

Doktori (PhD) értekezés tézisei

***A *Lactobacillus casei* BL23 peptidoglikán
módosításai, valamint különböző tumor eredetű
szolubilis faktorok befolyásolják a humán monocita
eredetű dendritikus sejtek fagocita hatékonyságát***

Tóth Márta

Témavezető

Prof. Dr. Bácsi Attila



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2023

***A Lactobacillus casei* BL23 peptidoglikán módosításai, valamint különböző tumor
eredetű szolubilis faktorok szabályozzák a human monocita eredetű dendritikus sejtek
fagocita hatékonyságát**

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

Írta: **Tóth Márta** okleveles biológus

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

Témavezető: **Prof. Dr. Bácsi Attila**

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
Tagok: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, MTA doktora
Dr. Pós Zoltán, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Biokémia és Molekuláris Biológiai Intézet, könyvtár, 2017. június
16. 10 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Gácsér Attila, az MTA doktora
Dr. Szalmás Anita, PhD

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Balogh István, az MTA doktora
Tagok: Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, az MTA doktora
Dr. Németh Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászat A épület előadóterem, 2023. április 17. 12 óra

1. BEVEZETÉS

Számos belső és külső behatás éri a szervezetünket minden nap. A behatások természetétől függően, amelyek lehetnek ártalmatlanok, mint a mikrobióta vagy ártalmasak, mint a patogének vagy megváltozott saját sejtek, az immunrendszernek megfelelő válasszal kell reagálni rájuk.

Mivel a dendritikus sejtek (DS-ek) képesek a másodlagos nyirokszervekbe vándorolni és aktiválni a naiv T-sejteket, hidat képeznek a természetes és adaptív immunitás között és alakítani tudják a kialakuló immunválaszt az antigének sajátosságai szerint. Emiatt a DS-eknek a periférián közvetlen kapcsolatba kell kerülniük az antigénekkkel, amelyben a különböző endocitotikus folyamatoknak meghatározó szerepük van.

A szimbióta baktériumok úgy, mint a lactobacillusok és anyagcseretermékeik különbözőképpen kerülnek kölcsönhatásba a gazdaszervezet sejtjeivel. A baktériumok és a gazdasejtek közötti közvetlen kölcsönhatások gyakran a bakteriális peptidoglikán (PG) rétegen alapulnak. Éppen ezért a PG szerkezetében bekövetkezett változások például különböző enzimek pl. acetiltranszferázok és PG hidrolázok (PGH-k) hatására, nagymértékben érintik a PG által kifejtett hatásokat.

Ehhez hasonlóan a megváltozott saját sejtek is képesek manipulálni az ellenük képződő immunválaszokat. Mivel a DS-ek komplex immunológiai aktivitással rendelkeznek, differenciációjuk és funkcióik tumoros sejtek általi megváltoztatása különböző szolubilis faktorokon keresztül alapvető a DS-ek által közvetített immunválaszok elkerülésére.

Tekintve a mikrobióta vagy tumoros sejtek és a DS-ek közti bonyolult kapcsolatot, a lehetséges mechanizmusok feltárása intenzív kutatási terület. Habár a bakteriális fajfüggő hatások és a különböző tumoros sejtek által kiváltott egyedi immunmoduláló tulajdonságok nagy kihívást jelentenek a tanulmányozásukban.

1.1. A mikrobióta általános tulajdonságai

A mikrobióta növekvő fontosságát hangsúlyozza az a tény, hogy az elmúlt évtizedben 1,7 milliárd dollárt költöttek a humán mikrobióta tanulmányozására orvosi szempontból. Ezek a mikroorganizmusok a bőrön, illetve a különböző nyálkahártya felszíneken élnek, beleértve a szájüreget, a bélrendszert, a légutakat és a reproduktív szerveket. Ezen szövetek közül a bélrendszerben találjuk a legnagyobb számú mikrobióta közösséget.

Ezek a mikroorganizmusok különféle kapcsolatot alakítottak ki a gazdaszervezettel. A szimbióták mutualizmusban vagy kommenzalizmusban élnek a gazdaszervezettel, míg a patobionták potenciális patogének, amelyek immunkompromittált emberekben vagy diszbiózis

esetén képesek betegségeket okozni. Diszbiózis során az egyénre jellemző mikrobióta megváltozik, mint például nagymértékű antibiotikum használatot követően.

Már régóta köztudott, hogy a szimbionta mikroorganizmusok sokféle előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a gazdaszervezet szempontjából, beleértve a hámsejtréteg épségének fenntartását, a patogének megtapadásának gátlását, az emésztés elősegítését, valamint különféle metabolitok és vitaminok előállítását. Ezen kívül támogatják az immunrendszer fejlődését és modulálják az immunválaszokat.

1.2. A mikrobióta hozzájárulása a homeosztázishoz

A gazdaszervezet találkozása a mikrobiális anyagokkal már az anyaméhben megtörténik; az anyai mikrobiális faktorok alakítják a magzat immunrendszerét és befolyásolják különböző patológias folyamatok kialakulását, mint például az asztmát. Az újszülött bőrét és nyálkahártya felszíneit elsőként kolonizáló baktériumfajok összetétele a születés módjától függ. A felnőttek mikrobióta összetétele viszonylag stabil viszont például étrend váltással, növekvő szennyezéssel és nagymértékű antibiotikum alkalmazással drasztikusan megváltozhat.

