monocitákat 10^6 / ml koncentrációban tenyésztettük a fent leírt körülmények között oldószer, 100 nM 25-vitD vagy 10 nM 1,25-vitD jelenlétében. A differenciálódó, éretlen és érett dendritikus sejteket az elsőtől a 6. napig gyűjtöttük be naponként és a mérésig -20 °C-on tároltuk őket. A sejteket a mérés megkezdése előtt fiziológias sóoldatban szuszpendáltuk és a lízishez 10 percig szonikáltuk (Bioruptor; Diagenode). A lizátumokat lecentrifugáltuk, majd a felülúszóban lévő 1,25-vitD-t kromatográfiás

oszloppal koncentráltuk be és ELISA-val (1,25-(OH)₂ vitamin D ELISA kit; Immundiagnostik) mértük le a gyártó mellékelt használati utasításai alapján.

CCL22 ELISA

A monocitákat 12-lyukú sejtenyésztő flaskában tartottuk 1,25-vitD, 25-vitD vagy oldószer jelenlétében. Az 5 független donortól származó minták felülúszóiból szendvics ELISA technikával (human MDC immunoassay; R&D Systems) CCL22 szintet mértünk a gyártó mellékelt használati utasításai alapján.

Áramlási citométer

A CD300LF (IREM-1) szintjét a sejtfelszínen áramlási citométerrel detektáltuk, anti-IREM-1-et tartalmazó hibridóma felülúszókat használva (UP-D2, az antitestet M. López-Botet-től kaptuk / Barcelóna, Spanyolország). Izotípus kontrollunk anti-IgG egér antitest volt (R&D Systems). Másodlagos antitestként FITC-konjugált poliklonális kecske anti-egér Ig-t (Dako) használtunk. A differenciálódási és érési markerek detektálásához a következő antitesteket alkalmaztuk: anti CD1A PE, anti HLA-DR PE, anti CD83 PE (BD Pharmingen), anti CD14 PE és anti CD40-PE (R&D Systems). A jelölt antitesteket FACSCalibur áramlási citométerrel detektáltuk és CellQuest programmal elemeztük (BD Pharmingen).

Western blot

25 µg-ot tartalmazó sejt-lizátumot 8%-os SDS-polyacrylamide gélen választottuk szét majd PVDF (Millipore) membránra blottoltuk. A membránon háromféle fehérjét detektáltunk specifikus antitestekkel: CYP27B1-t (1/5000 art.no.HYD001, Biologo), VDR-t (1/7000, C-20, Santa Cruz Biotechnology) és GAPDH-t (1/5000, cat.no ab8245 Abcam). Az antitest-antigén komplexeket HRP-konjugált másodlagos antitestekkel (Sigma-Aldrich) mutattuk ki Immobilon Western HHRP szubsztrát kit (Millipore) segítségével.

Immunhisztokémia

A sejteket centrifugáltuk, formalinnal fixáltuk majd paraffinba ágyztuk. 5 µm-es szeleteket készítettünk, amit aztán egér anti-humán VDR antitesttel (1/2000,

clone:H4537 Perseus Proteomics) mutattunk ki az EnVision-HRP rendszer (Dako) segítségével, a gyártó mellékelt használati utasításai alapján.

EREDMÉNYEK

A monocita-eredetű sejtekben a differenciálódás során korán kifejeződik a VDR

A monocita eredetű dendritikus sejtekben meghatároztuk a VDR szintjét a differenciálódás során. Azt találtuk, hogy a VDR mRNS szintje a differenciálódás 18-24 órájában a legmagasabb, utána csökken. Western blot analízis azt mutatta, hogy a kifejeződő VDR fehérje indukálódik az első két nap során, majd a szintje változatlan marad. Immunhisztokémiával a VDR magi lokalizációt mutatott.

A 1,25-vitD számos gén transzkripcióját a differenciálódástól függetlenül képes szabályozni

