

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A sejtmagi hormon receptorok és a lipid antigének
bemutatásának kapcsolata dendritikus sejtekben**

Gyöngyösi Adrienn

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László, az MTA rendes tagja



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2018

A sejtmagi hormon receptorok és a lipid antigének bemutatásának kapcsolata dendritikus sejtekben

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

Írta: **Gyöngyösi Adrienn** okleveles biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László, az MTA rendes tagja

A doktori szigorlati bizottság

elnök: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Boros Imre, az MTA doktora

Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai
Intézet Tárgyalója, 2015. január 12. 11:30

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

Dr. Józsi Mihály Krisztián, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja

tagok: Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

Dr. Józsi Mihály Krisztián, az MTA doktora

Dr. Benkő Szilvia, PhD

Dr. Jakus Zoltán Péter, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének tanterme,
2019. február 18. 13:00 óra

1. BEVEZETÉS

1.1. Dendritikus sejtek (DCk)

1.1.1. A DCk általános jellemzése

Az immunrendszer a gazdaszervezet védelmére kialakult szervrendszer, ami védelmet biztosít akut- és szisztémás gyulladások során, egyre fokozódó specificitással jellemezhető válaszreakcióival. Az emberek és az egerek kétféle immunvédelemmel rendelkeznek: természetes/veleszületett- és adaptív immunitás. A természetes immunválaszt gyorsan követi egy az antigén prezentáló sejtek (APCk) által kiváltott antigén-specifikus adaptív válasz. A DCk, mint APCk egyedi természetes immunsejtek, mivel elengedhetetlen kapocsként funkcionálnak a két immunitás között, és fontos őrzői a gazdaszervezet immunvédelmének. Az éretlen DCk (iDCk) folyamatosan monitorozzák a perifériás szöveteket potenciális betolakodók és saját antigének felkutatásáért. Néhány DC éretlen stádiumban a környező nyirokcsomókba (LNk) jut, saját antigéneket prezentál és részt vesz a perifériás tolerancia fenntartásában. Az érett DCk (mDCk) adaptív immunválaszt indítanak el a gazdában egy nagyon fajlagos antigén prezentáló folyamat során sejt felszíni fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) I (saját- vagy virális antigének) vagy MHCII (extraceluláris antigének) molekuláikkal. Az mDCk a LN-ba vándorolnak, bemutatják az antigéneket a reaktív naiv T sejteknek és aktiválják is őket. Képesek bemutatni a gyulladásos betolakodók glikolipidjeit vagy saját lipid antigéneket a differenciálódási antigén 1 (CD1) molekuláikkal. A lipid antigén prezentáció molekuláris szintű jellemzése a tudományos erőfeszítések ellenére is kevésbé ismert. Célunk a sejtmagi hormon receptorok szerepének azonosítása volt a humán és egér DCk fejlődésére és immunogenitására.

1.1.2. DCk fejlődése

DCket két osztályba sorolhatjuk: plazmacitoid (pDCk) vagy konvencionális DCk (cDCk). A csontvelői hematopoézis során a közös mieloid előalakokból (CMPs) alakulnak ki. További kutatások jelezték, hogy monociták és DCk közös közti előalakokkal rendelkezhetnek (makrofág és DC előalak ((MDP)). Az MDPk elköteleződnek a monociták vagy a közös DC előalakok (CDPk) irányába. A CDPk kizárólag konvencionális elő DCket (pre-cDCk) vagy plazmacitoid elő DCket (pre-pDCk) termelnek. A pDCk befejezhetik a fejlődésüket a csontvelő (BM) elhagyása előtt, míg a pre-cDCk folyamatosan kilépnek a csontból, a vérkeringéssel eljutnak a perifériás szövetekbe vagy LNk-ba.

A DC altípusok fejlődését citokinek és transzkripciós faktorok (TFk) kombinációja határozza meg. Fms-szerű tirozinkináz-3 ligand (Flt3L) egy kulcs citokin a mieloid DC fejlődésben. Az MDPk mellett, a makrofágok és DCk közös eredetét támasztja alá szintén, hogy fejlődésükre szükségük van a makrofág kolónia stimuláló faktor/ kolónia stimuláló faktor 1 receptorra (M-CSF/CSF-1R). A monociták ennek a citokinnek a hatására CD103⁺ DCk-et hozhatnak létre a lamina propriában (LP). Habár a human vér-eredetű monociták kiváló forrásai az *in vitro* DCk-nek az *in vivo* DC homeosztázisban betöltött szerepük még nem tisztázott. A CD14⁺ monociták monocita eredetű DC-vé fejlődhetnek (mo-DCk) interleukin

(IL-4)/IL-13 és a granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF/CSF-2) hatására, mely a leggyakrabban használt humán DC modell. Korábban ezt a fejlődési típus a gyulladt vagy fertőzött környezetre korlátozódott, főleg a szöveti gyulladásos- és nem a “steady state” DCk kifejlődését modellezve. Későbbi kísérletek kimutatták a monocita eredetű bél CD103⁻/CD11b⁺, lép CD11b⁺/endotél specifikus adhézións molekula (ESAM)^{alacsony}- és izom FC gamma Receptor 1 (FcγRI)⁺ DCk kifejlődését “steady state” körülmények között.

Adoptive transzfer kísérletek alátámasztották, hogy az bél LP-DC altípusok különböző előalakokból fejlődnek (monociták vagy pre-cDCk). A monociták kizárólag CD103⁻/CX3CR1⁻ motívum kemokin receptor 1 (CX3CR1)⁺ DCket hoznak létre M-CSF és Flt3L hatására, míg az GM-CSF és Flt3L kritikusak a CD103⁺/CX3CR1⁻ DC Pre-DC-ből történő kialakulásában.

Genomot lefedő transzkriptóm és sejtfelszíni receptor profilozás a vékonybél LP-, vér- and lép- (Sp-) Sp-DC alpopulációk esetében koordináltan szabályozott TF profilt azonosított, ami meghatározza ezen sejtek altípus specifikációját és fejlődését számos limfoid és nem-limfoid szövetben. Ez az analízis szintén feltárta, hogy a humán bél CD103⁻/jelszabályozó fehérje alfa (Sirpa)⁺ cDCk expressziós profilja megegyezik a mo-DCk-ével.

1.2 DCk lipid antigén bemutatása

1.2.1. 1-es és 2-es csoportba tartozó CD1 molekulák

A peptid antigén prezentációs képességük mellett, a DCk szert tehetnek arra a képességre, hogy lipid közvetített T sejt válaszokat váltsanak ki. A lipid antigéneket az evolúcionálisan konzervált CD1 család prezentálja. Az öt humán CD1 molekulát két csoportra osztjuk nukleotid és aminosav szekvencia homológiájuk alapján. Az 1-es csoportba tartozik a CD1a, b, c és e; míg az egyetlen 2-es tag a CD1d. Egerekben csak a CD1d fejeződik ki. A CD1 gének integrált membrán molekulákat kódolnak, melyek szerkezetileg hasonlítanak az MHC I molekulához. A CD1 izoformák nehéz α láncból (α1, α2, and α3 extraceluláris domének), és az ehhez nem kovalensen asszociált béta 2-mikroglobulinból (β2m) állnak. A humán és az egér CD1-ek krisztográfiás analízise feltárta, hogy ezek az antigén prezentáló molekulák keskeny, mély, hidrofób ligand kötő zsebbel rendelkeznek, ami a ligand prezentálásra van optimalizálva. A CD1-ek különböző konformációkat vehetnek fel, szerkezetileg hasonló lipidek kötését elősegítve, ezzel növelve az antigén repertoárt a CD1-reaktív T sejtek számára.

1.2.2. CD1d molekulák

A humán vérben előforduló monociták magas CD1d szinttel jellemezhetők, ami gyorsan lecsökken, a DC-vé történő alakulásuk során. Az alacsony sejtfelszíni kifejeződés ellenére, a humán CD1d stimulálja a CD1d-korlátozott, invariáns természetes ölő T sejtek (iNKTs) osztódását és citokin leadását, amikor a humán mo-DCk-et α-galaktozilceramiddal (αGC) (lipid aktivátor ligand iNKTs sejtek számára) töltik fel. *In vivo*, immunhisztokémiai (IHC) adatok kimutatták a CD1d kifejeződést humán dermális DCk-en.

A CD1d jelen van egér APCk-en is, mint pl. Sp-DCk, makrofágok, B sejtek és timociták. A human mo-DCk-kel szemben, a GM-CSF és az IL-4 moderáltan indukálta az egér CD1d kifejeződését a BM-DCk-en. Továbbá Flt3L-stimulált egér BM-DCk, LPS és INF α mellett differenciáltatva magasabb sejtfelszíni CD1d szinttel rendelkeznek, úgy, mint a vastagbél LP-DCk gyulladásai körülmények alatt.

Az egér CD1d hozzákötődik a β 2m-hez mielőtt elhagyja az ER-t, de funkcionális CD1d detektálható a sejtfelszínen β 2m-független módon is. Az egér CD1d két szekréciós utat követve jut el a sejtfelszínhez. A belső útvonal során a CD1d közvetlenül a sejtfelszínhez jut az ER-ből és saját antigéneket prezentál, míg a külső útvonalon az egér CD1d molekulák egy része asszociálva az invariáns láncsal (Ii), először az endoszómális kompartmentekbe jutnak. Ez a második útvonal elengedhetetlen a saját vagy exogén antigén lipidek betöltődése számára a CD1d-be, amik bemutatásra kerülnek az autoreaktív CD1d-korlátozott NKTk-nek, valamint nélkülözhetetlenek a NKTk pozitív szelekciójához.

Az egér CD1d aktiváló protein 2 (AP-2)/AP-3 függő módon jut vissza a sejtbe. CD1d mutánsokkal kimutatták, hogy a molekula citoszolikus része tartalmaz egy olyan motívumot, ami kritikus a lizoszómába jutásához és az iNKT autoreaktivitáshoz. Az egér CD1d-vel ellentétben; a humán CD1d citoszolikus vége nem kötődik az AP-3-hoz. Továbbá az egér és humán CD1d molekulák eltérő sejtben belüli mozgási tulajdonsággal rendelkeznek. Az alternatív internalizációs útvonal komponenseit nem térképezték fel. A humán CD1d egy része MIICk-be szállítódik az MHCII and Ii molekulák segítségével. Az MHCII-vel történő kötődés nem befolyásolja a CD1d sejtben belüli lokalizációját, de fokozza a molekula sejtfelszínről történő internalizációjának sebességét. Az Ii hiány csökkent sejtfelszíni CD1d szinthez vezet a MHCII⁺ sejtvonalakban, arra utalva, hogy a CD1d mind az Ii-vel és az MHCII-vel is kötődhet a sejtfelszínen. MHCII/Ii membrán lipid tutajokba toborozza a CD1d-t, ami gazdag kostimulációs molekulákban, így még hatékonyabb stimulátorrá téve a molekulákat.

A DCk képesek prezentálni a lipid antigéneket és hatékonyan aktiválni a CD1-korlátozott T sejteket függetlenül az éresi státuszoktól, míg az MHC függő peptid prezentációjukhoz elengedhetetlen az érett stádium és az MHC-k gyors sejtfelszínhez történő mobilizációja. Az CD1d-közvetített exogén antigén prezentáció hatékonyabb az iDCk-ben, ami aktívan recirkuláltatja az MHCII/CD1d komplexeket az endoszómális rendszeren keresztül, az mDCk-hez képest, amik stabilizált sejtfelszíni MHCII kifejeződéssel rendelkeznek. Mind az iDCk és az mDCk bemutatják az α GC-t, ami nem igényel sejtben belüli feldolgozást, habár iDCs sokkal hatékonyabbak ebben a prezentációban. Az iDCk képesek prezentálni az galaktozil(1-2) galaktozilceramid (α GGC)-ot (lizoszómális feldolgozást követően α GC-ré alakul).