Az egyénre jellemző mikrobióta összetételének és diverzitásának radikális megzavarása, vagyis a diszbiózis komoly következményekkel járhat, hangsúlyozva a szimbionta mikrobák jelenlétének fontosságát a gazdaszervezet életében.

A mikrobiális eredetű molekulák számos mintázat felismerő receptor ligandjaiként szolgálnak és helyileg hatnak a bélhámsejtekre és az immunsejtekre vagy befolyásolják különböző extraintesztinális szervek funkcióit. Köztudott, hogy a Gram⁺ bakteriális PG legkisebb aktív egysége a muramil-dipeptid (MDP) a citoszólikus NOD2 ligandja, amely magasan kifejeződik a Paneth sejtekben és a CD11c⁺ mieloid sejtekben szabályozva a mikrobióta összetételét és a gyulladásos citokin szekréciót.

1.3. CD11c^{high} bél DS alpopulációk általi antigén felvétel

A szimbionta baktériumoknak közvetlen vagy közvetett kapcsolatba kell kerülni a gazdaszervezet sejtjeivel azért, hogy kifejtsék moduláló hatásaikat.

A DS alpopulációk általi antigén szerzés sokféleképpen valósulhat meg. A CX₃CR1⁺ DS-ek képesek kinyúlni a bélhámsejtek közt és közvetlenül felvenni az antigént a bél lumenből. Hasonlóképpen a CD103⁺ DS-ekről is kimutatták, hogy képesek az epitéliumba ágyazódni és a bélüregből felvenni az antigént nyúlányaik segítségével a csípőbélben és aktiválni a T-sejteket. A SIRPα⁻ konvencionális DS-ek keresztprezentálják az apoptotikus bélhámsejtekből származó virális antigént és a mezenterialis nyirokcsomók T-sejtes zónájába vándorolnak. Továbbá

közvetett mechanizmusok is hozzájárulnak az antigének felvételéhez. McDole és mtsai kimutatták, hogy a kehely (goblet) sejtek kis molekulásúlyú oldott antigéneket képesek szállítani az alattuk fekvő CD103⁺ DS-eknek. Ezen kívül, IgG-vel fedett antigének a neonatális Fc receptor segítségével jutnak át a hámsejteken, valamint a nem vándorló CX₃CR1⁺ makrofágok is átadhatnak antigéneket a CD103⁺ DS-eknek.

1.4. A DS-ek általi antigénszerzést követő endocitotikus folyamatok

A szövetben maradó, éretlen DS-ek minden, eddig ismert endocitotikus folyamathoz szükséges alkotóelemmel rendelkeznek. A nagy méretű partikulumok felvétele fagocitózissal és makropinocitózissal míg a kisméretű antigének dynamin-függő és független endocitózissal történhet. A DS-ek érése során, az endocitotikus aktivitás gyorsan csökken, míg az antigén feldolgozás és bemutatás előtérbe kerül.

A fagocitózis és makropinocitózis az 500 nm-nél nagyobb partikulumok úgy, mint baktériumok és apoptotikus sejtek felvételében játszik szerepet. Mindkét folyamat aktin-függő, habár szabályozásuk és a közreműködő receptorok és molekulák nagymértékben eltérők. A fagocitózis egy erősen szabályozott folyamat, amely az opszonizált anyagok sejtfelszíni receptorokkal történő felismerésével kezdődik. A sejtfelszíni receptorok leggyakrabban Fc, komplement és mintázat felismerő receptorok, mint a Dectin-1. Ezt követően egyéb receptorok is bekapcsolódnak, amelyek indukálják a membrán változásokat és a fagoszóma keletkezését. A makropinocitózis vagy „sejt ivás” az antigén prezentáló sejtekben (APS-ek) folyamatosan aktív, így a veszélyjelek hiányában a makropinocitózis a DS-ek által közvetített perifériás tolerancia fenntartásában játszik szerepet saját peptidek prezentációja által. A folyamat során az extracelluláris folyadék is felvételre kerül különféle partikulákkal együtt, mint például baktériumokkal. Gyulladásos folyamatokban vagy fertőzéskor a DS-ek a makropinocitózissra támaszkodva veszik fel az antigéneket. Továbbá kimutatták, hogy a makropinocitózis szükséges az MHCII általi antigénprezentációhoz DS-ekben.

500 nm-től kisebb részecskék, mint pl. bakteriális sejtfal komponensek makro- vagy mikropinocitózissal és egyéb endocitotikus folyamatokkal, mint klatrin- vagy kaveolin-függő folyamatokkal (amelyek lehetnek dynamin-függők, illetve függetlenek) kerülhetnek felvételre. Megfigyelték, hogy a makrofágok klatrin- és dynamin-függő endocitózist használnak az MDP felvételére, amely szükséges a NOD2 általi jelátvitelhez. Egy idei tanulmányban, Popescu és mtsai kimutatták, hogy a *Bacillus anthracis* PG polimere és nagyobb méretű komponensei főleg aktin-függő útvonalakon jutnak be a sejtbe. Habár, dynamin-függő endocitózis is hozzájárult a felvételhez mintegy 20-30%-ban. Egy másik megfigyelés során rögzítették, hogy a hámsejtek

két egymástól független útvonalon is képesek a *Streptococcus pneumoniae* tisztított sejtfalának felvételére. Ezek a tanulmányok demonstrálják, hogy a sejtek általi bekebelezési folyamatok nagyon heterogének, függenek az adott sejtípustól.