A microarray elemzésekhez egy olyan időpontot választottunk ki a ligandkezelésre, amikor a receptor magas szinten expresszálódik. Ezért a sejteket 14 órával a differenciáltatás megkezdése után kezeltük meg és 12 óra vagy 5 nap után gyűjtöttük be. Mivel mind a monocitákból, mind a kezelt és kezeletlen sejtekből RNS-t izoláltunk, a rendszerünk alkalmas volt arra, hogy a differenciálódás során változóan expresszálódó géneket és a 1,25-vitD által szabályozott géneket azonosítsuk. Korábbi kísérleteink azt mutatták, hogy a differenciálódás során nagyszámú gén expressziója változik meg. Ezzel összhangban, azt találtuk, hogy 4364 próba (~ 2766 gén) mutatott jelentősen eltérő expressziót az éretlen dendritikus sejtben a monocitához hasonlítva. A 1,25-vitD által szabályozott gének száma 578 (12 órás kezelés) és 918 (5 napos kezelés) volt. Fontos megfigyelésünk volt az, hogy a differenciálódás során érintett próbák/gének egy jelentős részét (3511 próba) nem szabályozta a 1,25-vitD. Ez azt mutatta, hogy a 1,25-vitD nem tekinthető a differenciálódás általános gátlószerének. Ezzel szemben jelentős számban voltak olyan próbák/gének is, amelyeket a 1,25-vitD szabályozott, a differenciálódás azonban nem.

A 1,25-vitD kezelés számos immunfunkcióhoz köthető gént szabályoz

A tolerogén fenotípust elsősorban azoknak a géneknek az eltérő kifejeződése okozza, amelyekhez immunfunkció köthető. Ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon ezeket a géneket hogyan szabályozza a 1,25-vitD. A PATHER programot használva azonosítottuk a differenciálódás és/vagy 1,25-vitD által szabályozott gének közül azokat, amelyekhez ilyen funkciót kapcsolnak. Először a 1,25-vitD által szabályozott

géneket vizsgáltuk meg. Az elemzés azt mutatta, hogy közel 200 ilyen gén van. Ezek közül 41-et csak 12 órás ligandkezelésnél, 86-ot csak 5 napos ligandkezelésnél, míg 63-ot mindkét időpontban szabályozott a 1,25-vitD. Az immunfunkcióhoz köthető gének (“immunity and defense” kategória) mindkét vizsgált időpontban felül voltak reprezentálva. A további kísérleteinkben két megközelítésben ellenőriztük adataink megbízhatóságát. (1.) Az irodalomból ismert 1,25-vitD által érintett géneket vizsgáltuk meg, hogy a mi rendszerünkben vajon hogyan szabályozódnak. Azt találtuk, hogy néhány kivételtől eltekintve (IL-10, IL-12, MRC-1, CD86 és CCL-18) a gének úgy szabályozódnak, mint ahogy azt a korábbi adatok alapján vártuk. Elképzelhető, hogy az IL-10 és IL-12 csak érett dendritikus sejtekben szabályozottak. Ezen kívül megvizsgáltunk olyan immunfunkcióhoz kapcsolt géneket is, amelyekről ismert, hogy a VDR direkt célgénjei. A monocita-eredetű dendritikus sejtekben kifejeződő géneket a ligand szabályozta, az esetek többségében mindkét időpontban. (2.) Az eredményeinket szintén validáltuk qPCR technikával. Azt tapasztaltuk, hogy a két független módszer (microarray és qPCR) nagyon jó egyezést mutatott nemcsak a magasan, hanem az alacsonyan expresszálandó gének esetében is. A két eltérő megközelítésű ellenőrzés azt mutatta, hogy adataink nagyrészt egybeesnek a korábbi adatokkal, illetve, hogy a jól validálhatóak.

A 1,25-vitD által szabályozott és a differenciálódás által érintett, immunfunkcióhoz kapcsolt gének csak részben fednek át

Azt, hogy a 1,25-vitD gátolja a dendritikus sejt differenciálódást és gátlást, néhány dendritikus sejt marker vizsgálata, valamint bizonyos funkcionális tesztek alapján állapították meg. Viszont nem végeztek olyan vizsgálatokat, ahol egyszerre több száz gént teszteltek volna. Microarray adataink lehetővé tették ilyen jellegű vizsgálatot. Először azt vizsgáltuk meg az immunfunkció kapcsolt gének körében, hogy milyen átfedés tapasztalható a differenciálódás által érintett és a 1,25-vitD által szabályozott gének között. Azt tapasztaltuk, hogy a két génlista csak részben fed át. Tehát az eredmény hasonló volt ahhoz, mint amikor az összehasonlítást nem a szűkített listákon végeztük el. Ahhoz, hogy teljesebb képet kapjunk, az adatainkat egy ún. pontfelhőn (“scatter plot”) ábráztuk. Ehhez mind a differenciálódás, mind a 1,25-vitD hatását egy-egy arányszámmal fejeztük ki minden egyes gén esetében. A differenciálódásnál az éretlen dendritikus sejthez tartozó microarray szignálértéket osztottuk el a monocitához