1.2.3. Lipid antigén feldolgozás és betöltés

A prezentációhoz a lipideket el kell távolítani a sejtben belüli környezetükből (Pl. membránok), fel kell őket dolgozni és be kell őket tölteni a CD1d molekulák ligand kötő zsebeibe. Ezeket a folyamatokat hidrolázok és lipid szállító proteinek (LTPk) biztosítják. Néhány lipid részleges degradációt igényel

mielőtt antigénikussá válik. A szintetikus glikolipid α GC feldolgozását a késői endoszómákban az α -galaktozidáz hidroláz enzim végzi a terimális galaktóz eltávolításával. A lipid kivonást a lumenbe LTPk végzik elősegítve a lipidek betöltését vagy cseréjét a CD1 molekulákba az endoszómális kompartmentekben.

A CD1d lipid antigéneket a szapozinok (SapK), membrán-perturbáló szingolipid aktiváló fehérjék editálják. Az aktív szapozinok (SapA-D) a prekursor proszapozinból keletkeznek a késői endoszómákban. Ezt a folyamatot a katepszinek katalizálják (Cat). A SapK közvetlenül kötődnek a lipid antigénekhez, kivonják őket a membránokból és elszállítják a CD1 proteinekhez, míg a lipidek betöltését közvetett módon szabályozzák. A szapozin közvetített lipid prezentáció *in vivo* szerepét Sap^{-/-} egerekben mutatták ki. A Sap deficiencia iNKT hiányhoz vezetett. Az elégtelen iNKT fejlődéssel szemben, a 2-es típusú NKTK száma változatlan maradt. A CD1d kifejeződést, sejten belüli elhelyezkedését és az iNKT autoreaktivitást nem befolyásolják a SapK, de az α GC prezentációt igen. Az α GC kötődhet a sejtfelszíni CD1d-hez endoszómális recirkuláció nélkül, de a SapK fokozzák a lizoszómákban a CD1d/ α GC komplexek képződését. A Sap hiány szabálytalan lizoszómális lipidfelhalmozódáshoz, szállításhoz és cseréhez vezet a membránok között. A károsodott lipid metabolizmus lizoszómális tárolási betegségeket eredményezhet, ami befolyásolja a CD1 molekulák betöltését.

1.2.4. Lizoszómális katepszinek a DCk-ben

A lipid prezentáció függ a DCk-ben működő lizoszómális proteázoktól. A legtöbb lizoszómális proteázt Cat-ként ismerjük, melyek esszenciálisak mind a peptid és a lipid antigén prezentációhoz is. A cisztein proteázok közvetített proteolízis kritikus a DC antigén prezentáció során, szabályozzák a lipid editinget, az Ii és a proszapozin vágását a késői endoszómákban. Érési szignálok hatására a DCk magasabb lipid editálási képességre tesznek szert a fokozott lizoszómális aktivitásuk következtében (emelkedett antigén feldolgozás és lipid/CD1 komplex termelés).

A CatL, S, és B kifejeződnek a DCk-ben. Közülük eddig csak a CatL-t és S-t hozták összefüggésbe a lipid prezentációval. A CatS^{-/-} egerekben a MHCII felhalmozódik az endoszómális vezikulumokban, ami hatással lehet a CD1d membránhoz történő szállítódására. A CatS hiány csökkent sejtfelszíni CD1d-t eredményezett a timusz DCk-ben. Továbbá a sejten belüli CD1d szállítás szintén megváltozott a CatS^{-/-} egér DCk-ben. Az iNKTk nem reagáltak az α GC-re. Az iNKT szám szintén csökkent a CatL^{-/-} egerekben, de az CatS^{-/-} állatokkal ellentétben, az CatL nem befolyásolta a CD1d szintet a sejtfelszínen. A timocitákban a CatL esszenciális volt a pozitív szelekcióhoz és az enzim szerepet játszott az APC közvetített iNKT negatív szelekcióban. A CatL az APCk-ben kritikus volt iNKTk terminális differenciálódásához a periférián. Mindkét esetben a Cat proteinek hiánya gátolta azokat az endoszómális folyamatokat, amik szükségesek a hatékony CD1d közvetített antigén prezentációhoz.

A DC CatD (lizoszómális aszparaginsav proteázok) termelését korábban kimutatták. Hasonlóan a cisztein proteázokhoz, a CatD is inaktív formában termelődik, és ceramid függő autokatalízissal

aktiválódik. Az aktivált CatD-k felhalmozódnak a lizoszómákban ahol LTPk-et hasítanak, mint a proszapoizin. A CatD szerepét a lipid prezentációban korábban nem tanulmányozták.

1.2.5. CD1d-korlátozott NKTk

Ellentétben a konvencionális T sejtekkel, a T sejt receptorok (TCRk) az NKTk-en lipid antigénekre reaktívak. Ezek az egyedülálló saját reaktív sejtek mind természetes ölő sejt (NK) markereket, mind TCRk-et kifejeznek a felszínükön, ezért NKTk-nak nevezik őket. Két típusú CD1d-korlátozott NKT populáció létezik: invariáns természetes ölő sejtek (iNKTk) és a 2-es típusú NKTk. Az iNKTk egy egyedülálló, evolúcionálisan konzervált populációja a természetes immunsejteknek, melyek erősen korlátozott TCR repertoárt fejeznek ki. Ezek egy félig invariáns α láncból (V α 14-J α 18 egerekben és V α 24-J α 18 a humánban) és egy korlátozott β láncból (V β 2, V β 7, és V β 8.2 egerekben, vagy V β 11 humánban) állnak.

A periférián, aktivációjuk órákon belül jelentős citokin kibocsátáshoz vezet, mellyel más limfocitákat transzaktiválnak. Az iNKTk szerepet játszanak egy sor immunológiai releváns folyamatban, mint a DCk érleltetés, NK vagy B sejt aktiválás vagy a T sejt válasz eltérítés, ezáltal az iNKTk mind az természetes és az adaptív immunitást szabályozzák. Módosítják a folyamatban lévő immunválaszokat, így befolyásolják egy sor betegség kimenetelét (autoimmun betegségek, bakteriális vagy virális fertőzések és a daganatok).

Az iNKTk potenciális szerepét a daganat ellenes immunválaszban α GC injekcióval és számos esetben exogén lipid ligand hiányában is megfigyelték, ezzel támogatva azt az elképzelést, miszerint az iNKTk felismerhetnek endogén daganat sejt termelt antigén lipideket. Az iNKTk esszenciális szerepét J α 18^{-/-} egerekben igazolták, melyekben az adoptív transzferált iNKTk daganat ellenes védelmet biztosítottak. Daganat modelltől függően az iNKT reakciók a hatékony daganat ellenes immunitást további immunsejtek aktiválásán keresztül fejtik ki. Ez elindít egy Th1 citokin kaszkádot a daganatszövetben és a helyi effektor sejtek, mint NK és CD8⁺ T sejtek, megölik a daganat sejteket. Az iNKT aktiváció hozzájárul a DCk aktiválásához a CD1d-TCR és a CD40-CD40L interakciókon keresztül, ami DC éréshez és IL-12 kifejezéshez vezet. A kibocsátott IL-12 stimulálja az NK és az iNKT sejteket, hogy még több INF γ -t termeljenek és a két citokin együtt stimulálja az NK és a CD8⁺ T sejteket.

Ezzel ellentétben a 2-es típusú NKTk poliklonális TCR repertoárral rendelkeznek. A limitált reagens, ami monitorozná ezeket a sejteket, és a specifikus sejtfelszíni markerek hiánya, lelassította ennek az NKT populációnak analizálását. A 2-es típusú NKTk egy részének az immunfunkcióit szulfatid/CD1d tetramerekkel lehet vizsgálni. Az NKT aktiváció *in vivo* szerepét CD1d^{-/-} egerekben lehet tesztelni, amiben mindkét NKT populáció hiányzik, összehasonlítva az eredményeket a J α 18^{-/-} egerekben kapott adatokkal. A 2-es típusú NKTk felülírhatják az iNKT közvetített immunfolyamatokat. Az egér daganat modellben tapasztalt iNKT védő hatással szemben, a 2-es típusú NKTk hatékonyan csökkentették a daganat ellenes válaszokat és daganat segítő aktivitást mutattak. A Szulfatid és α GC egyidejű használat

esetében, a szulfatidra reagáló, egér 2-es típusú NKTK akadályozták az iNKT védő hatásokat. A két NKT populáció közötti immunszabályozó tengelyt, és azt, hogy a 2-es típusú NKTK a daganat növekedést az általuk kibocsátott IL-4 és IL-13 citokinekkal serkentik, számos egér modellben bemutatták.

1.3. Sejtmagi hormon receptorok

1.3.1. Sejtmagi hormon receptorok a human DCk-ben

Egy teljes génkifejeződését analizáló vizsgálat kimutatta, hogy sejtmagi hormon receptorok (peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor γ (PPAR γ) és máj X receptor α (LXR α)) kifejeződnek és indukálódnak a differenciálódó DCk-ben. Később a microarray profilozásunk feltárta, hogy a 48 sejtmagi hormon receptorból 20 kifejeződik a mo-DCk-ben. A Retinoid X receptorok (RXRk) egyedülálló a sejtmagi hormon receptorok között azzal a képességével, hogy sejtmagi hormon receptor családtagjainak egyharmadával képes heterodimert alkotni. A legtöbb esetben az RXRk obligát partnereként működnek. RXR heterodimereket funkcionálisan eltérő, megengedő és nem megengedő alcsoportokra oszthatjuk. Az RXR heterodimerek közül a PPAR γ /RXR és a RAR α /RXR heterodimerek fejlődő DCk-ben betöltött szerepét mutatjuk be.

1.3.2. A retinsav receptor szerepe a DCk-ben

A Vitamin A/retinolt és a metabolitjait kollektíven retinoidoknak hívjuk. A retinoid hiány számos humán megbetegedést idéz elő. A csupa-transz retinsav (ATRA), erősen biológiailag aktív metabolitja a retinolnak, megelőzi és helyreállítja a főbb vitamin A hiány (VAD) okozott elégtelenségeket a felnőtt állatokban. A retinoidok a célsejtben a sejtmagi retinoid receptorokon keresztül fejtik ki a hatásukat. A retinsav receptoroknak (RARk) három altípusa van (RAR α , β és γ). Az RARk heterodimereket alkotnak az RXRk-kel, melyeknek szintén három altípusa van: RXR α , β és γ . Habár az ATRA és a 9-cisz retinsav aktiválják az RARk-at, az RXR csak a 9-cisz retinsavat köti meg.

1.3.2.1. Retinoidok a célsejtekben (felvétel és szállítás)

A gerincesek nem képesek *de novo* retinol előállításra, de hozzájutnak a vitamin A-hoz a táplálékból retinil észter és karotenoidok formájában, amiket a bél enterocitái vesznek fel, majd elsődlegesen a májba szállítódnak. A retinil észterek folyamatosan hidrolizálódnak retinollá a máj raktárakból, retinol kötő fehérje 4-hez kötődnek (RBP4), ami a célszövetekhez szállítja azt. A retinol célsejtek rendelkeznek egy erősen konzervált, retinsav stimulált 6 (STRA6) transzporterrel a retinol felvételre. A sejtek talán felvehetik a retinolt a nem régiben felfedezett RBP4 receptor-2 (RBPR2)-vel is. A RBPR2 szerkezete hasonlít a humán és az egér STRA6 szerkezetéhez, ezért a receptor egy alternatív retinol felvevő receptorként működhet a STRA6 negatív sejtekben.