1.5 A PG szerkezete és összetétele

A PG a Gram+ baktériumok sejtfalának legnagyobb összetevője, hosszú glikán láncokból áll, amelyek β -1,4 kötéssel kapcsolódó ismétlődő N-acetil-glükózamin (NAG) és N-acetilmuraminsav (NAM) egységekből tevődik össze. A hosszú láncok rövid peptid szakaszokkal vannak kereszt kötve. A leggyakoribb peptid szekvencia L- és D-aminosavakból áll a következő sorrendben: L-alanin, D-glutamin, L-lizin, D-alanin, D-alanin. A harmadik aminosav a pálcika alakú Gram+ és az összes Gram- baktériumban mezo-diamino-pimelinsav vagy L-ornitin is lehet. Az első aminosav, az L-alanin laktil kötéssel kapcsolódik a NAM karboxil csoportjához. Az érett PG szerkezete és összetétele nagyon erősen fajfüggő.

A mikrobiótából származó PG vagy annak különböző méretű fragmentumai, vagyis a muropeptidek különféle előnyös hatással bírnak a gazdaszervezetre. Korábban megfigyelték, hogy a mikrobióta PG komponensek a bélüregből kijutva a keringésbe kerülnek és még a csontvelőben is kimutathatók. Ezek a komponensek bioaktívnak bizonyultak, mert NOD1-függő NF- κ B aktivációt okoztak HEK293 sejtekben.

A PG fragmensek felszabadulása különböző mechanizmusokkal jöhet létre. Mind a patogén, mind a szimbionta Gram+ baktériumok folyamatosan szekretálnak membrán vezikulumokat, amelyek PG komponenseket tartalmaznak. Továbbá, a *Helicobacter pylori* IV-es típusú szekréciós rendszere radiojelölt PG-t képes szállítani a baktériumból a gazdasejt citoplazmájába. Egy *Lactobacillus (L.) acidophilus*-sal végzett kísérletben kimutatták, hogy a NOD2-ön kívül egyéb mintázat felismerő receptorok is felismerik a PG-t, beleértve a NOD1-et, NLRP3-mat (NOD-leucin rich repeat and pyrin domain-containing), NLRP1-et és PG kötő fehérjéket. Ezek a receptorok érzékelik a különböző szerkezetű, méretű és összetételű PG fragmentumokat úgy, mint diszacharid-di-, tri-, tetra- vagy pentapeptideket vagyis a muropeptideket.

1.6. A PGH-k szerepe a baktérium életében

A muropeptidek pontos elhasítása a baktériumok fajfüggő enzimeitől, a PGH-ktől függ, amelyek hozzájárulnak a PG szintéziséhez, turnoveréhez, újra hasznosításához és lebontásához. A PGH-k által képzett muropeptidek a környezetbe is kikerülhetnek.

A PGH-k sokféle funkcióval rendelkeznek, pl. szabályozzák a leánysejtek szétválását osztódáskor a szeptum elhasítása által. Az AmiA, AmiB és AmiC enzimek hiánya az *Escherichia coli* filamentációját okozza. Emellett meghatározzák a baktérium alakját és méretét, a baktérium növekedése alatt a PGH-k biztosítják, hogy a PG képes legyen megnyúlni a baktérium körül és helyet biztosít az új PG beépüléséhez. A *Bacillus subtilis*-ben a cwI0 vagy lytE endopeptidázok inaktivációja rövidebb bakteriális méretet eredményez, míg a dupla mutáns nem életképesek. A glikán szálak méretét is szabályozzák, illetve a peptid keresztkötések arányát. Ez a fizikai tulajdonság befolyásolja a sejtfal merevségét, amely kedvezőtlen körülmények között a baktérium túlélését jelentheti. Továbbá kimutatták, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* a VI-os típusú szekréciós rendszer segítségével képes az ellenséges sejtekbe juttatni a Tse1 és Tse3 PGH-kat.

A PG bontásán kívül a PGH-k kiszabadulhatnak a környezetbe a szimbiota baktériumokból. Előzőleg kimutatták, hogy az *L. rhamnosus* (új néven *Lactocaseibacillus rhamnosus*) Msp1 (p40) és Msp2 (p75) enzimjei megelőzik az egér és humán bélhámsejtek citokinek által indukált sejthalálát az Akt fehérje aktivációján keresztül. Azt is megfigyelték, hogy a p40 csökkenti az epitél sejtek sérülését és a vastagbél gyulladását az epidermális növekedési faktor receptor aktivációja által. Emellett az epidermális növekedési faktor receptor függő APRIL kifejeződése szintén az *L. rhamnosus* eredetű p40 által szabályozott a bélhámsejtekben, amely így IgA termeléshez vezet. Ezen fehérjék homológjait később azonosították két másik baktériumban is, az *L. casei*-ben és *L. paracasei*-ben.