tartozó értékkel: 1-nél nagyobb szám felregulálást, míg 1 alatti, tört szám leregulálást jelentett a differenciálódás során. Hasonlóképpen számoltunk hányadost a 1,25-vitD hatások értékelésére. Ezután a két arányszámot egy pontfelhőn ábráztuk (XY koordinátákon). Ez az ábrázolásmód megmutatta, hogy a gének többsége, a korábban leírt génekhez hasonlóan, azaz a 1,25-vitD és a differenciálódás által ellentétesen szabályozott. A 1,25-vitD által szabályozott gének egy másik csoportját a differenciálódás nem érintette. Érdekes módon olyan géneket is azonosítottunk, amelyeket a differenciálódás és a 1,25-vitD hasonló módon szabályozott (pl. mindkettő felregulálta).

Az ellentétesen szabályozott gének között is vannak a 1,25-vitD által autonóm módon szabályozott gének

A két program által ellentétesen szabályozott gének vizsgálatkor megfigyeltük, hogy van olyan gén is, amit valószínűleg a 1,25-vitD a differenciálódástól függetlenül szabályoz. Mivel az ALOX5 (arachidonate 5-lipoxygenase) egy direkt VDR célgén, ezért bár a 1,25-vitD és a differenciálódás egyaránt szabályozza ezt a gént, a két program mégis egymástól függetlenül hat. Arra voltunk kíváncsiak, hogy más géneket is tud-e egymástól függetlenül szabályozni a két program. Ehhez kiválasztottunk néhány gént ebből a csoportból és teszteltük, hogy a differenciálódás késői szakaszában (4. napon 24 órán át kezelve) is képes-e szabályozni expressziójukat 1,25-vitD. Érdekes módon azt találtuk, hogy az általunk vizsgált CD14, THBD, CD300LF, ALOX5 esetében képes volt a 1,25-vitD a gén szintjét indukálni a differenciálódás késői szakaszában is. Ezt egyedül az IRF8 esetében nem tapasztaltuk. Amikor ezeknek a géneknek 1,25-vitD érzékenységét egy másik dendritikus sejt típusban, a vérből izolált CD1a+ sejteken vizsgáltuk, azt tapasztaltuk, hogy a 1,25-vitD ebben a sejt típusban is képes ezeket szabályozni. Hasonlóképpen teszteltük azoknak a géneknek a 1,25-vitD érzékenységét CD1a+ sejtekben, amelyeket a ligand leregulált a monocita-eredetű dendritikus sejtekben, és azt tapasztaltuk, hogy a gének gátlása ebben a sejt típusban is megfigyelhető. Az a tény, hogy a ligand a differenciálódás késői szakaszában is hatékony volt, valamint az, hogy egy másik dendritikus sejt típusban is detektálható volt a szabályozás azt mutatták, hogy a 1,25-vitD még akkor is differenciálódástól függetlenül kifejtheti a hatását, amikor a két program ellentétesen szabályozza a gének szintjét.

A CYP24A1, CCL22 és a CD300LF 1,25-vitD-függő szabályozása

További vizsgálatokra három olyan gént választottunk ki, amelyeket a 1,25-vitD egyaránt felregulált, azonban a differenciálódás más-más módon szabályozott. A CYP24A1 egy direkt VDR célgén, a CCL22 egy Treg sejtekre ható kemokin, míg a CD300LF egy inhibitor molekula. A differenciálódás a CYP24A1-t nem érintette, a CD300LF-t leregulálta, míg a CCL22 differenciálódás közben felregulálódott. A ligand időfüggését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 1,25-vitD mindhárom gén aktivitását már korán, három óra után fokozta és ez fennmaradt 6, 12, 24 óra után is. Ez után azt vizsgáltuk, hogy milyen hatása van a VDR antagonistának ZK159222-nek. Az 1,25-vitD antagonistája jelenlétében sokkal kisebb hatékonyságú volt, mint annak hiányában. Ez azt mutatta, hogy a 1,25-vitD ezeket a géneket a VDR-on keresztül szabályozza. A három gén expresszióját különböző 1,25-vitD koncentrációk jelenlétében is teszteltük, és a kapott dóziszgörbék alapján EC_{50} értékeket számoltunk. A CYP24A1 és a CD300LF EC_{50} értéke nagyon hasonló volt egymáshoz (~2-3 nM), míg a CCL22 egy nagyságrenddel alacsonyabb EC_{50} értéket mutatott (~0,3 nM). További kísérleteink azt mutatták, hogy a három gén a differenciálódás során mindvégig érzékeny volt 1,25-vitD-kezelésre. Az érési periódusban, proinflammatorikus citokinek jelenlétében a CCL22 már nem mutatott jelentős változást 1,25-vitD-kezelésre, feltehetően azért, mert az érési stimulusok már önmagukban is többszörösére növelték mRNS szintjét.