A sejtben a retinol a celluláris retinol kötő fehérjékhez (CRBPk) kapcsolódnak. A CRBP1 a retinolt a raktárakból a metabolizáló enzimekhez viszi, mint az alkohol dehidrogenázok (ADHk) vagy a retinol dehidrogenáz/reduktázok (RDHk), amik retinállá alakítják a retinolt. Ezután a retinál dehidrogenázok (RALDHk) ATRA-t szintetizálnak a retinálból. Az ATRA kötődik a celluláris retinsav kötő fehérje 1 (CRABP1), CRABP2 vagy a zsírsav kötő fehérje 5 (FABP5) szállító fehérjékhez. A citoszólikus CRABP2 közvetlenül a RARk-hoz szállítja az ATRA-t és fokozza a receptorok transzkripcionális aktivitását. CRABP1 mérsékli a sejt ATRA-ra adott válaszait azzal, hogy a retinoidot az ATRA lebontásáért felelős enzimekhez juttatja. A sejt ATRA szintje szigorúan szabályozott a citokróm P450 géncsalád tagjai segítségével: CYP26A1, B1 and C1. Az enzimek által létrehozott poláris metabolitok könnyen kijuthatnak a sejtekből. A *Cyp26a1* gén proximális promóter régiója tartalmaz egy funkcionális retinsav válaszadó elemet (RARE), ezért a *Cyp26a1* gén kifejeződését közvetlenül szabályozzák a RARk. Az FABP5 a PPAR β/δ -hoz szállítja az ATRA-t és aktiválja a PPAR β/δ közvetített transzkripciót.

1.3.2.2. Retinol metabolizmus

A fiziológiás hatásuk kiváltásához a retinolnak két egymást követő oxidatív reakciókon kell keresztülmennie a metabolikus aktivációhoz. Az első sebesség meghatározó lépésben a retinol retinollá konvertálódik vagy az ADHk (ADH1, 3, 4) vagy a RDHk (RDH1, RDH10) által. A sejt retinál termelő kapacitás 80-94%-a a mikroszómákba korlátozódik (a RDHk sejten belüli lokalizációja) szemben az ADHk citoszólikus lokalizációjával. Jelenleg legkevesebb három RDH járulhat hozzá fiziológiailag a retinol ATRA-vá történő konvertálódásához: RDH1, RDH10 és DHRS9. Az RDH10-t, mint csupa-*transz* retinol dehidrogenázt az RPE BX sejtekben írták le és a rMC-1 sejtek mikroszóma frakciójából izolálták. Az embrionális ATRA termelésben betöltött szerepét RDH10^{-/-} egerekben igazolták, melyek súlyos szervrendellenességben szenvednek és embrionálisan elhalnak a 13.5-dik napon. Az embrionális fejlődésben betöltött alapvető szerepét megerősítették *RARE-lacZ*-riporter transzgént hordozó egerekben, melyben a riporter gén a retinoid szignalizáció endogén helyeit térképezte fel.

A második enzimatis lépés a retinál irreverzibilis oxidációja ATRA-vá, RALDHk segítségével. Egereken végzett géndeplációs kísérletek alátámasztották a RALDHk fiziológiai hozzájárulását az ATRA termelésében, és a RALDH2 életbevágó szerepét az embrionális ATRA előállításában. Továbbá a RDH10 expresszió helyei átfednek a RALDH2 lokalizációjával, ez arra utalt, hogy a két konvertáló enzim koexpressziója szükséges lehet a fejlődő embriókban játszódó ATRA szintézishez.

1.3.2.3. DCK ATRA termelése

Számos adat igazolta, hogy különböző faktorok beindíthatják (ATRA, retinol, GM-CSF, IL-4, TLR ligandok) vagy gátolhatják (prostaglandin E2 (PGE2)) a sejtek ATRA szintézisét. Ezek a faktorok a *Raldh* géneket aktiválják, ami elengedhetetlen markere a DCK aktív ATRA termelésének. Először Iwata mutatta be, hogy a PP- és az MLN-DCK ATRA-t termelnek a retinólból, és a felszabadult ATRA

fokozza a bélbe irányító receptor CCR9 és integrin $\alpha 4\beta 7$ expresszóját a CD4⁺ T sejteken. Eredményeik alapján az *Adh5* bármelyik DC-ben kimutatható, és a PP-DCK *Adh1* and 4-et fejeznek ki. Ez arra utal, hogy ezek az enzimek felelősek lehetnek a felnőtt állatokban a retinol oxidációjáért. A PP-DCK *Raldh1*-et és kisebb mértékben *Raldh2*-et, míg az MLN-DCs *Raldh2*-et fejeznek ki a retinal konvertálására. Később kimutatták, hogy a *Raldh2* kifejeződés a GALT-asszociált DCK-ben a CD103⁺ DCK-ben dúsult fel. Hamar kiderült, hogy az ATRA szintézis nem egy univerzális DC tulajdonság és csak bizonyos DC altípusok képesek termelni ezt a retinoidot.

A DCK retinoid szintézisének fontosságát tovább erősítette a CD103⁺ DCK azonosítása a humán MLNk-ben. Ezek a sejtek érettebb fenotípussal rendelkeztek (CD83) a CD103⁻ társaikhoz viszonyítva és aktiválták a bélbe irányító marker molekulák ($\alpha 4\beta 7$, CCR9) kifejeződését a velük reagáló CD8⁺ T sejtek felszínén, ami gátlható volt az LE540-nel (RAR α antagonist). Ez arra utalt, hogy a humán DCK hasonlóan az egér DC-hez aktív ATRA termelő képességre tettek szert a LP-ban. Továbbá egy egyedülálló LP APC, makrofág szerű morfológiával és egyidejűleg kifejezett makrofág (CD14) és DC (CD209) markerekkel, antigén-specifikus immunválaszokat váltott ki ATRA közvetített szingálok segítségével. Ezek a sejtek expresszálták az RDH10 és RALDH2 enzimeket, tehát legalább néhány *in vivo* APC termelhet ATRA-t ezeknek a metabolizáló enzimek segítségével.

Végezetül széleskörű vizsgálat demonstrálta, hogy ATRA szintézis lejátszódik extra intesztinális szövet eredetű DCK-ben a tüdőben és a bőrben. Meglepetésként, a RALDH aktivitást a CD103⁻ migráló bőr DCK-ben detektálták, míg a z tüdő ATRA termelő sejtei között CD103⁺ és CD103⁻ altípusokat is találtak. Ezek az adatok összességében bemutatták, hogy az ATRA szintézis képessége nem korlátozódik az intesztinális DCK-re, néhány migráló DC altípus termel ATRA-t egyéb perifériás szövetekben is.

1.3.3. PPAR-ok a DC biológiában

A DCK kifejezik a PPAR-okat. A PPAR családnak három izotipsa ismert: PPAR α , δ/β és γ . Ezek a receptorok eltérő szövetspecifikus eloszlást mutatnak, eltérő funkcionális tulajdonságokkal. A sejtmagban a közvetlen transzkripcionális aktivációhoz, a PPAR-ok heterodimerizálnak az RXRk-kel és hozzákötődnek a célgénjeik promóterében vagy enhanszerében lévő receptor specifikus válaszadó elemeikhez (PPREk). Az alapvető metabolizmusban betöltött szerepe mellett a PPAR γ részt vesz immunfolyamatok szabályozásában is. Az ötletet, hogy transzkripcionálisan integrálhatja a lipid metabolizmust és a gyulladásos válaszokat DCK-ben egyre növekvő számú bizonyíték támasztotta alá.

In vitro kísérletek kimutatták, hogy a receptor funkcionális a DCK-ben, és szerepet játszik a sejtek altípus specializációjában és a sejtek immunfenitípusának kialakításában. Habár a receptor nem fejeződött ki minden DC-ben legalább bizonyos altípusok expresszálták *in vivo*.

Először egy átfogó microarray analízis tárta fel, hogy a PPAR γ gén bekapcsolódik a monocita-DC fejlődés során. Később a PPAR γ expresszióját mások is megerősítették. *In vitro* és részben *in vivo* adatok alapján a receptor szupresszor TF-ként működik a sejtekben gátolva az egér és a humán DCK

immunfenotípusának számos részletét. A PPAR γ humán DC funkciókra kifejtett további szerepének tisztázására egy megfelelő *in vitro* modell rendszer szükséges, melybe a sejtek rendelkeznek a receptorral. Humán PPAR γ^+ DCk differenciálthatók a CD34 $^+$ hematopoietikus őssejtekből, CD14 $^+$ perifériális monocitákból vagy CD1c $^+$ DCk-ből. Laboratóriumunk korábbi adatai alapján a PPAR γ expresszió azonnal detektálható volt a mo-DC differenciálódás egy keskeny szegmensében. A PPAR γ fehérje kimutatható volt a 4 órát tenyésztett sejtekben. A receptor aktív volt a sejtekben, mivel agonista ligandjai indukálták a receptor célgénjét az FABP4-et. A teljes körű PPAR γ szabályozott génexpressziós profilt a mo-DC differenciáció folyamata során microarray vizsgálattal karakterizáltuk. Ezek az adatok kimutatták, hogy a PPAR γ nem egy egyszerű gátló TF a DC differenciáció szempontjából, mivel a több mint 1000 szabályozott transzkript fele indukálódott a RSG (rosiglitazone-PPAR γ aktivátor ligand) kezelt mintákban. A receptor aktivált gének az első 6 órás periódus alatt elsősorban a lipid metabolizmus és transzport géneket tartalmazzák és valószínűleg transzkripcionálisan szabályozza őket a receptor. Ezzel ellentétben az immunfunkcióért felelős gének elsősorban a későbbi fejlődési szakaszukban aktiválódtak. Ez arra utalt, hogy a PPAR γ indirekt módon változtathatja meg a DC genotípusát a sejten belüli lipid metabolizmus és szignalizációs útvonalak aktiválásán keresztül.

1.4. A retinoid útvonal RAR α és PPAR γ függő koordinált szabályozása DCk-ben

A PPAR γ és a RAR α szabályozzák a lipid antigén prezentációban szereplő gének aktivációját (CD1a és d) az mo-DCk-ben. Megerősítettük, hogy mindkét receptor az általuk fokozott CD1d expresszió keresztül fejt ki a hatását a DCk lipid prezentációjára.

Irodalmi adatok szerint szérumból származó ligandok a mo-DCk fejlődését a CD1a $^+$ sejtek irányába vezetik. Humán szérumból származó lipidek (lizofoszfátidil sav és kardioplipin) módosították az 1-es csoportba tartozó CD1 molekulák expressziós profilját. A CD1 molekulákat a PPAR γ -n keresztül szabályozták ezek a lipidek. A humán szérummal kiegészített médiumban differenciáltatott DCk CD1d-t fejeztek ki PPAR γ és RAR függő módon. A DCk lipoprotein kezelése szintén befolyásolta a CD1 expressziót. Ez arra utalt, hogy a lipoproteinekkal felvett lipidek a sejtekben endogén PPAR γ ligandként viselkedhettek, transzkripcionális folyamatokat indítottak el, koordinálva a lipid metabolizmust, CD1 molekula expressziót és a sejtek immunfenotípusát.

A PPAR γ közvetett módon indukálta a CD1d kifejeződést, endogén lipid aktivátor termelésének beindításán keresztül a fejlődő DCk-ben. Egy teljes körű génexpressziós analízissel összehasonlítottuk a kontroll és RSG-kezelt mintákban azoknak a géneknek a kifejeződési mintázatát, melyek szerepet játszhatnak a retinol -, retinál metabolizmusban és a retinóból történő endogén ATRA szintézisben. A receptor indukálja a RDH10 és DHRS9 expresszióját a sejtek fejlődése esetében. A RSG kezelés indukálta a RALDH2 kifejeződését a sejtekben. Meghatároztuk a sejten belüli ATRA koncentrációt kontroll és RSG kezelt DCk-ben LC-MS technikával. A DCk együttes kezelése a RSG-nal és DEAB RALDH gátlószerrel alátámasztotta, hogy a PPAR γ indukált ATRA termeléshez RALDH aktivitás volt

szükséges. Az ATRA felhalmozódása RAR α /RXR kiváltott retinoid válaszokhoz vezetett. Körülbelül a PPAR γ regulált gének 30%-ának a szabályozása történt a retinoid szignalizáción keresztül.