Az *L. casei* BL23-ból származó p75 enzim (Lc-p75) jelentős hatással bír a PG szerkezetére és ezáltal a baktérium morfológiájára. Az Lc-p75 az egyik fő PGH, amelynek γ -D-glutamil-L-lizil-endopeptidáz aktivitása van. Az Lc-p75 hiányában a diszacharid-dipeptid és az acetilált diszacharid-dipeptid PG egységek mennyisége szignifikánsan csökken az Lc-p75 mutáns *L. casei*-ben. Továbbá a baktérium hosszú láncokat képez, mert a leánysejtek közti szeptum hasítása nem következik be.

1.7. A *Lactobacillus casei* csoport

A lactobacillusok Gram+, pálcika alakú, fakultatív anaerob baktériumok, amelyek a tejsavbaktériumok közé tartoznak és hatékonyan kolonizálják a gerincesek bélrendszerét. Az *L. casei* csoport tagjai tejtermékekben és fermentált ételekben is gyakran megtalálhatók. Mindezek mellett, az egyik legtöbbet tanulmányozott probiotikus baktériumok az egészséggel összefüggő alkalmazásuk következtében.

Az emberi vékonybélben hozzájárulnak a kolonizációs rezisztenciához, valamint közvetlen és közvetett kapcsolatot alakítanak ki a gazdaszervezettel. Ezek a kölcsönhatások az ember szempontjából előnyökkel járnak, beleértve a fokozott agyműködést, csökkent depressziót, erősebb barrier épséget, tumorelles aktivítást és az immunválasz befolyásolását.

1.8. Tumorok által közvetített hatások, amelyek befolyásolják a myeloid sejtek fagocita hatékonyságát és funkcióikat

A mieloid eredetű DS-ek és makrofágok hivatásos fagocita sejtek, amelyek képesek bekebelezni a tumor sejteket és bemutatni a tumor eredetű antigéneket. A tumorok általi egyik lehetséges immunelkerülő mechanizmus a fagocita sejtek általi bekebelezés megakadályozása. A sokféle fagocitózis gátló fehérje és a „ne egyél meg” jelek, beleértve a CD200, CD47 és az újonnan felfedezett CD24 kifejeződnek a tumor sejtek felszínén, míg az interakciós partnereik, a CD200R, SIRP α és a Siglec10 a fagocita makrofágokon és DS-eken expresszálódnak. Kölcsönhatásuk a gyulladásos válasz, valamint a tumor sejtek felvételének gátlását közvetíti. A „ne egyél meg” jelek kifejeződésének mintázata valószínűleg specifikus a különböző tumorsejtekre.

Egy másik tumorsejtek általi elkerülő mechanizmus az immunsejtek differenciációjának és funkcióinak megváltoztatása. Erre a monociták kiváló jelöltek nagymértékű plaszticitásuk következtében. A tumor mikrokörnyezetben a monociták tumor-asszociált makrofágokká vagy DS-ekké differenciálódnak.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. I. rész: A humán szimbionta baktérium, az *L. casei* BL23-nak és PG módosításainak hatása a humán monocita eredetű DS-ek (moDS-ek) által közvetített gyulladásos és effektor T-sejt válaszra

Az elsődleges kapcsolódási pont a szimbionta baktériumok és a gazdaszervezet közt a bakteriális PG. Emiatt a PG-ben bekövetkezett változások megváltozott válaszokat idézhetnek elő a gazdaszervezet immunsejtjei által. Munkánk során célul tűztük ki a PG-ben megváltozott *L. casei* BL23 moDS-ekre kifejtett hatásainak tanulmányozását. Megvizsgáltuk:

- a vad típusú és Lc-p75 mutáns *L. casei* BL23 gyulladást indukáló képességét,
- a vad típusú és Lc-p75 mutáns *L. casei* BL23 hatását az moDS-ek segítő T-sejt polarizáló képességére,
- a PG szerkezeti különbségeinek hatását az moDS-t aktiváló sajátosságaira
- a morfológiai megjelenés fontosságát az moDS-ek aktivációjának indukálásában, valamint a fagocitózis szerepét az *L. casei* általi immunmodulációban.

2.2. II. rész: A különböző tumor sejtvonal eredetű oldott faktorok hatásainak tanulmányozása az moDS-ek differenciációs programjára és fagocita képességére

A tumor eredetű szolubilis faktorok befolyásolják a DS-ek differenciációját és funkcióit. Ennek ellenére, azok az *in vitro* kísérletes rendszerek, amelyek vizsgálják és összehasonlítják az általuk kiváltott moduláló hatásokat még hiányosak. Célunk volt, hogy összehasonlítsuk a különböző adenokarcinóma és melanoma sejtvonalakból származó oldott faktorok hatásait az moDS-ek differenciációjára és funkcióira a következők szerint:

- a különböző tumor faktorok jelenlétében differenciáltatott moDS-ek fenotípusos megjelenésének karakterizálása
- adenokarcinóma és melanoma-eredetű kondicionált médium jelenlétében differenciáltatott moDS-ek fagocita képességének vizsgálata
- lehetséges összefüggések keresése a különböző sejtfelszíni markerek kifejeződése és az moDS-ek fagocita tulajdonsága között

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Baktérium törzsek és tenyésztésük*