A dendritikus sejtben termelődő 1,25-vitD is képes a CYP24A1, a CD300LF és a CCL22 szintjét szabályozni

A fiziológiai 1,25-vitD szérum szint (~40-130 pM) valószínűleg nem elegendő arra, hogy a 1,25-vitD-függő útvonalakat bekapcsolja dendritikus sejtben. Korábbi kísérletek azonban megmutatták, hogy a dendritikus sejt képes endogén módon szintetizálni a 1,25-vitD-t a szérumban kb. 1000x-es koncentrációban jelenlévő 25-hidroxi-kolekalciferol-ból (25-hydroxyvitamin D_3 , továbbiakban 25-vitD). A 25-vitD hidroxilációját a CYP27B1 enzim végzi, ami egy citokrom p450 családba tartozó fehérje. Ennek a jelenlétét kimutatták dendritikus sejtekben is. Mi arra voltunk kíváncsiak, hogy a differenciálódás/érés melyik szakaszában indukálódik az enzim, és mikor termelődik elegendő aktív 1,25-vitD a transzkripció program elindításához.

Először a CYP27B1 mRNS szintjét detektáltuk qPCR technikával. Azt tapasztaltuk, hogy az enzim nagyon hasonló expressziós mintázatot mutatott, mint a VDR, 18-24 órával a tenyésztés megkezdése után mutatta a legmagasabb mRNS szintet, utána pedig lecsökkent. A Western blot elemzés azt mutatta, hogy a 2-3 nap után jelent meg a fehérje magasabb szinten, majd azt követően jelentős változás nem volt megfigyelhető. A korábbi adatok azt mutatták, hogy elsősorban érési stimulusok képesek indukálni a CYP27B1-t, ezért a proinflammatorikus citokinek mellett megvizsgáltunk különböző TLR ligandok hatását is. Azt tapasztaltuk, hogy számos TLR ligand aktiválta a szintjét, ráadásul az LPS (TLR4 ligand) és CL075 (TLR8/7 ligand) egyaránt indukálta a VDR és a CYP27B1 szintjét, arra utalva, hogy bizonyos stimulusok egyszerre képesek aktiválni a receptort és az átalakító enzimet. Az enzim mRNS és fehérjeszintjének vizsgálata után azt vizsgáltuk, hogy vajon a 1,25-vitD mikor válik kimutathatóvá a sejtekben. Ehhez a dendritikus sejteket 100nM 25-vitD jelenlétében tenyésztettük és a termelődő 1,25-vitD szintet ELISA módszerrel mértük. A sejtekben a 1,25-vitD a 3. napon vált kimutathatóvá és fokozatosan nőtt a szintje. Ennek következtében a korábban vizsgált három gén (CYP24A1, CCL22 és CD300LF) mRNS szintje is indukálódott a 2-4 naptól kezdődően a 25-vitD jelenlétében is. Ezzel párhuzamosan a CCL22 (ELISA-val) és CD300LF (áramlási citométerrel) indukciója fehérjeszinten is kimutatható volt. Ezek az adatok tehát megmutatták, hogy a monocita-eredetű dendritikus sejtben már a differenciálódás során is keletkezik annyi 1,25-vitD, hogy célgénnek transzkripcióját fokozza.

A VDR és RAR α által közösen szabályozott gének azonosítása

A munkacsoportunkban korábban elvégzett kísérletek azt mutatták, hogy a monocita-eredetű dendritikus sejtben számos gént és útvonalat képes szabályozni mind a PPAR γ agonista rosiglitazone, mind a RAR α -specifikus AM580. Ilyen gének pl. a szöveti transzglutamináz (TGM2), a CD1A és CD1D. Több 1,25-vitD által szabályozott célgént teszteltük rendszerünkben, hogy vajon más magreceptor ligandok képesek-e szabályozni. Érdekes módon azt találtuk, hogy számos 1,25-vitD-érzékeny gént az AM580 is szabályozott. A fent említett TGM2 mellett FBP1, VEGF, NRIP1 is ilyen géneknek bizonyult. Ez felvettette azt a kérdést, hogy vajon ez a jelenség (ti. 1,25-vitD-érzékeny géneket az AM580 is szabályoz) mennyire általános.