Mindkét sejtmagi receptor aktivációja fokozott iNKT osztódáshoz vezetett α GC töltött DCk esetében. A PPAR γ indukált CD1d kifejeződés a DCk hatékony lipid prezentációján keresztül fokozott iNKT aktivációhoz vezetett. Ezek az eredmények összekapcsolták a PPAR γ -t és a RAR α -t az iNKT közvetített immunválaszokkal.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A DC differenciálódási folyamat során a sejtekben található számos gén kifejeződése emelkedik vagy csökken. Ennek a génexpresszióknak a szabályozásához a növekedési faktorok, jelátviteli utak és a TF-ok koordinált hálózata szükséges. A környezeti faktorok, mint például a lipidek a sejtekben jelátviteli útvonalak beindításán keresztül olyan TF-kat szabályoznak, melyeknek alapvető szerepe van a DCk funkcióját meghatározó gének kifejeződésének szabályozásában és koordinálásában. Korábban kimutattuk, hogy a PPAR γ útvonal az ATRA termelésén keresztül megváltoztatta az mo-DCk lipid metabolizmusát, ami azt követően fokozott lipid prezentálásra képes DC típus specializációt eredményezett. A tudományos erőfeszítések ellenére, permisszív sejtípus, az ATRA termelés pontos komponensei és a CD1d támogatott lipid prezentáció lépései még mindig nem teljesen feltérképezettek a DCk-ben.

Ezért munkánk céljai a következők:

- 1, Az permisszív egér DCk beazonosítása génexpressziós analízissel: retinol felvételért felelős gének, valamint az ATRA termelésében és a retinoid jelátvitelben szereplő gének vizsgálatán keresztül.
- 2, Humán DC altípusok ATRA bioszintézisének és jelátvitel útjainak szisztematikus analízise.
- 3, Az *in vitro* mo-DCk funkcionális validálása, mint megfelelő modell rendszer, melyben tanulmányozható a PPAR γ szabályozott ATRA termelés, a retinoid útvonalak és a lipid prezentáció.
- 4, A PPAR γ szerepének meghatározása az ATRA szállításában.
- 5, A PPAR γ szabályozott ATRA jelátvitel tanulmányozása a humán szövetekben.
- 6, A PPAR γ aktivált RDH10 és CRABP2 funkcionális vizsgálata és mechanisztikus szinten szükséges jelenlétének alátámasztása siRNS technikával a receptor által szabályozott ATRA jelátvitel eredményeként megvalósuló génexpressziós változásokban.
- 7, Olyan eddig fel nem tárt utak azonosítása, amin keresztül a PPAR γ stimulálja az iNKT osztódást.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Ligandok

A sejteket az alábbi ligandokkal kezeltük: RSG és GW9662 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), ATRA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), AGN193109 (Roshantha A. S. Chandraratna-tól), AM580 (Biomol, Hamburg, Germany), DEAB (Fluka, Honeywell, Morris Plains, NJ, USA), pepstatin A és OVA 257-264 peptid (Innovagen, Lund, Sweden), bafilomycin (Sigma-Aldrich). α GC (Kirin Brewery Ltd., Gunma, Japan), α GGC (P.A. Illarionov-tól). Kontroll kezelés (1:1 of dimetil-szulfoxid/etanol).

3.2. Csontvelői eredetű DCK

A csontvelői sejteket a C57BL/6 egerek combcsontjából izoláltuk. Az állatokat speciális patogénmentes környezetben tartottuk. A kísérletek az intézményi etikai iránymutatások és engedélyek alapján történtek (engedélyszám: 21/2011/DEMÁB). A csontvelői sejteket RPMI 1640 médiumban differenciáltattuk (Sigma-Aldrich) kiegészítve: 10% magzati borjú szérum (FBS), 500 U/ml penicillin/streptomycin, 2 nM L-glutamin (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA), 20 ng/ml GM-CSF (PeproTech EC, London, UK) és 20 ng/ml IL-4 (PeproTech) vagy csak 20 ng/ml GM-CSF jelenlétében 9 napig. A citokinkezelést megismételtük a 3. és 6. Napon. A 9. napon a sejteket Trizol reagensben (Thermo Fisher scientific) lizáltuk RNS izolálásra.

3.3. Lép DC (Sp-DC) and mezenterikus nyirokcsomó DC (MLN-DC) szeparálás

A CD11c⁺ MLN-DCk-et B16-Flt3L tumor sejtekkel oltott hím C57BL/6 állatokból izoláltuk. A összegyűjtött lépeket és MLNk-t feldaraboltuk és kollagenáz D-vel emésztettük (Roche, Basel, Switzerland) 40 percig 37°C-on. A szuszpenziókat nylon hálón átszűrük és mostuk. A sejteket 10 percig 4°C-on inkubáltuk anti-egér CD16/CD32 Mouse BD FC Block ellenanyaggal (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). A CD11c⁺ sejteket anti-CD11c MACS gyönggyel szeparáltuk (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD103⁺ és CD103⁻ DCk szelektálását anti-CD11c-APC és anti-CD103-PE (BD Biosciences Pharmingen) antitesttel történt jelölést követő szortolással FACS Vantage (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük.

3.4. DC/lépsejt kokultúra

CD103⁺ MLN-DCk-et az előző pontnak megfelelően izoláltuk (3.3). A lépsejteket BALB/c egerekből nyertük. A lép Petri edénybe tettük 10% FBS-t tartalmazó RPMI 1640 médiumba, üvegbottal szétnyomtuk. Mosást követően a vörösvértesteket lízis pufferben lizáltuk (BD Pharm Lyse, BD Biosciences). A DC/lépsejt arány 1:20 volt, ami 1:10 DC/T sejt aránynak felel meg 2 ml tenyésztő médium/lyuk denzitásban. 72 órát követően a CD103⁺ MLN-DCk-et a 3.3. pontnak megfelelően szortoltuk FACS Vantage géppel, majd Trizolba lizáltuk őket.

3.5. DC/CD8a⁺ T sejt kokultúra

CD8a⁺ T sejteket OTI-I egerekből nyertük (Dr. Zoltán Póstól). A lépéből sejtes szuszpenziót gentleMACS Dissociator géppel készítettük (Miltenyi Biotech). Mosást követően a sejteket CD8a⁺ T Cell Isolation Kit II-vel szeparáltuk (Miltenyi Biotech), autoMACS Separator-géppel (Miltenyi Biotech). A CD103⁺ MLN-DCk-et a korábbiaknak megfelelően izoláltuk (3.3). CD103⁺ DCk-et 20 pM OVA 257-264 peptiddel töltöttük fel. A DC/T sejt arány 1:2-volt. 72 óra elteltével a CD103⁺ MLN-DCk-et FACSVantage géppel újra szortoltuk és Trizolba lizáltuk.

3.6. Humán mo-DCk

A monocitákat (98% CD14⁺) egészséges donorokból származó, leukocitákkal feldúsított vérkészítményeiből izoláltuk, a Regionális és Intézményi Kutatói Etikai Bizottság engedélyével, a Regionális Vérellátó központból kapott vérmintákból, Ficoll gradiens centrifugálással (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Ezt követően sejteket anti-CD14-konjugáltatott microgyöngyökkel szeparáltuk (Miltenyi Biotech). A monocitákat 1.5×10^6 sejt/ml denzitásban differenciáltattuk RPMI 1640 médiumban, kiegészítve: 10% FBS, 500 U/ml penicillin/streptomycin, 2 nM L-glutamin, 800 U/ml GM-CSF (Gentaur Ltd. London, UK) és 500 U/ml IL-4. A sejteket 5 napig tenyésztettük. A ligandokat vagy a konrtoll kezeléseket a 0. és a 3. napon adtuk a sejtekhez.

3.7. Áramlási citometria

A sejteket 1X PBS-ben mostuk majd 1X PBS/0.5% borjú szérum albuminban (BSA) (Sigma-Aldrich) festettük 40 percig 4 °C-on a következő antitestekkel: anti-CD14-FITC, anti-F4/80-FITC, anti-CD11c-PE, anti-CD1d-PE, anti-CD1a-FITC, anti-CD11c-FITC, anti-CD209-PE (BD Biosciences Pharmingen) és anti-Vα24-FITC, anti-Vβ11-PE (Immunotech, Marseille, France), valamint a megfelelő izotípus kontrolljaik. A méréseket FACSCaliburral végeztük és CellQuest software-rel (BD Biosciences) analizáltuk.

3.8. Microarray analízis

A 18. és a 20-as ábrákon bemutatott microarray adatok elkészítését (DC altípusok) Szeles L. írta le. Az ábrákon található mo-DC mintákat Szatmári. I. készítette el. Az RNS minták hibridizálását a Microarray Core Facility of the European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg, Germany)-ban végezték. Az adatok elemzését GeneSpring GX7.3.1 szoftverrel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) végeztük. A Raw data file-okat (cell file-ok), a GeneChip robust multiarray analysis algorithm (GC-RMA)-sal analizáltuk a szignál intenzitások chipenkénti normalizálásával. A microarray adatok nyilvános elérhetősége: Gene Expression Omnibus adatbázis (GEO) accession no. GSE23618, accession no. GSE8658 és ArrayExpress adatbázis accession no. E-TABM-34.

3.9. Valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR)

1 µg of teljes RNS-ből reverz transzkripció PCR technika segítségével cDNS-t készítettünk a SuperScript II reverse transcriptase kit segítségével (Thermo Fisher scientific). A valós idejű PCR-t LC480 platform-on (Roche) végeztük sybr green alapú assayk vagy Taqman assayk (Applied Biosystems, Thermo Fisher scientific) felhasználásával. A gének expresszióját az összehasonlító küszöb ciklus technikával kvantifikáltuk és normalizálásra a humán és egér háztartási gént *Cyclophilin A* (*PPIA* és *Ppia*) használtuk. Minden PCR reakciót triplikálva mértünk. Az értékeket átlag $\pm$ SD-ben adtuk meg. Ezen felül, TaqMan low-density array-eket (TLDAs) (Applied Biosystems, Thermo Fisher scientific) használtunk a gyártó instrukcióit követve. A TLDA analízishez a high capacity cDNA archive Kit-tet (Life Technologies, Thermo Fisher scientific) használtuk a reverz transzkripció során. A TLDA kártyákat (RT-qPCR) real-time PCR géppel mértük le (ABI Prism 7900, Applied Biosystems, Thermo Fisher scientific).

3.10. RNS interferencia

A kis interferáló RNS-ek (siRNSk) bejuttatásához a monocitákat elektoporáltuk. Számolást követően a monocitákat fenol vörös nélküli Opti-Mem-ben (Invitrogen, Thermo Fisher scientific) szuszpendáltuk 4×10^7 sejt/ml denzitásban. A gének csendesítése a következő siRNS oligonukleotidokat alkalmaztuk: On-Target $plus$ SMART pool siRNS-eket a humán *RDH10*, *RALDH2*, *CRABP2*, *FABP4* ellen vagy On-Target $plus$ non-targeting control siRNA pool (NS)-t (Dharmacon, Lafayette, CO, USA). Az oligonukleotidokat 4 mm-es küvettákba (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) tettük 3 µM végkoncentrációban. 100 µl sejtsuszpenzót mértünk a küvettákba, óvatosan összeráztuk és 3 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az elektoporációt Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories) géppel végeztük a következő pulzus kondíciókkal: „square-wave” pulzus, 500 V, 0.5 ms. Ezt követően a sejteket RPMI 1640 médiumba tettük kiegészítve: 10% FBS, 500 U/ml penicillin/streptomycin, 2 nM L-glutamin, 800 U/ml GM-CSF és 500 U/ml IL-4. A csendesítés hatékonyságát egy vagy két nappal az elektoporációt követően teszteltük. Átlagos siRNS hatékonyság: siRDH10- 48.58 $\pm$ 8.44%, siRALDH2- 39.22 $\pm$ 10.81%, siCRABP2- 44.22 $\pm$ 9.25%.

iDC elektoporáció: a sejteket a 3. napon felszedtük, egyszer mostuk üres RPMI 1640 médiumban majd 1X PBS-ben. A pulzus kondíciók azonosak, mint a monociták esetében. Géncsengesítésére Qiagen siRNA *PPARG*, On-Target $plus$ SMART pool siRNA *CATD* vagy On-Target $plus$ non-targeting control siRNA pool (NS)-t alkalmaztunk (Dharmacon). Átlagos siRNS hatékonyság: siPPARG 60%, siCATD 60%.