Az *L. casei* BL23-t és Δ Lc-p75 mutáns megfelelőjét, amelyet az lcabl_02770 gén kiütésével kaptunk Dr. Marie-Pierre Chapot-Chartier bocsátotta rendelkezésünkre. Fagyasztásból felvéve MRS agarra oltottuk őket és 37 °C-on 48 óráig tenyésztettük, hogy elkülönített kolóniákat kapjunk. Ezután az egyedi kolóniákat MRS bouillon-nal (BD Difco, Fisher Scientific, Co.L.L.C, PA, US) hígítottuk és 16 órán keresztül inkubáltuk őket 37 °C-on a stacioner fázis kezdetéig. A fluoreszcens mCherry törzseket plazmid transzformációval kaptuk, amely az mCherry fehérjét kódolta (a pTS-mCherry Jerry M. Wells [Wageningen Egyetem, Hollandia] ajándéka). A fluoreszcens törzseket 5 µg/ml (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) eritromicin jelenlétében tenyésztettük a plazmid szelekció miatt. Az 1-es optikai denzitás (OD) 600 nm-en $2,5 \times 10^8$ sejt/ml-nek felelt meg a vad típusú törzs esetében, amelyet a folyékony baktérium tenyészet hígítási sora és kolónia számolás alapján kaptunk.

3.2 *A peptidoglikán kivonása*

Az *L. casei* PG kivonása egy előzőleg leírt protokoll alapján történt néhány változtatással. Egy exponenciálisan növvő tenyészetből származó sejteket ($OD_{600nm} = 0,3$) jégen lehűtöttük majd centrifugálással gyűjtöttük össze. A sejteket deionizált H₂O-ban vettük fel, majd 10 percig forraltuk. Utána 5 % SDS-t tartalmazó 50 mM Tris-HCl-ben (pH 7,0) szuszpendáltuk fel és 25 percig forraltuk. A pelletet $20,000 \times g$ -n 10 perc alatt gyűjtöttük össze, majd 4 % SDS-t tartalmazó 50 mM Tris-HCl pufferben vettük fel, majd ismét forraltuk 15 percig. A sejtfalat $20,000 \times g$ -s és 10 perces centrifugálással kaptuk meg és hatszor mostuk deionizált H₂O-val, hogy eltávolítsuk az SDS-t. A sejtfal pellet ezután 2 mg/ml pronázzal 60 °C-on, 90 percig, majd 50 µg/ml α -amilázzal 37 °C-on, 2 óráig, 50 µg/ml DNázzal és 50 µg/ml RNázzal 37 °C-on 4 óráig és végül 50 µg/ml lipázzal valamint 200 µg/ml tripszinnel 37 °C-on, 16 órán keresztül kezeltük. Ezután a pelletet 2 % SDS-t tartalmazó 50 mM Tris-HCl-ben vettük fel és mostuk deionizált H₂O-val. Az oldhatatlan pelletet 48 % hidrofluor savval kezeltük egy éjszakán át, hogy a sejtfali poliszacharidokat eltávolítsuk. Centrifugálás után a PG-t tartalmazó pelletet néhányszor mostuk 0,25 M Tris-HCl-lel és deionizált H₂O-val. A végső pelletet liofilizáltuk és -20 °C-on tároltuk.

3.3. *Humán monocita szeparálás és differenciálítása dendritikus sejté*

Az egészséges donorokból származó, fehérvérsejtekben gazdag vérkészítményeket (buffy coat) az Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ) debreceni Regionális Vérellátó Központjából

igényeltük. A vérminták begyűjtése és tárolása, a Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveit követve, a donorok előzetes írásos beleegyezésével történt. A humán vérmintákkal történő munkát az OVSZ igazgatója és a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte.

A perifériás vér mononukleáris sejtjeit Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország) segítségével sűrűség alapú centrifugálással nyertük ki. A monocitákat mágneses sejtseparálással tisztítottuk, CD14 specifikus antitesttel fedett mikrogöngyök és VarioMACS mágnes használatával követve a gyártó utasításait (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország). Az izolált CD14⁺ monociták homogenitása 90-95 %-osnak adódott az összes kísérlet esetén. Az autológ, monocitát nem tartalmazó frakciót, vagyis a perifériás vér limfocitákat T-sejt forrásként alkalmaztuk az ELISpot vizsgálatok során.

A vad típusú és Lc-p75 mutáns *L. casei*-vel végzett kísérletekben a monocitákat 1×10^6 /ml sejtszámban tettük ki szérumentes AIM-V médiumban (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), amelyet 100 ng/ml IL4-gyel (PeproTech EC, London, Anglia) és 80 ng/ml GM-CSF-fel (Gentaur Molecular Products, Brüsszel, Belgium) egészítettünk ki. A sejteket 5 napig differenciáltattuk. A második napon a médium felét lecseréltük és frisset adtunk, amelyhez 100 ng/ml IL4-et és 80 ng/ml GM-CSF-et tettünk. Egyes esetekben az moDS-ek dimetil-szulfoxidban (DMSO, Serva Electrophoresis GMBH) oldott 15 μ M Cytochalasin D-vel (CyD, Merck KGaA) 30 percig voltak előkezelve, hogy gátoljuk a fagocitózist. A DMSO-t oldószer kontrollként alkalmaztuk.