A korábban ismertetett microarray kísérletünket úgy terveztük meg, hogy erre a kérdésre is választ tudjunk adni a segítségével. Az oldószer kontroll és a 1,25-vitD mellett olyan mintáink is voltak, amikor a sejteket RAR α -specifikus 100 nM AM580-al kezeltük 12 óráig illetve 5 napig. A szignifikánsan szabályozott gének azonosítását az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük és fentebb ismertetett kísérletektől eltérően itt ANOVA t-tesztet alkalmaztunk. Mind a 12 óráig kezelt mind az 5 napig kezelt minták esetében összehasonlítottuk a ligandok által szabályozott gének halmazát. Meglepő módon a 1,25-vitD által szabályozott gének mintegy 50%-át, 877 gén-specifikus próbát az AM580 is szabályozta az 5. napon. A 12 óras ligandkezelés után a közösen szabályozott próbák/gének száma alacsonyabb volt és százalékban kifejezve is kisebb volt az átfedés. A 1,25-vitD által szabályozott génekhez hasonlóan az AM580 által szabályozott géneknél is elvégeztük a funkció szerinti osztályozást a PANTHER programot használva. Ebben az esetben is azt tapasztaltuk, hogy az AM580 kezelés is számos immunfunkcióhoz köthető gént szabályozott (pl. 12 óra ligandkezelés után 52 gént). Az 1,25-vitD és az AM580 által közösen szabályozott gének között a dendritikus sejt minden vizsgált kategóriájában (antigén felvétel és bemutatás, kemokinek, citokinek és receptoraik, inhibitor receptorok) találtunk közösen szabályozott gént.

MEGBESZÉLÉS

Korábbi tanulmányok megmutatták, hogy a microarray technika sikerrel alkalmazható a magreceptorok által szabályozott géneket és érintett útvonalakat tanulmányozására mieloid sejtekben. A glükokortikoid receptor szerepét monocita-eredetű makrofágokban vizsgálták ezzel a technikával, míg munkacsoportunk azt tanulmányozta, hogy a PPAR γ dendritikus sejtekben hogyan szabályoz lipid-metabolizmusban érintett és immunfunkcióhoz kapcsolható géneket. Itt ismertetett kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy a 1,25-vitD hatása dendritikus sejtekben mennyire függ a differenciálódásra gyakorolt hatásától.

A monocita-eredetű dendritikus sejt

A kísérleteinkhez monocita-eredetű dendritikus sejteket használtunk. Az IL-4 és GM-CSF citokinek jelenlétében differenciáltatott dendritikus sejt széles körben használt modellként szolgál. Nagy előnye a rendszernek, hogy viszonylag nagy számban ($5-12 \times 10^7$ sejt/ donor) jutunk homogén állományú sejtekhez. Amint azt állatkísérletekkel igazolták, a monociták - gyulladás során - valóban szolgálhatnak dendritikus sejtek prekurzoraiként. A választott sejtípus tehát nemcsak a transzkriptom-elemzésekhez ideális sejteket biztosítja, hanem egy *in vivo* lezajló differenciálódási folyamat modelljeként is felfogható.

Egy adott magreceptor aktivitásának jellemzéséhez alapvető annak tisztázása, hogy a sejtekben jelen van-e az aktiváló ligand. A VDR esetében korábbi tanulmányok igazolták, hogy a dendritikus sejtek képesek (elsősorban gyulladási szignálok jelenlétében) endogén 1,25-vitD termelésére. Azt itt tárgyalt kísérleteink azt mutatták, hogy a monocita-eredetű dendritikus sejtek már a differenciálódás során termelnek a prekurzorból 1,25-vitD-t olyan koncentrációban, amennyi elegendő a célgénnek transzkripciójának indukálására. További kísérletek szükségesek annak eldöntésére, hogy a 1,25-vitD szintézis képessége melyik dendritikus sejt típusokra jellemző és a differenciálódás/érés melyik fázisában jelenik meg.