3.11. Aldefluor mérés

Az mo-DCK RALDH aktivitását ALDEFLUOR Kit (StemCell Technologies Germany, Cologne, Germany) segítségével analizáltuk a gyártó instrukcióinak megfelelően. Röviden, a sejteket 1×10^6 sejt/ml denzitásban inkubáltuk a kit szubsztrátot tartalmazó pufferében 37°C-on 40 percig. A kit

specifitását DEAB használatával teszteltük. Az ALDEFUOR pozitív sejteket FACSCalibur géppel detektáltuk.

3.12. iNKT sejt expanszió

Az 5 napos mo-DCK-et 100 ng/ml α GC vagy α GGC ligandokkal 48 óráig inkubáltuk. Lipid töltött DCK-et (1×10^5) 5 napig tartottuk kokultúrában autológ PBMC-kel (1×10^6) 1:10 DC/PBMC arányban. A CatD inhibíciós kísérletekben a DCK-et 3 napig 1 vagy 10 μ M pepstatin A (Sigma-Aldrich) jelenlétében tartottuk. Alapos mosást követően a DCK-et RPMI 1640 médiumba tettük kiegészítve: 10 % FBS, 500 U/ml penicillin/streptomycin, 2 nM L-glutamin, 800 U/ml GM-CSF és 500 U/ml IL-4. A PBMC-t anti-TCR V α 24-FITC és anti-TCR V β 11-PE antitestekkel jelöltük és a dupla pozitív iNKT populációt FACSCalibur-ral monitoroztuk. Ezen felül az invariáns V α 24-J α 18 (iNKT) TCR α lánc mRNS-ét RT-qPCR-ral detektáltuk. A lizoszómális savasodást gátló kísérletekben az RSG kezelt DCK-et 4 napig 50 nM bafilomycinnel kezeltük.

3.13. Western blot

20 μ g protein teljes sejtlizátum fehérjét 12.5% poliakrilamid gélen megfuttattunk majd PVDF membránra transzferáltunk (Millipore, Merck, Darmstadt, Germany). A membránokat először anti-CRABP2 (208) antitesttel (Cecile R.-Egry-től) majd sztrippelést követően anti-GAPDH antitesttel (ab8245-100; Abcam, Cambridge, MA, USA) teszteltük.

50 μ g protein teljes sejtlizátum fehérjét 12.5% poliakrilamid gélen megfuttattunk majd PVDF membránra transzferáltunk (Bio-Rad Laboratories). A membránokat anti-CatD antitesttel (R20, sc-6487; Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, USA), majd anti-GAPDH antitesttel próbáltuk.

3.14. Immunperoxidáz festés

Monocitákat, kontroll- vagy RSG-kezelt DCK-et (6×10^6 sejt/csoport) 4% paraformaldehidben fixáltunk 4°C-on 24 órán keresztül, majd paraffinbe ágyztunk. A 4 μ m-es szekciókat 3% H₂O₂/metanolban inkubáltuk 15 percig szobahőmérsékleten az endogén peroxidáz blokkolásához. Az antigének feltárását citrát puffereben (pH 6.0, Dako, Thermo Fisher Technologies) végeztük 120 °C-on 2 percig kukában. A sejtek CRABP2 immunfestése standard ABC technikával történt. A nem-specifikus kötési helyek blokkolását követően a szekciókat elsődleges anti-CRABP2 (208) antitesttel festettük 1 órán át szobahőmérsékleten 1/50 X hígításban. A szekciókat ezután 1 órán át festettük biotinált másodlagos antitesttel (Vectastain kits, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A színreakciót VIP szubsztráttal hívtuk elő (Vector Laboratories). Végezetül a szekciókat átfestettük metilzölddel.

3.15. Kettős immunfluoreszcens festés (DI)

A DI-t formalin-fixált, paraffinbe ágyazott intesztinális szövetmetszeteken végeztük. A minták a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetének sebészeti mintáinak archívumából származtak. Az antigén feltárást követően blokkoltuk az endogén peroxidáz aktivitást. Az elsődleges antitesteket peroxidáz-

konjugált IgG-vel vizualizáltuk, tetrametil-rodamine (TMR)-teggelt tyramie (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) kezelést követően (vörös fluoreszens jel). A mintákat a festést követően mostunk, a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk és megfestettük a második molekulára specifikus elsődleges antitesttel, amit a rá specifikus biotinált másodlagos antitesttel (IgG[Fab]₂) és streptavidin-FITC (Vector Laboratories) festéssel hívtuk elő (zöld fluoreszens jel). Alapos mosást követően a sejtmagokat DAPI-t tartalmazó fedőmédiummal (Vector Laboratories) festettük meg (kék szignál).

A 35. ábrán monocitákat, DC-ket vagy RSG kezelt DCk-et (6×10^6 sejt/csoport) fixáltunk 4% paraformaldehidben 4 °C-on 24 órán át. A blokkokat parafinbe ágyasztuk. A 4 µm-es szekciókat ezt követően DI festéssel PPAR γ és CatD fehérje kimutatásra használtuk. Először a PPAR γ -t festettük anti-PPAR γ (clone E8; Santa Cruz Biotechnology) antitesttel 1/75 X hígításban 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezt HRP-konjugált anti-egér másodlagos antitesttel (IgG[Fab]₂) és FITC-konjugált tyramid (PerkinElmer Life Science) kezeléssel hívtuk elő (zöld szignál). Mosást és blokkolást követően a CatD-t a rá specifikus elsődleges antitesttel jelöltük 1 órán át szobahőmérsékleten, majd a fehérjét biotinált anti-kecske (IgG[Fab]₂) és streptavidin-Texas Red (Vector Laboratories) kezeléssel mutattuk ki.). A fluoreszcens képeket Olympus BX51 mikroszkóppal vettük fel (Tokyo, Japan).

3.16. Kevert limfocita reakció (MLR)

Stimulátor sejteknek 5 napos érett DCk-et használtunk. A DCk érésére használt citokin koktél: 10 ng/ml TNF α , 10 ng/ml IL-1 β , 1000 U/ml IL-6 (Peprotec), 1 µg/ml PGE2 (Sigma-Aldrich) és 800 U GM-CSF 24 órán keresztül. Allogén PBMC sejteket CFSE (Thermo Fisher Technologies) festékkel jelöltük 37°C-on 15 percig. Az alkalmazott DC/PBMC arány 1/20 volt. A sejtosztódást az 5. napon mértük FACSCalibur-ral.

3.17. Statisztika

A kísérletek során minden minta estében triplikát (n=3) alkalmaztunk. A kísérleteket minimum háromszor ismételtük meg. A statisztikai szignifikanciát a GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) programmal számoltuk. A szignifikancia lehetőségét Student *t* teszttel próbáltuk. Az eredményeket *p* < 0.05 esetén fogadtuk el szignifikánsnak. Standard hibásávokat (SD) mutattunk be.

4. EREDMÉNYEK

4.1. PPAR γ IRÁNYÍTOTT ATRA TERMELÉS ÉS JELÁTVITEL A DCK-BEN

4.1.1. ATRA termelés az egér DCK-ben

Hipotézisünk szerint az RDH10 lehet az elsődleges enzim, ami beindítja a retinol oxidációt, és a RDH10/RALDH2 koexpresszió határozza meg az ATRA szintézist DCK-ben. Ezt a hipotézist különböző *in vivo* és *in vitro* DC altípusban teszteltük. Az ATRA szintézisben szerepet játszó gének kifejeződését RT-qPCR-al mértük MLN-DCK-ben. Míg a *Raldh2* csak a CD103⁺ DCK-ben expresszáldott, a *Rdh10* mindkét MLN-DC populációban detektálható volt. A *Cyp26a1* a *Raldh2* génhez hasonló expressziót mutatott, ez egy a sejtekben működő negatív feedback mechanizmusra utal, ami kontrolálhatja az aktív retinoid jelátvitelt a sejtekben. Mindkét MLN-DC csoport kifejezte a *Tgm2* és a *Cd1d1* ATRA célgéneket. A várttól eltérően a gének expressziós szintje nem korrelált a sejtek ATRA termelő kapacitásával.

A további expressziós analízisek során *ex vivo* differenciált DCK-ben tanulmányoztunk. ATRA termelésre képes GM-CSF-DCK-et vagy GM-CSF+IL-4-DCK hoztunk létre csontvelői sejtekből. Az analízis során Sp-DCK-et használtuk negatív kontrollként, mivel ezek a sejtek nem termelnek ATRA-t. A GM-CSF kiváltotta a *Raldh2* expressziót, a két citokin ismert szinergista hatását szintén megerősítettük, míg a *Raldh2* mRNA a Sp-DCK-ben alig volt detektálható. Ezt követően az *Rdh10*-zet vizsgáltuk az *in vivo*- és *ex vivo* generált sejtekben és azt találtuk, hogy a gént minden DC típus expresszálta. Minden DC típus kifejezi a *Cd1d1*-t, ami nem korrelál a retinoid jelátvitellel, míg a *Cyp26a1* és *Tgm2* megbízható markerei lehetnek az aktív retinoid jelátvitelnek a sejtekben.

Továbbá felmértük a retinol felvételben és celluláris szállításban részt vállaló géneket. Nem tudtunk kvantifikálni a Stra6-ot a DCK-ben, de detektáltuk a *Rbpr2* gént az összes DC típusban, jelezve a retinol felvétel lehetőségét ezen receptorok keresztül. Felmértük a celluláris interakciók szerepét allogén lépsejt/CD8⁺ T sejtekkel, a *Crabp2* és *Rbpr2* génexpresszióra, együtt tartva őket *ex vivo* DCK-kel. A kokultúrákban, mind a *Crabp2* és a *Rbpr2* is indukálódott a CD103⁺ DCK-ben, legvalószínűbben a T sejtekkel történő interakciójuk hatására. Megerősítettük a sejtes interakciók szerepét a *Crabp2* expressziójára a CD103⁺ MLN-DC/CD8a⁺ T kokultúra kísérletekben is.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy az ATRA bioszintézis nem egy univerzális DC marker és hipotézisünkkel megegyezően az *Rdh10* expressziója átfed a *Raldh2* gén expresszióval az ATRA termelő DCK-ben.