A tumor sejtvonalakból származó oldott faktorokkal végzett kísérletekben a tisztított monocitákat 4 napig tenyésztettük $1,5 \times 10^6$ /ml sejtszámban RPMI 1640 médiumban (Merck KGaA), 10 % borjú szérum (Thermo Fisher Scientific) és 1 % antibiotikum/antimikotikum (Hyclone, Shrewsbury, MA, USA) jelenlétében. A tumor sejtvonalakból származó kondicionált médiumot kapott tenyészetekben az RPMI és a kondicionált médiumok aránya 1:1 volt. A médium minden esetben tartalmazott 100 ng/ml IL4-et (PeproTech) és 80 ng/ml GM-CSF-et (Gentaur Molecular Products). Egyes tenyészetekben a monocitákhoz 1,25 μ M dexametazont (Merck KGaA) adtunk ezzel monocita eredetű dexametazon DS-t (dexDS) hoztunk létre, amely szabályozó DS-nek tekinthető.

3.4. A tumor sejtvonalak fenntartása és tumor sejtvonal eredetű kondicionált médiumok létrehozása

Az MDA-MB231 (humán mell adenokarcinóma), HeLa (humán méhnyak adenokarcinóma), HT29 (humán, vastagbél adenokarcinóma), WM278 (primer melanoma),

WM1617 (WM278 melanoma metasztatikus megfelelője), WM983A (primer melanoma) és WM983B (WM983A metasztatikus megfelelője) sejtvonalakat RPMI 1640 médiumban 10 % borjú szérummal és 1 % antibiotikum/antimikotikum oldattal kiegészítve tenyésztettük.

A felülúszót eltávolítottuk a sejtvonalakról és kidobtuk; a sejteket mostuk és friss médiumot tettünk rájuk. A tenyészeteket 48 óráig állni hagytuk. A kondicionált médiumokat összegyűjtöttük és 3000 rpm-en fugáltuk 5 percig. Az így összegyűjtött kondicionált médiumokat használtuk a monociták dendritikus sejtekké történő differenciálata során.

3.5 Az moDS-ek baktériumok és a belőlük származó PG komponensek általi aktivációja

Az moDS differenciáció 5. napján a baktériumokat hideg PBS-sel kétszer mostuk és 1 (moDS): 4 (baktérium) arányban adtuk a sejtekhez 3, illetve 24 óráig. A kezeletlen moDS-eket (éretlen – immature dendritic cell [IDC]) alkalmaztuk kontrollként.

A tisztított bakteriális PG mintákat deionizált vízben vettük fel és Branson Sonifier 450 segítségével feltisztulásig szonikáltuk. 10 µg/ml PG fragmentummal aktiváltuk az moDS-eket 24 órán keresztül. Minden kísérletet legalább 3 független donorból ismételtünk meg.

3.6. A sejtfelszíni markerek expressziójának és a sejtek életképességének mérése áramlási citometriával

Az moDS-ek 24 órás bakteriális aktiválását követően a sejteket fluoreszcens festékekkel kojugált antitestekkel jelöltük meg: CD83-fluorescein-izotiocianát (FITC), CD80-FITC, CD86-fikoeritrin (phycoerythrin [PE]) és humán leukocita antigén (HLA) -DQ-FITC (mind BioLegend, San Diego, CA, USA). Kontrollként jelöletlen mintát használtunk.

A tumor kondicionált médiummal végzett kísérletekben a sejteket anti-humán CD14-FITC-cel, CD209/DC-SIGN-PE-vel, CD1a-FITC-cel, CD1d-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)-nel, CD86-PE-vel, PD-L1-PE-vel, HLA-ABC-FITC-cel és HLA-DR-FITC-cel jelöltük meg.

A nem specifikus antitest kötés hőinaktivált egér szérummal akadályoztuk meg. Az moDS populációt az előre és oldalra szórt fény alapján kapuiztuk ki. A fluoreszcencia intenzitást ACEA NovoCyte 2000R citométer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) segítségével detektáltuk. Az adatok elemzéséhez FlowJo vX.0.7 szoftvert (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) használtunk. Az élő és halott sejteket áramlási citometriával választottuk szét, miután a frissen összegyűjtött, nem fixált sejteket megjelöltük 0,5 µg/ml 7-amino-actinomicin D-vel (7-AAD) (Merck KGaA).

3.7. Citokinek és kemokinek mérése enzim kötött immunszorbens esszével (ELISA)

Az aktivált moDS-ek felülúszóját 24 óra múlva összegyűjtöttük és az IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-12p70, IL-10, IL-23 és IL-8 koncentrációját lemértük BD OptEIA ELISA kitek alkalmazásával követve a gyártó utasításait (Beckton Dickinson, BD Biosciences, USA). Az OD-t 450 nm-en detektáltuk egy SynergyTM HT Multi-Detection Microplate reader-rel (Bio-Tek Instruments, VT, USA) és KC4 v3.4 szoftverrel. Az adatokat Microsoft Excelben értékeltük ki.