A 1,25-vitD kezelés által indukált transzkripciós változások tolerogén dendritikus sejt fenotípus kialakításához vezetnek

Kísérleteink során microarray technikával azonosítottuk azokat a géneket, amelyek transzkripciós aktivitását jelentősen szabályozta a 1,25-vitD. Az a kérdés, hogy az eddig VDR célgénként nem azonosított gének hogyan járulnak hozzá a tolerogenitáshoz, későbbi vizsgálataink alapját fogják képezni. Jelen értekezésben elsősorban azt vizsgáltuk, hogy hogyan függ össze a 1,25-vitD által szabályozott és a differenciálódás által érintett program. Ennek tárgyalása előtt két, a szabályozás mikéntjére vonatkozó megfigyelésre röviden kitérünk. (1.) A microarray adatok azt mutatták, hogy a tolerancia kialakításában az immunogén folyamatok (és ahhoz hozzájáruló gének) gátlása és a tolerogén folyamatok (és gének) indukciója egyaránt szerepet játszanak. Erre utalt az antigén-prezentációban érintett és kostimulációs molekulák transzkripciójának leregulálása, illetve olyan gének felregulálása (citokinek, kemokinek, inhibitor receptorok) amelyek hatása ismert, hogy tolerogén fenotípushoz vezet. (2.) Számos olyan gént, ami hasonló funkciójú fehérjét kódol, a 1,25-vitD együtt szabályoz. Ezek a gének gyakran egy adott kromoszóma régióban találhatóak, amint ez az MHC-II, CD1 molekulák, inhibitor receptorok esetében megfigyelhető. Ezekben az esetekben elképzelhető, hogy a VDR nagyobb genomi szakaszokat egyszerre szabályoz.

A dendritikus sejtekben 1,25-vitD által indukált transzkripciós program jelentős mértékben független a differenciálódástól

A korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a 1,25-vitD gátolja a dendritikus sejtek differenciálódását és érését. Erre a következtetésre a kutatók különféle markerek (pl. CD1a, CD14, MHC-II, CD83 és kostimulációs molekulák) vizsgálata alapján jutottak. Mivel globális elemzést eddig nem végeztek a 1,25-vitD és a dendritikus sejtek differenciálódásának viszonylatában, nem volt ismert, hogy vajon a differenciálódás/érés során változó gének többsége hasonlóan szabályozott-e mint a vizsgált markerek. További kérdés volt, hogy vajon a 1,25-vitD képes-e a differenciálódástól és/vagy az érésétől függetlenül is szabályozni immunfunkcióhoz kapcsolt géneket.

Kísérleteink azt mutatták, hogy a 1,25-vitD jelentős mértékben autonóm módon, a differenciálódástól és/vagy az éréstől függetlenül szabályozza a gének transzkripcióját. Megállapításunkat a következő 4 érveléssel támasztottuk alá.

(1.) A differenciálódás és a 1,25-vitD által szabályozott gének csak részben fednek át. Nagyszámú olyan gén is azonosítható, amit vagy csak az egyik, vagy csak a másik program szabályoz. Ez igaz az *in silico* - PANTHER programmal - azonosított, immunfunkcióhoz gének csoportjára is.

(2.) Azok a gének, amik transzkripcióját mind a 1,25-vitD, mind a differenciálódás érinti, nem szükségszerűen ellentétesen szabályozottak a két program által. A 1,25-vitD az esetek többségében a korábban feltárt módon szabályozza a géneket, azaz a differenciálódással ellentétesen. Viszont jelentős számban azonosítottunk olyan géneket is (pl. CCL22) amit mindkét program indukál.

(3.) Még akkor sem törvényszerű, hogy a 1,25-vitD a differenciálódás gátlásán keresztül hat, amikor a két program ellentétesen szabályozza egy adott gén transzkripcióját. Erre részben az utalt, hogy a differenciálódás bármelyik szakaszában képes volt a 1,25-vitD indukálni a differenciálódás során leregulált géneket. Másfelől, a 1,25-vitD függő szabályozást ki tudtuk mutatni vérből izolált CD1a+ dendritikus sejteken is. Amikor a CD300LF-t (a differenciálódás és 1,25-vitD által ellentétesen szabályozott gén) részletesen elemeztük, arra jutottunk, hogy szabályozása nagyon hasonló a CCL22-höz és CYP24A1-hez, amelyeket viszont biztosan nem a differenciálódás gátlásán keresztül szabályoz a 1,25-vitD.