4.1.2. A retinoid szintézis karakterizálása a humán DCK-ben

CD103⁺ DCK jelen vannak a humán intesztinális MLNk-ben, az egér CD103⁺ MLN-DCK-re hasonló tulajdonságokkal. A korábbi adatok ellenére, a humán DCK fenotípusa nem egyezik meg és nem könnyen egyeztethető az egér ATRA termelő DC-ivel. Ezért fontoltuk meg a humán mo-DCK használatát a retinoid jelátvitel mechanisztikus karakterizálásra, funkcionális tesztek segítségével. Microarray adat szett analízisével, összehasonlítva az mo-DCK és *iv vivo* DC altípusok génexpressziós

profilját bebizonyítottuk, hogy ezek az *ex vivo* DCk hűen megismétlik a humán *in vivo* DCk tulajdonságait. A mo-DCk CD11c⁺/CD209⁺ pozitívak, így fenotípusuk is hasonlítanak az *in vivo* DCk-re. Ezután megvizsgáltuk a génexpressziós profilját egy kiválasztott géncsoportnak, amik hozzájárulnak az ATRA szintézishez és jelátvitelhez. Az *RDH10* kifejeződött a DCk-ben. Mind a *RALDH1* és 2 magas szinten fejeződött ki az *in vitro* DCk-ben, míg egy moderált expressziós szint volt detektálható a dermális DCk-ben. A celluláris ATRA-t szállító gének közül, a *CRABP2* mindenhol megtalálható. A retinoid jelátvitelt a célgén expressziós mintázatának elemzésével analizáltuk: tonzilláris CD11c⁺, vér CD11c⁺ és mo-DC expresszálta a *CD1D*-t és a *TGM*-t. A *PPARG* csak az mo-DCk-ben fejeződött ki. A detektálható *FABP4* valószínűleg vagy egy extracelluláris PPAR γ ligand jelenlétét jelzi a szérumban vagy potenciális endogén ligandot jelezhet a sejten belül. Az *in vivo* DCk nem fejezik ki a *PPARG*-t vagy az *FABP4*-et. A szisztematikus analízis alapján a retinoid jelátvitel csak az mo-DCk-ben aktív, melyek együtt fejezik az *RDH10*-t és a *RALDH2*-t és ezekben a sejtekben a PPAR γ útvonal kapcsolódik a retinoid jelátviteli útvonalakhoz.

A microarray adatok validálására, kvantifikáltuk az ATRA szintézisben szereplő gének transzkripcionális változásait (*RALDHk*) a teljes differenciálódási periódus során RT-qPCR-rel. A vártan megfelelően a RSG kezelés indukálta *RDH10* expressziót 6 óra elteltével, jelezve, hogy a PPAR γ ezt a gént direkt molekuláris interakción keresztül szabályozhatja. Az *RDH10* kifejeződése a PPAR γ ligand kezelt mintákban folyamatosan emelkedett a differenciációs folyamat során. A *CRABP2* és *TGM2* gének 24 óra után indukálódtak a RSG kezelt mintákban és a korábbi eredményeinknek megfelelően és a fokozott *CD1D* transzkripció is megfigyelhető volt a RSG kezelt mintákban. A *PPARG* azonnal indukálódott a differenciálódó sejtekben, a legmagasabb expressziós szint 6 óránál volt detektálható, majd valamennyire alacsonyabb szinten mérhető volt a DCk-ben. Az *FABP4* hasonló expressziós mintázatot mutatott, mint az *RDH10*.

Összefoglalva az ATRA termelés és jelátvitel nem egy univerzális tulajdonsága a humán DCk-nek. Bebizonyítottuk, hogy a mo-DCk rendelkeznek minden olyan komponenssel, amik szükségesek az ATRA termeléshez és szállításhoz. Ez az ATRA termelő képesség fokozható a *RDH10*, *RALDH2*, és *CRABP2* koordinált indukációjával.

4.1.3. PPAR γ szabályozott CRABP2

Megvizsgáltuk, hogy vajon a celluláris ATRA szállítás is a PPAR γ szabályozása alatt állhat-e az mo-DCk-ben. A PPAR γ aktiváció indukálta a *CRABP2* transzkripciót. Monociták nem fejezik ki ezt a szállító molekulát, a kontroll kezelt mo-DCk detektálható CRABP2-val rendelkeznek, amit erősen fokoz a RSG. IHC-val szintén megerősítettük a fokozott CRABP2 kifejeződést. Feltételezzük, hogy a megnövekedett CRABP2 szint a PPAR γ ligand kezelt DCk-ben hozzájárulhat a fokozott ATRA válaszokhoz. További vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy a PPAR γ szabályozza-e a CRABP2 függő sejtmagi transzport szintjét is a sejtekben.

4.1.4. PPAR γ , RDH10, RALDH2, CRABP2 és TGM2 együttes kifejeződése a humán GALT-DCK-ben

Eredményeink fiziológiai fontosságának igazolására szisztematikusan feltérképeztük az ATRA bioszintézis és jelátvitel komponenseit a humán GALT-ban DI-val. Az intesztinális GALT-ot választottuk, mivel ez a legvalószínűbb szövet ahol a lipidek hozzájárulhatnak a DC differenciációhoz és altípus specifikációhoz a bélben. A DI igazolta, hogy a PPAR γ részben koexpresszálódik a DC-SIGN-nal a mukózális limfoid szöveti sejtekben, amik DC fenotípussal rendelkeznek. A PPAR γ /TGM2 koexpresszáló sejtek valószínűleg GALT-DC populációkat reprezentálnak hasonlóan a PPAR γ /DC-SIGN pozitív sejtekhez. Az adatok arra utalnak, hogy az egészséges bélben a limfoid szövetekben néhány PPAR γ pozitív DC TGM2-t expresszál egyszerre, így a PPAR γ szabályozhatja az ATRA függő transzkripciót akár *in vivo* körülmények között is.

Ugyanebben a szövetben néhány PPAR γ pozitív sejt az RDH10-t, RALDH2-t vagy a CRABP2-t is kifejezi. Az RDH10, a RALDH2, és a CRABP2 a DC-SIGN-nal együtt is detektálható néhány mukózális DC-ben. Ezek az adatok összességében erősen azt sugallják, hogy az ATRA termelés alap komponensei és a PPAR γ együtt fejeződik ki a mukózális limfoid szövet néhány APC-jében.

4.1.5. Fokozott RALDH aktivitás a PPAR γ ligand kezelt mo-DCK-ben

Funkcionális bizonyítékkal szeretnénk volna alátámasztani, hogy az ATRA bioszintézis megtörténik az mo-DCK-ben. LC-MS technikával korábban igazoltuk, hogy mo-DCK képesek ATRA szintézisre PPAR γ függő módon. Célunk tűztük ki, hogy tovább vizsgáljuk ezt az eredményt ALDEFLUOR teszttel, ami képes detektálni a RALDHk intracelluláris enzimaktivitását. Az mo-DCK-et 5 napig differenciáltattuk, majd az RALDH aktivitást áramlási citometriával vizsgáltuk. 8%-nyi RALDH aktív sejt volt a kontroll mintákban. RSG jelenlétében a RALDH aktív sejtek száma körülbelül 40%-ra emelkedett. Az enzimaktivitás ezekbe a sejtekben sokkal magasabb volt, mint azokban a sejtekben, amik a kontroll mintában pozitívak voltak. A RSG/GW9662 mintákban, a RALDH aktivitás hasonló a kontroll DCK-éhez.

Megvizsgáltuk a RALDHk aktivitását mo-DCK-ben, amiket monocita állapotban elektroporáltunk specifikus siRNS-ekkel: siRDH10, siRALDH2, siCRABP2 és NS. Az ötödik napon lemértük az ALDEFLOUR aktivitást. Az eredmények alapján a RALDHk aktívak mo-DCK-ben, és a sejtekben megemelkedett enzimaktivitás PPAR γ függő.

4.1.6. PPAR γ fokozta RAR jelátvitel/génkifejeződés a RDH10, RALDH2 és CRABP2 molekulákon keresztül

Feltételeztük, hogy a RDH10, RALDH2, és CRABP2 szükséges lehet a PPAR γ szabályozott ATRA termeléshez és génkifejeződéshez. Farmakológiai analízisek kimutatták, hogy a RALDH2 fontos a PPAR γ által fokozott retinoid jelátvitelben. Folytattuk ezeket a kutatásainkat annak meghatározásával, hogy az oxidáló enzimek és a CRABP2 mechanikai szinten is nélkülözhetetlenek-e a PPAR γ által

indukált retinoid szabályozott génkifejeződéshez. Ezt a hipotézist siRNS technikával tanulmányoztuk. Monocitákat *RDH10*, *RALDH2*, vagy *CRABP2* és *FABP4* (kontroll) génekre specifikus siRNS-sel elektoporáltunk. A RSG kezelést követő 24 vagy 48 óra elteltével RT-qPCR-al mértük a *CD1d* és *TGM2* géneket. PPAR γ által fokozott *CD1d* mRNS az *FABP4*-specifikus siRNS kivételével minden esetben csökkent. Hasonló változást láttunk *TGM2* gén esetében 24 óránál, de 48 óránál csak az *RDH10*-re specifikus siRNS csökkentette le a kontroll mintához képest szignifikánsan a gén expresszóját.

Ezt követően az *RDH10*-re specifikus siRNS hatását FACS analízissel mértük. Az *RDH10*-re specifikus siRNS tranziens transzekciója lecsökkentette a RSG indukált CD1d szintet a DCk felszínén és ez a csökkent CD1d szint még öt nappal az elektoporálást követően is detektálható volt.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PPAR γ által fokozott retinol átalakulást az *RDH10* hajtja végre az mo-DCk-ben. Az így termelt retinált a *RALDH2* alakítja ATRA-vá. A fokozott retinoid jelátvitel sokkal hatékonyabb a *CRABP2* ATRA szállító jelenlétében. A magban az ATRA a RAR/RXR heterodimeren keresztül fog célkéneket szabályozni az intergált PPAR γ -RAR szignálok következtében.

4.1.7. A PPAR γ fokozott iNKT osztódás csökken a *RDH10*, *RALDH2*, vagy *CRABP2* csendesítésével

Annak meghatározására, hogy az *RDH10*-nek szerepe lehet-e az APCk PPAR γ függően fokozott iNKT szaporodást kiváltó képességére, si*RDH10*-zel *elektroporáltuk* a monocitákat. A sejteket mo-DC-vé differenciáltattuk DMSO/etanol (kontroll) vagy RSG jelenlétében, feltöltöttük α GC-rel és 48 órán át együtt tenyésztettük autológ PBMCK-kel. Az iNKT osztódást a V α 24/V β 11 dupla festéssel monitoroztuk. A vártan megfelelően fokozott iNKT szaporodást detektáltunk a RSG kezelt és NS siRNS-sel transzfektált mintákban, míg csökkent iNKT osztódás volt kimutatható az *RDH10* siRNS-sel kezelt mintákban.

Az invariáns V α 24-J α 18 (iNKT) TCR α marker gén mRNS kifejeződése korrelál az iNKTk sejtfelszíni V α 24 és TCR V β 11 TCR-ével. Az *RDH10*, *RALDH2*, és *CRABP2* specifikus siRNS-ek csökkentették a normalizált TCR V α 24 mRNS szintet a RSG kezelt mintákban.

Az eredmények fejezet második fele a PPAR γ szabályozott CatD humán mo-DCk-ben betöltött szerepét mutatja be. Ezt a projektet Dr. Britt Nakken és Dr. Varga Tamás koordinálta.

4.2. PPAR γ szabályozott katepszin D (CatD) szükséges a DCk lipid antigén prezentációjához

4.2.1. PPAR γ szabályozott CatD kifejeződése a human mo-DCk-ben

Az volt a célunk, hogy feltárjuk, hogy hogyan képes a PPAR γ az mo-DCk-ben szabályozni a lipid antigén prezentálást a CD1d molekulák expressziójának fokozásán kívül. Ha a receptor egy ideig nem definiált mechanizmus segítségével tudja fokozni a lipid prezentációt, akkor annak génexpressziós változások szintjén jelentkeznie kell a PPAR γ ligand kezelés hatására a sejtekben. Korábbi microarray eredményeinkben összehasonlítottuk a differenciálódó DCk génexpressziós profilját a 6, 24 és 120 óras

időpontokban a kontroll vagy RSG kezelt minták esetében. Ez az analízis kimutatta a PPAR γ függő szabályozást olyan gének esetében, amik szerepet játszanak a lipid antigén prezentációban.

A CatD, L, és S lizoszómális proteázok fokozott expressziót mutattak a RSG kezelt mintákban. A microarray eredmények alapján a PPAR γ fokozta a *CATD* mRNS szintjét az mo-DCK-ben. A RT-qPCR adatok egy robosztus *CATD* szint emelkedést mutattak az RSG kezelt mintákban.