3.8. Enzim kötött immunospot (ELISpot) esszé

A baktériummal aktivált moDS-eket megszámloltuk, mostuk és autológ perifériás vér limfocitákkal inkubáltuk együtt 1 (moDS) :20 (T-sejt) arányban 3 napig 37 °C-on AIM-V médiumban. A negyedik napon a sejteket összegyűjtöttük, számoltuk és IFN γ , IL-17A és IL-4 Ready Set Go ELISpot esszéknek tettük ki a gyártó utasításai szerint (eBiosciences, San Diego, CA, USA). A kezeletlen moDS-ek és T-sejtek szolgáltak negatív kontrollként.

A citokin szekréció azonosítása biotinált IFN γ , IL-17A és IL-4-specifikus antitestekkel történt, torma-peroxidáz enzim konjugált streptavidin jelenlétében. A 3-amino-9-etilkarbazol szubsztrát hozzáadását követően a szín fejlődést csapvízzel állítottuk le. A megszáradt plateket számítógép vezérelt ELISpot kép analízálóval (Series 1 ImmunoSpot Analyzer, ImmunoSpot Version 4.0 Software Academic, Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA) szkenneltük be és értékeltük ki.

3.9. Fagocitózis mérése áramlási citometriával

A vad típusú és Lc-p75 mutáns *L. casei* moDS-ek általi felvétele közötti különbségek megállapításához, a sejteket mCherryt expresszáló baktériumokkal inkubáltuk 1:4 arányban 3, illetve 24 óráig 37 °C-on, illetve jégen, kontrollként. Az inkubálási periódusok után az moDS-eket allophycocyanin (APC)-konjugált anti-CD1a antitesttel (BioLegend) jelöltük meg.

A különböző tumor kondicionált médiumok jelenlétében differenciáltatott moDS-ek fagocita képességének vizsgálatához a sejteket mCherryt expresszáló vad típusú *L. casei*-vel inkubáltuk együtt 1:4 arányban 4 órán át 37 °C-on és jégen. A nem kezelt moDS-eket és dexDS-eket tekintettük kontrollnak.

A fluoreszcencia intenzitásokat ACEA NovoCyte 3000 RYB áramlási citometriával (Agilent) mértük. Az adatok elemzéséhez FlowJo vX.0.7 szoftvert használtunk. Az moDS populációt az előre és oldalra szórt fény szerint kapuztuk kizárva a nem fagocitált baktériumokat. A fagocitáló sejtek gyakoriságát vagy az mCherry-pozitív sejtek százalékából

vagy az mCherry fluoreszcencia intenzitás medián értékeiből határoztuk meg. Hasonlóképpen, a baktériumok bekebelezésének arányát a CD1a⁺ és CD1a⁻ moDS populációk esetén az mCherry-pozitív sejtek százalékából határoztuk meg.

3.10. Konfokális mikroszkópia

A felvett baktériumok moDS-en belüli helyének azonosításához konfokális mikroszkópiás méréseket végeztünk. Egy 40x immerziós objektívvel (NA 1.2) ellátott Zeiss LSM 880 konfokális lézer pásztázó mikroszkópot (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) alkalmaztunk a tumor faktorok által kondicionált moDS-ek vad típusú *L. casei* felvételének illusztrálására 4 óra után, illetve a vad típusú és Lc-p75 mutáns *L. casei* moDS-ek általi fagocitózisának szemléltetésére 24 óra elteltével. A Z-stack képeket 1 µm-enként gyűjtöttük a sejt alsó részétől kezdve. A képek, a montázs, valamint az ortogonális elrendezések az ImageJ 1.53c program (Wayne Rasband, NIH, USA) segítségével kerültek elemzésre.

3.11. Bioinformatikai elemzések

A bioinformatikai elemzések R (4.1.3-as verzió) és RStudio (1.4.1717-es verzió) használatával történtek a tumor felülúszóval végzett kísérletek sejtfelszíni marker expressziós és fagocitózis adataiból. A heatmap-ek a *pheatmap* csomag (1.0.12-es verzió) *pheatmap* funkciójával készültek. Az értékek z-score számolás segítségével normalizáltak és az oszlopokra skálázottak. A korrelációs mátrixokat a *base* csomag (4.1.3-as verzió) *cor* funkciójával számoltuk. A mátrixokból korrelogramokat készítettünk a *ggcorrplot* csomag (0.1.3-as verzió) *ggcorrplot* funkciójával.

3.12. Statisztikai analízisek

Az ábrák és a statisztikai analízisek a GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével készültek. Két mintát páros, kétszélű t-teszttel hasonlítottunk össze. Több, mint két minta statisztikai analíziséhez egy utas ANOVA-t alkalmaztunk, amelyet Tukey post-hoc teszt követett. Két független változó összehasonlítása két utas ANOVA-val történt, amelyet szintén Tukey post-hoc teszt követett. Az eredmények átlagát± szórását (SD) ábráztuk. A $p < 0.05$ különbségeket vettük statisztikailag szignifikánsnak. A szignifikanciákat a következőképpen ábráztuk: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, valamint # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$.