(4.) A 1,25-vitD képes az érési programtól függetlenül is géneket szabályozni. Számos gyulladási szignál, egyebek mellett az LPS és gyulladási citokinek, képes a dendritikus sejtek érési programját beindítani. A 1,25-vitD valóban képes az érési folyamatokat gátolni, részben olyan "gyulladási transzkripció faktorok" gátlása révén, mint amilyen az NFAT/AP-1 és az NF- κ B. Ennek a gátlásnak az eredménye pl. IL-2 és az IL-12 csökkent termelésében nyilvánul meg. A rendszerünkben azonban valószínűleg nem erről van szó, ugyanis a differenciálódás során nem alkalmaztunk olyan anyagokat (pl. TLR agonisták) amelyek gyulladási érést indukáltak volna dendritikus sejtekben. Így tehát a 1,25-vitD által szabályozott, mintegy 200 immunfunkcióhoz kapcsolt gén nem a gyulladási szignálok gátlása révén szabályozott.

A fentiek alapján megállapítottuk tehát, hogy a 1,25-vitD egy olyan ligand, amely nagymértékben képes a differenciálódástól és/vagy az érési szignáloktól szabályozni

célgének expresszióját. Ez alapján valószínűsíthetjük, hogy a tolerogén fenotípus jelentős részben aktív folyamatok eredményeként alakul ki, és nem a gyulladási/immunogén folyamatok gátlásának az eredménye.

A VDR és RAR α által megvalósuló közös szabályozás lehetséges molekuláris mechanizmusainak vizsgálata

Számos potenciális mechanizmus létezik, amely magyarázhatja, hogy egy adott gént miért képes mind a VDR mind a RAR α szabályozni. Lehetséges például, hogy mindkét receptor indukál egy olyan transzkripciós faktort, amely aztán számos célgént szabályoz. Emellett valószínű, hogy több olyan gén is van, amelyek direkt célgénjei a VDR-nak és a RAR α -nak. Ebben az esetben elképzelhető, hogy a két receptor ugyanazt a válaszadó elemet használja a szabályozáshoz. További kísérleteinkben erre az utóbbira keresünk példákat. Először a génexpressziós adatainkat összevetettük az irodalomból ismert génekkel, amelynek már azonosították a válaszadó elemét. Azt találtuk, hogy a mindkét ligand által szabályozott gének közül egyedül a FBP1-ről (fructose-1,6-bisphosphatase) ismert, hogy a VDR és a RAR α ugyanazt a válaszadó elemet használja a szabályozáshoz (azaz VDRE=RARE). Számos olyan, mindkét ligand által szabályozott gént is sikerült azonosítanunk azonban, amelyről ismert, hogy vagy az egyik, vagy a másik receptor milyen válaszadó elemen keresztül szabályozza. Ezeket a géneket kívánjuk a továbbiakban megvizsgálni, és ellenőrizni luciferáz riporter konstrukciókkal és EMSA technikával, hogy vajon a korábban azonosított válaszadó elemeket képes-e mindkét receptor kötni. Ha ezt sikerül igazolni, akkor ez részben magyarázatul szolgálhat a microarray elemzés során megfigyelt jelentős átfedésre a két receptor által szabályozott gének között.

ÖSSZEFOGLALÁS

A dendritikus sejtek nélkülözhetetlenek az adaptív immunválaszok kiváltásában és a tolerancia kialakításában, de a természetes immunitáshoz is hozzájárulnak. Az immunválaszt kiváltó folyamatokban elsősorban immunogén, míg az immunválaszok csendesítésében tolerogén dendritikus sejtek vesznek részt. Az utóbbi időben egyértelművé vált, hogy a dendritikus sejtek fejlődésének és számos funkciójának szabályozásában részt vesznek a magreceptorok is. A jelen értekezésben tárgyalt kísérletek során egy ilyen magreceptor, a D-vitamin receptor (VDR) által indukált változásokat vizsgáltuk két másik program, a differenciálódás és a retinsav receptor α (RAR α)-indukálta transzkripciós program viszonyában.