Western blot adatok is megerősítették fehérje szinten a CatD PPAR γ függő emelkedését. Továbbá, DI eredmények demonstrálták a magi lokalizációját a PPAR γ -nak és a citoszolikus lokalizációját a CatD-nek a RSG kezelt sejtben.

Azért, hogy tovább bizonyítsuk a *CATD*, farmakológia módszerekkel kiváltott, PPAR γ függő kifejeződését, elektroporációval csendesítettük a PPAR γ -t a differenciálódó mo-DCK-ben. A *CATD* PPAR γ függő emelkedése jelentősen csökkent az siPPAR γ esetében a NS siRNS-sel transzfektált mintákhoz képest. Ezek alapján az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a PPAR γ szabályozza a CatD-t.

Hogy meghatározzuk a pontos molekuláris komponenseit annak az útnak, ami PPAR γ aktivációtól a *CATD* fokozódásához vezet, megvizsgáltuk a retinoid útvonal szerepét *CATD* szabályozásában. A *CATD* indukcióhoz szükséges utakat az *FABP4* és a *TGM2* kifejeződési szintek mérésével vizsgáltuk, melyek a PPAR γ vagy a RAR α szabályozása alatt állnak. Mindkét receptor specifikus ligand fokozta a *CATD*-t. Adataink arra utalnak, hogy a *CATD* többféle sejtmagi receptor szabályozása alatt áll a fejlődő DCK-ben, a PPAR γ és a RAR is kontrolálja egymástól függetlenül.

Feltételeztük, hogy a CD1d kifejeződésének fokozása nem az egyetlen mechanizmus, amivel a PPAR γ fokozni képes az iNKT expansziót. A PPAR γ siRNS-sel kiváltott csendesítése a receptornak három napos stádiumban, nem változtatta meg a CD1d transzkripció szintjét a DCK-ben. Az iNKT aktiváció szabályozása még mindig detektálható ezek alatt a kondíciók alatt, arra utalva, hogy a PPAR γ útvonal az mo-DCK-ben más molekulák szabályozásán keresztül is fokozza az iNKT szaporodást, mint pl a CatD. Ez eredmény egybevág a korábbi adatainkkal, miszerint a CD1d közvetett, kései célpontja a PPAR γ -nak.

4.2.2. Az CatD gátlása csökkent iNKT osztósást eredményez a lipid antigénnel szemben a CD1d kontextusában történő lipid antigén prezentációban fontos lizómális folyamatok csökkenésén keresztül

A CatD lipid antigén prezentációban, iNKT sejt stimulációban betöltött szerepét pepstatin A CatD inhibitorral teszteltük. α GGC használatakor a RGS kezelt mo-DCK-nek jelenősen fokozódik az iNKT aktiváló képessége. A pepstatin A dózis függő módon szorította vissza az α GGC indukált iNKT sejt osztódást a RSG kezelt mo-DCK esetében.

A lipid antigén prezentációban szereplő endoszómális folyamatok nagyrészt feltárára várnak. A lizoszómális savasodás gátlása bafilomycin használatával a RSG-nal kezelt mo-DCK-ben teljesen lecsökkentette az iNKT osztódást az α GGC perkurzor ligand esetében, míg az α GC-t nem érintette. Ez

arra utal, hogy a PPAR γ olyan endoszómális folyamatokat is tud fokozni, ami szerepet játszik a hatékony lipid prezentálásban és a fokozott iNKT gyarapodásban. Továbbá kimutattuk, hogy csak az α GGC- indukált iNKT osztódás volt érzékeny a pepstatin A-val szemben, kiemelve a CatD funkcióját a lizoszómális antigén feldolgozás során.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az egér DCk ATRA termelése

A bél működése DC-ket szabályozza az intesztinális homeosztázist. Számos ehhez kapcsolódó DC funkció az ATRA szigorú szabályozása alatt áll. A bélbe történt migrációt követően speciális DC típusok képesek lesznek érzékelni és válaszolni az ATRA-ra, ami gyulladást csökkentő fenotípusúvá alakítja a sejteket. Célunk az ATRA termelés további kulcs szabályozó elemeinek azonosítása és validálása volt az egér DCk-ben. Az retinolt retinállá alakító enzimet még nem vizsgálták az ATRA termelő DCk-ben. Mi az RDH10-re fókuszáltunk, ami kulcs enzim lehet a retinol metabolizmus elindításában. Mivel az RDH10 expressziója a sejtek ATRA termelő képességétől függetlenül minden DC altípusban mérhető volt, az *Rdh10* és *Raldh2* átfedő kifejeződése arra utal, hogy az RDH10 lehet felelős a kezdeti retinol-retinállá való oxidációért az ATRA termelő DCk-ben. Az RDH10 enzimatis aktivitását ezekben a sejtekben tanulmányozni kell.

Magát az ATRA szintézist szabályozhatják sejtmagi hormon receptor által vezérelt szignálok. A human DCk-kel ellentétben a PPAR γ nem indukálja szignifikánsan a *Raldh2* kifejeződést az Flt3L jelenlétében fejlődő BM-DCk vagy a tisztított Sp-DCk-ben az IL-4 vagy GM-CSF kezelések nélkül. Ez a különbség az egér és a humán adatok között tükrözhet faji különbségeket, de ezeket még tisztázni kell. Ezek az adatok óvatosságra intenek, amikor egér adatokat akarunk extrapolálni az ATRA szabályozott jelátvitel manipulálására annak érdekében, hogy hatékony immunválaszt váltsunk ki az emberi bélben.

5.2. ATRA termelés a humán DCk-ben

Az ATRA szintézis az emberi intesztinális DCk-ben kevésbé vizsgált. Az egér bél DCk-kel ellentétben az ATRA termelés nem korlátozódik a CD103⁺ sejtekre a human DCk esetében. Mind a CD103⁻/SIRP α ⁺ és a CD103⁺/SIRP α ⁺ DCk magas RALDH aktivitással rendelkeznek, míg a CD103⁺/SIRP α ⁻ DCk-nek szignifikánsan alacsonyabb RALDH aktivitásuk van. Az ATRA szintézis a humán vékonybél disztális részeiből származó, vagy a vastagbél szövetekből izolált DCk-ben is kimutatható. Az RDH10, DHRS9 és RALDH2 kimutatható a szöveti DCk-ben. Ez arra utal, hogy a humán intesztinális mieloid DCk komplett enzimatis rendszere tesznek szert az ATRA retinoltól történő oxidálására. Mindegyik DC kifejezi a CCR7-t, ami arra utal, hogy ezek a populációk elvándorolhatnak a bél organizált limfoid szöveibe, ahol naív T sejteket aktiválhatnak.

Laboratóriumunk korábban kimutatta, hogy a PPAR γ szabályozott lipid metabolikus útvonalak hozzájárulhatnak a DCk megváltozott immunfunkcióihoz. A sejtmagi receptor aktiválódása olyan gének

expresszójának fokozásával, amik szükségesek az endogén ATRA szintéziséhez, egy olyan transzkripció programhoz vezet, ami megváltozott lipid metabolizmussal párosul. A RSG kezelt DCk magasabb szinten expresszálják az *RDH10* és a *RALDH1/2* mRNSt, ezek a kulcs enzimek valóban PPAR γ függő módon fejeződhetnek ki ezekben a sejtekben. Ezt követően a *de novo* termelt ATRA a PPAR γ által fokozottan kifejezett CRABP2 szállító molekulákkal jut a sejtmagba, hogy aktiválja az RAR α receptort.

Adadataink olyan traskripcionális folyamatokra utalnak a humán mo-DCk-ben, amik fokozzák a *CD1D* gén expresszióját, amit koordináltan szabályozott a PPAR γ és az RAR α receptor. A PPAR γ szabályozott ATRA jelátvitel következménye a CD1d lipid antigén prezentáló molekula megjelenése a sejt felszínén és a sejtek fokozott lipid antigén prezentáló képessége. Azért, hogy közvetlen bizonyítékot szolgáltatassunk arra, hogy az elsődleges enzim a *de Novo* ATRA termelésben valóban az *RDH10* és, hogy a PPAR γ indukált ATRA jelátviteli útvonalhoz szükséges a *RALDH2* és a *CRABP2*, siRNS alapú géncsendesítő módszert használtunk. Ezek az eredmények alátámasztották a korábbi adatainkat, és egy még részletesebb analízist biztosították a PPAR γ indukált *de novo* ATRA termelés, szállítás és lipid antigén prezentáció komponenseinek, molekulás szintű bizonyítékokkal.

Adataink arra utalnak, hogy az ATRA termelés eltérően szabályozódhat az egérben és az emberben, valamint, hogy az *RDH10* expresszió egy fontos ellenőrzési pontként szolgálhat az humán DCk ATRA szabályozásában.

5.3. A PPAR γ függő ATRA szállítás a DCk-ben

A TLDA eredmények alapján a CRABP2 alig vagy nem detektálható az egér DCk-ben. DC/T sejt kokultúrák kísérletekben azt találtuk, hogy a T sejt/DC kölcsönhatás lényeges faktor lehetnek a mukózális környezetben az APCk CRABP2 termelésében.

A mi humán mo-DC rendszerünkben a PPAR γ aktivációja a CRABP2 expresszióját okozta a kultúrában tartott DCk-ben. A receptor aktivációja szerepet játszhat a retinol aktív metabolitjának sejtmagba való szállítódásában. A közvetlen bizonyíték a receptor által fokozott, CRABP2 közvetített magi ATRA szállításra még további kísérleteket igényel.

5.4. PPAR γ and retinoid jelátvitel az intesztinalis DCk-ben

Korábban már találtak ATRA termelő DCk-et a humán bélben. Az ATRA termelő képességet a DCk a bél intesztinális mukózába jutást követően szerzik meg. Mivel a bél egy privilegizált pontja a z intenzív lipid felszívódásnak és a PPAR γ ligand termelődésnek, ezt a szövetet választottuk, hogy felmérjük vajon a PPAR γ hozzájárulhat-e a DC retinoid jelátvitelhez az intesztinális GALT-ban.

A PPAR γ hozzájárulhat az egér DCk intesztinális fenotípusához. A funkcionális relevanciáját a receptornak DSS indukált colitis-ben tanulmányozták. A colitis modellekben az ATRA termelődése csökkent a CD103⁺ DCk-ben. Ezzel szemben, humán betegek gyulladt vastagbél szöveteiből izolált DCk ATRA termelése fokozottabb volt. Az emelkedett ATRA termelés hozzájárulhat a betegség patológiájához. Mind a CD103⁺ és CD103⁻ DC altípusok fokozott *RALDH2* expressziót mutattak.

RDH10-t is mértek a szortolt populációkon, ami tovább jelzi, hogy a humán bél DCk képesek lehetnek celluláris ATRA termelésre.

DI technikával karakterizáltuk a PPAR γ és az ATRA jelátvitel komponenseit a human intesztinális szövetekben. Eredményeink alapján a GALT-asszociált immunsejtek valóban kifejezik a kulcs komponenseit az ATRA termelésnek (*RDH10*, *RALDH2*) és sejten belüli szállításnak (*CRABP2*). PPAR γ^+ DC-szerű sejtek koexpresszálják az *RAR* célgént (*TGM2*), ami felveti annak a lehetőségét, hogy ezekben a sejtekben a teljes enzimmészlet rendelkezésre áll az ATRA termelésére retinolból, aktív ATRA jelátviteli rendszerük van és releváns ATRA termelő APCk-et reprezentálnak a bélben. A PPAR γ^+ DC-szerű APCk száma megnő az IBD-s mintákban. Eredményeink arra utalnak, hogy a humán mieloid intesztinális DCk *RALDH*-e jelzi, hogy a sejtekben termelődő ATRA, a *RAR α -n át módosíthatja a T sejt funkciókat a bélben. Továbbá a PPAR γ és az ATRA útvonal kapcsolt lehet az intesztinális DCk-ben és az *ex-vivo* mo-DC-ink talán megfeleltethetők ezeknek az *in vivo* DC-jellegű APCk-nek.*

5.5 CatD és lipid antigen prezentáció a humán mo-DCk-ben

Széles körben elfogadott, hogy a CatD elsődleges biológiai funkciója a lizoszómális fehérjék lebontása. A CatS és L szerepet játszik az antigén prezentációban. A lipid prezentáció számos aspektusát hozták összefüggésbe ezekkel a lizoszómális proteázokkal, mint a CD1d sejtfelszíni megjelenése és a lipid antigének feldolgozása. Bár a sejtmagi hormon receptorok szerepét a lipid prezentáció szabályozásában kevésbé vizsgálták, DCk-ben lehetséges, hogy transzkripcionális szinten szabályozott. Megvizsgáltuk, hogy a lipid prezentálás milyen más lépései állhatnak a PPAR γ szabályozása alatt az mo-DCk-ben a CD1d-n kívül. A differenciáló DCk-ben a receptor szabályozása alatt áll a CatD és az kifejeződése nagyon hasonlít azokhoz a génekhez, amiket korábban már funkcionálisan is hozzákapcsoltak a lipid prezentáláshoz. Azt is kimutattuk, hogy CatD-t fokozza mind a PPAR γ és a *RAR α , külön és közvetett módon. A CatD aktivitásának gátlása a PPAR γ függő iNKT aktiválás romlásához és az α GGC csökkent prezentáló képességhez vezetett. Ezek a kísérletek biztosítják számunkra, hogy mechanisztikusan is összekössük a PPAR γ -t, a CatDt és a lipid prezentációt a sejtekben.*

5.6 A lipid antigen prezentálás és a PPAR γ a daganatokban

A PPAR γ az egyik legvitathatóbb TF a daganatok fejlődése és a DCk összefüggésében. A DC-alapú vakcinációs terápiák szempontjából fontos, hogy a receptor hogyan befolyásolja a DCk által szabályozott immunválaszokat. A receptor aktiválása kritikus a DC fejlődésben, ami speciális DC fenotípust eseményez, ami alapján a PPAR γ aktív DCk regulatórikus DC fenotípussal rendelkeznek, ami hátrányos az *in vivo* DC-alapú terápiák kifejlesztése vagy optimalizálása során.

A DCk-ről kimutatták, hogy hatékony daganat ellenes válaszokat váltanak ki az iNKTk-nek prezentált lipidekkel, amik elsődlegesen védő funkciót váltanak ki számos kísérletes egér daganat modellben. A preklinikai sikerek olyan klinikai vizsgálatok ötleteit vetették fel, amik vagy a meglévő iNKTk funkcióit erősítik, vagy az iNKTk számát növelik (*ex vivo* növesztett iNKTk adoptív

transzferre), mint vakcina. Ezeknek a triáloknak az előre nem várt sikertelenségének megoldására, és az iNKT vakcina terápiák hatásosságának fokozásához, a mi *ex vivo* DC modellünk számos lehetőséget biztosít az optimalizáláshoz. A RSG kezelt DCk minden a lipid prezentáláshoz szükséges molekulát kifejeznek, ezért ezek a modell DCk biztosítják, hogy megértjük azokat a molekuláris mechanizmusokat, amik elengedhetetlenek az iNKTk klinikai hasznosíthatóságához. A DCk optimális manipulálása a daganat ellenes vizsgálatokban alapvetően attól függ, hogy mit tudunk az iNKT és DC biológiáról és azokról a faktorokról, amik aktiválják és szabályozzák ezeket a sejteket. A PPAR γ ⁺ DCk fokozzák az iNKT funkciókat a megnövekedett CD1d-vel, így a receptor potenciális célpont lehet a CD1d függő iNKT alapú daganatterápiában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az általunk vizsgált dendritikus sejtek a veleszületett immunitás antigén bemutató sejtjei. A szervezet szöveteibe vándorolva, az eltérő szöveti környezet hatására, szöveti altípusokká fejlődnek és szövetre jellemző immunválaszt váltanak ki. A dendritikus sejtek funkcióit befolyásoló molekuláris mechanizmusokat az elmúlt évtizedekben számos kutatócsoport vizsgálta. Munkacsoportunk a dendritikus sejtekben jelenlévő magreceptor család tagjainak szerepét vizsgálja a sejtek funkciójára. A receptor család tagjai lipid érzékelőként működnek. Szerepük a sejt környezetéből érkező, illetve a sejten belül termelődött/aktiválódott lipidek hatásának közvetítése a génkifejeződésre. A lipidek által aktivált magreceptorok olyan koordinált génkifejeződési mintázat változást eredményeznek, melyek megváltozott funkcióval rendelkező dendritikus sejtek kialakuláshoz vezethetnek. Munkánk során a magreceptor család két tagjának, a PPAR γ és RAR α receptorok szerepét vizsgáltuk a humán monocita-eredetű dendritikus sejtek érése során. A PPAR γ aktivációja csökkenti a sejtek mozgékonytását és peptid antigén bemutató képességét. Emellett a receptor fokozza a retinolt oxidáló enzimek (RDH10 és RALDH) kifejeződését a sejtekben, ami a RAR α -t aktiváló csupa transz retinsav (all-*trans* retinoic acid (ATRA)) termelődéséhez vezet. A receptor továbbá fokozza az ATRA sejtmagba szállításáért felelős (CRABP2) fehérje szintjét. Az ATRA a sejtmagban fizikailag kötődik és aktiválja a RAR α receptort, ami beindítja a lipid antigén bemutató CD1d molekula génjének átíródását. A CD1d sejtfelszíni megjelenésével, a dendritikus sejt az α GC lipid antigént bemutatva a lipiddel specifikusan aktiválható természetes invariáns ölüsejtek (iNKT) osztódásához és aktivációjához vezet. A két magreceptor a lipid antigén bemutatás további lépéseit is szabályozza a CD1d sejtfelszíni szintjének befolyásolásától függetlenül. Mindkét receptor fokozza a lizoszómális katepszin D (CatD) proteáz szintjét a sejtekben. Az aktív proteáz elhasítva a szapozin (Sap) enzimek előalakját (prosaposin), hozzájárulhat a lipid antigének feldolgozásához, valamint a lipid antigének CD1d molekula ligand kötő zsebében történő bekötődéséhez és cserélődéséhez. Így a két magreceptor koordináltan és egymástól függetlenül egy olyan megváltozott funkciójú vagy alternatív dendritikus sejt típus kialakulásához vezet, amely a

peptidek bemutatása helyett, elsősorban a fokozott mennyiségű CD1d molekulái segítségével, a lipid antigének bemutatására specializálódott.

Egerekén végzett kutatások kimutatták, hogy a dendritikus sejtek által aktivált iNKT sejtek számos daganat modell esetében a daganatok visszafejlődését vagy stabilizálódását eredményezték. A humán kísérletek részben alátámasztották ezeket az eredményeket, de a klinikai tesztek nem vezettek hosszantartó vagy releváns eredményekhez. A lipid antigénnel kezelt dendritikus sejt alapú terápiák a betegek számára jól tolerálhatóak. Annak érdekében, hogy a közeljövőben klinikailag hatékony daganat ellenes terápiát tudjunk kidolgozni, elengedhetetlen a lipid antigén bemutatás egyes lépéseinek megismerése. Az általunk használt dendritikus sejt modell lehetőséget biztosít ezen lépések molekuláris szinten történő karakterizálására és adataink felhasználhatóak egy dendritikus sejt/iNKT sejt-alapú daganat elleni terápia kidolgozása során.

7. PUBLIKÁCIÓK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/303/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gyöngyösi Adrienn
Neptun kód: I83XOF
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10038878

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gyöngyösi, A.**, Szatmári, I., Pap, A., Dezső, B., Pos, Z., Széles, L., Varga, T., Nagy, L.: RDH10, RALDH2, and CRABP2 are required components of PPAR γ -directed ATRA synthesis and signaling in human dendritic cells.
J. Lipid Res. 54 (9), 2458-2474, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M038984>
IF: 4.73
2. Nakken, B., Varga, T., Szatmári, I., Széles, L., **Gyöngyösi, A.**, Illarionov, P. A., Dezső, B., Gogolák, P., Rajnavölgyi, É., Nagy, L.: Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma]-regulated cathepsin D is required for lipid antigen presentation by dendritic cells.
J. Immunol. 187 (1), 240-247, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1002421>
IF: 5.788
3. **Gyöngyösi, A.**, Nagy, L.: Potential Therapeutic Use of PPAR[gamma]-Programed Human Monocyte-Derived Dendritic Cells in Cancer Vaccination Therapy.
PPAR Research. 2008, [1-10], 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2008/473804>





További közlemények

4. **Gyöngyösi, A.**, Dócs, O., Czimmerer, Z., Orosz, L., Horváth, A., Török, O., Méhes, G., Nagy, L., Bálint, B. L.: Measuring expression levels of small regulatory RNA molecules from body fluids and formalin-fixed, paraffin-embedded samples.
Methods Mol. Biol. 1182, 105-119, 2014.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5_10
5. Tsakiris, I., Törőcsik, D., **Gyöngyösi, A.**, Dózsa, A., Szatmári, I., Szántó, A., Soós, G., Nemes, Z., Igali, L., Márton, I., Takáts, Z., Nagy, L., Dezső, B.: Carboxypeptidase-M is regulated by lipids and CSFs in macrophages and dendritic cells and expressed selectively in tissue granulomas and foam cells.
Lab. Invest. 92 (3), 345-361, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2011.168>
IF: 3.961

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,479

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,518**

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

Debrecen, 2018.09.12.



8. TÁRGYSZAVAK

Dendritikus sejt, peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma, retinsav receptor, csupa- transz retinsav, retinol dehidrogenáz, CD1d, lipid antigén bemutatás, alfa-galaktozilceramid, invariáns természetes ölü T sejt, katepszin D

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék kifejezni szívemből jövő hálámat témavezetőmnek Prof. Dr. Nagy László-nak, folyamatos támogatásért, türelemért a tanulmányaim és a kutatásaim alatt. Útmutatása mindig segített nekem, ennek a dolgozatnak a megírásában.

Szeretném megköszönni **Prof. Emeritus. Fésüs László** és **Prof. Dr. Tózsér József**, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet jelenlegi és korábbi vezetőinek, hogy lehetőséget biztosítottak számomra, hogy az Intézetben dolgozhassak.

Szintén hálával tartozok **Dr. Britt Nakken**, **Dr. Szatmári István** és **Dr. Varga Tamás** volt munkatársaimnak a munkám segítéséért és a tudományos publikációimban nyújtott közreműködésükért.

Szeretném megköszönni az együttműködést **Dr. Dezső Balázs**-nak az IHC analízisekért és **Dr. Pósz Zoltánnak** az egér kokultúra kísérletekért.

Szintén köszönöm **Fürtös Ibolya** és **Hathy Edit** értő technikai segítségét és **a NLAB minden tagjának, hogy támogattak.**

Végül szeretném megköszönni **családom** szeretetét, kifogyhatatlan támogatását az elmúlt évek alatt.

Gyöngyösi Adrienn

A tudományos mű elkészítését és a kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K100196, OTKA NK72730) projektjei támogatták, valamint a TÁMOP-4.2.2.-2012-0023, TÁMOP-4.4.2/08/01, TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONYV-2010-0007 számú projektek segítségével, az Európai Szociális Alap és az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

A munkát szintén támogatta Magyarország Emberi Erőforrások Minisztériuma, a Felsőoktatási intézményi kiválósági program, Debreceni Egyetem (Biotechnológia) című, 20428-3/2018/FEKUTSTRAT számú projektjén keresztül.