(1.) Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a VDR agonistája, a calcitriol gátol számos olyan változást, amelyek a dendritikus sejtek differenciálódása és érése során következnek be. Emellett az is világossá vált, hogy a calcitriol kezelt dendritikus sejtek mind fenotípusuk alapján, mind funkciójuk szempontjából tolerogén dendritikus sejteknek tekinthetők. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy hogyan függ össze a differenciálódás és a calcitriol által szabályozott transzkripciós program. Hogy erre a kérdésre választ kapjunk, microarray és qPCR vizsgálatokat végeztünk el humán monocitákból differenciálódó dendritikus sejteken és vérből izolált mieloid dendritikus sejteken. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a differenciálódás által és a calcitriol által szabályozott gének átfednek ugyan, de nagyszámú olyan gén is van, amit vagy csak az egyik, vagy csak a másik program szabályoz. További vizsgálatok azt is megmutatták, hogy sok esetben akkor is függetlennek tekinthető a két program egymástól, amikor mindkettő képes szabályozni egy adott gén transzkripcióját. A kísérleteink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az exogén (vagy a dendritikus sejtek által szintetizált endogén) calcitriol olyan programot szabályoz, amely nagymértékben független a dendritikus sejtek differenciálódási folyamatától. Ez arra is utalt, hogy a calcitriol nem kizárólag immunogén programok gátlása által, hanem jelentős részben aktív folyamat révén szabályozza a dendritikus sejtek tolerogén fenotípusát.

(2.) Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy a RAR α és a VDR sok esetben hasonló változásokat idéz elő a dendritikus sejtek fenotípusában, ráadásul a két magreceptor több funkciót is hasonlóképpen befolyásol. A jelenleg folyó kísérleteinkben azt

vizsgáljuk, hogy mennyire tekinthető általánosnak a közös szabályozás a célgének szintjén. Microarray kísérletek során jelentős átfedést tapasztaltunk az AM580 (RAR α agonista) és a kalcitriol kezelés nyomán szabályozott gének között. Eredményeink azt mutatták, hogy a kalcitriol által szabályozott gének mintegy 50%-át az AM580 is szabályozza a dendritikus sejtek differenciálódásának 5 napja alatt. A továbbiakban ennek a megfigyelésnek szeretnénk lehetséges molekuláris mechanizmusait vizsgálni. Elsősorban arra vagyunk kíváncsiak, hogy vannak-e olyan, mindkét receptor által szabályozott célgének, amelyeket a VDR és a RAR α úgy szabályoz, hogy ugyanahhoz a válaszadó elemhez kötődnek az adott gén szabályozó régióiban.

Az értekezéshez felhasznált közlemények:

1,25-dihydroxyvitamin D3 is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype.

Széles L, Keresztes G, Töröcsik D, Balajthy Z, Krenács L, Póliska S, Steinmeyer A, Zuegel U, Pruenster M, Rot A, Nagy L.

J Immunol. 2009 Feb 15;182(4):2074-83.

IF: 6.068

PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases.

Széles L, Töröcsik D, Nagy L.

Biochim Biophys Acta. 2007 Aug;1771(8):1014-30. Review.

IF: 3.539

VDR and RAR α regulate similar subsets of genes in developing dendritic cells.

Széles L, Nagy L (in preparation)

Egyéb közlemények:

At the crossroads of lipid metabolism and inflammation.

The role of PPARgamma, a lipid-activated transcription factor.

Széles L, Töröcsik D, Nagy L.

B. I. F. Futura (Boehringer Ingelheim Fonds) 2006, 21:79-85. Review.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells.

Szatmari I, Vámosi G, Brazda P, Balint BL, Benko S, **Széles L**, Jeney V, Ozvegy-Laczka C, Szántó A, Barta E, Balla J, Sarkadi B, Nagy L.

J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23812-23.

IF: 5.808

Az értekezéshez kapcsolódó elsőszerzős posztterek

Széles L, Szatmári I, and Nagy L: Identification of target genes of PPAR nuclear receptor isotypes. Affymetrix User Group Meeting, Geneva, Switzerland, May 24-26, 2004.

Széles L, Szatmári I, and Nagy L: Nuclear receptors and ligand-dependent repression. EMBO-HHMI Joint meeting, Budapest, Hungary, February 7-9, 2005.

Széles L, Szatmári I, and Nagy L: Nuclear Receptors and ligand-dependent repression. 30th FEBS Congress, Budapest, Hungary, July 2-7, 2005.

Széles L and Nagy L: Nuclear Receptors and ligand-dependent repression. EMBO conference, Villa Alba, Gardone Riviera, Lake Garda, Italy, September 29 - October 1, 2005.

Széles L and Nagy L: Nuclear receptors and ligand-dependent repression. 9th International Conference, DENDRITIC CELLS – 2006, Edinburgh, UK, September 16-20, 2006.

Széles L, Szatmári I, and Nagy L: Investigation of the role of vitamin D receptor and retinoic acid receptor in human monocyte-derived dendritic cells. Spetses Summer School on Nuclear Receptor Signalling: From Molecular Mechanisms to Integrative Physiology, Island of Spetses, Greece, August 26 - 31, 2007.