4. EREDMÉNYEK

4.1. I. rész: *A humán szimbionta baktérium, az L. casei BL23-nak és PG módosításainak hatása a humán monocita eredetű DS-ek (moDS-ek) által közvetített gyulladásos és effektor T-sejt válaszra*

4.1.1. *Az L. casei ΔLc-p75 baktériumok hasonló CD83 kifejeződést vált ki a moDS-ekben mint a vad típusú baktériumok, viszont kevesebb citokin termelődését indukálják*

A bakteriális PG, amely a patogének és a probiotikus baktériumok fő sejtfa komponense DS aktivációt eredményez. Ezért elsőként a vad típusú és Lc-p75 mutáns *L. casei* moDS aktiváló képességét vizsgáltuk meg. A CD83 sejtfelszíni molekula kifejeződése nagymértékben összefügg az moDS érési állapotával. *In vitro* rendszerünkben mindkét *L. casei* törzs fokozta a CD83 sejtfelszíni megjelenését az moDS-eken függetlenül a bakteriális PGH mutációtól.

Ezt követően a baktériumoknak kitett moDS-ek gyulladásos citokin és kemokin termelését vizsgáltuk. Ellentétben a CD83 expresszióval, szignifikáns különbségeket találtunk a vad típusú és mutáns baktériumok által okozott TNF α , IL-1 β és IL-6 koncentrációkban moDS-ekben. A vad típusú baktériumok jelentősen nagyobb gyulladásos citokin választ eredményeztek az moDS-ekben. Érdekes módon az IL-8 gyulladásos kemokin koncentrációja viszont nem változott, mindkét *L. casei* törzs ugyanolyan mértékben fokozta az moDS-ek általi IL-8 termelést.

Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az abnormális sejtfa szerkezetű és morfológiájú mutáns baktériumok csökkent gyulladásos választ okoznak moDS-ekben.

4.1.2. *Az L. casei ΔLc-p75 baktériumok hasonló fenotípusos változást váltanak ki a moDS-ekben mint a vad típusú baktériumok viszont mérsékeltebb T-sejt választ eredményeznek*

Az éretlen, szövetben maradó dendritikus sejtek a patogének felismerése után erőteljes antigén prezentáló, érett DS-ekké alakulnak, amelyek tulajdonságai alapvetőek a segítő T-sejtek aktivációjához és különböző irányú polarizációjához. A másodlagos nyirokszervekbe történő vándorlás alatt a DS-ek feldolgozzák a patogéneket és emelik a segítő T-sejtek aktivációjához szükséges sejtfelszíni MHCII és kostimulátor molekulák expresszióját. Emiatt a HLA-DQ, valamint a CD80 és CD86 kostimulátor molekulák megemelkedett kifejeződése megfelelően mutatja az moDS-ek aktivált, T-sejt aktivációra képes állapotát. Kísérletes rendszerünkben mindkét *L. casei* törzs emelkedett HLA-DQ, CD80 és CD86 expressziót okozott az moDS-ek felszínén függetlenül a PGH mutációjától.

Az antigén bemutatás és kostimuláció mellett az moDS-ek oldott faktorokat is termelnek, amelyek meghatározzák a naiv T-sejt polarizáció irányát. Hasonlóképpen a gyulladásos citokinekhez, a vad típusú baktérium fokozott IL-10, IL-12 és IL-23 T-sejt polarizáló citokin termelést eredményezett az moDS-ekben, összehasonlítva a mutáns megfelelőjével.

Hogy bepillantást nyerjünk, hogy a sejtfelszíni molekulák kifejeződése és a T-sejt polarizáló citokinek termelése közti különbség hogyan fordítódik le a segítő T-sejt válasz szintjére, a baktériumoknak kitett moDS-eket autológ T-sejtekkel tenyésztettük együtt. Három nap múlva a T-sejteket IFN γ , IL-17A és IL-4 specifikus ELISpot teszteknek tettük ki. Azt találtuk, hogy mindkét *L. casei* törzs fokozta az IFN γ és IL-17A termelő T-sejtek megjelenését összehasonlítva a nem kezelt moDS-ekkel. Az moDS-ek Lc-p75 mutáns baktériumokkal történt előkezelése az IFN γ és IL-17A termelő T-sejtek számának és a spotok méretének csökkenését eredményezte összehasonlítva a vad típusú baktériumoknak kitett moDS-ekkel. Ezzel ellentétben az IL-4-termelő T-sejtek számában és területük nagyságában jelentős visszaesést detektáltunk mindkét baktériummal aktivált moDS-ek által összehasonlítva a kezeletlen moDS-ekkel tekintet nélkül a PGH mutációra.

Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az Lc-p75 hiányos *L. casei* mérsékelt Th1 és Th17 választ eredményezett az moDS-ek általi csökkent T-sejt polarizáló citokin termelés következtében.

4.1.3. A vad típusú és Lc-p75 mutáns *L. casei*ből származó tisztított PG hasonló moDS aktiváló tulajdonságokat mutat

Az Lc-p75 deficiencia megváltozott PG összetételhez és szerkezetéhez, valamint rendellenes bakteriális morfológiához vezet az *L. casei*ben. A fentiekben részletezett eredmények alapján feltettük a kérdést, hogy a vad típusú és Lc-p75 mutáns baktériumok eltérő moDS aktiváló képessége a megváltozott sejtfal szerkezetből ered vagy összefüggésben van az átalakult, hosszú láncot kialakító morfológiával. Emiatt PG tisztítást végeztünk el a vad típusú és Lc-p75 hiányos *L. casei*ből és vizsgáltuk az moDS aktiváló képességét. Hasonlóan megemeltük TNF α , IL-1 β és IL-6 termelést tapasztaltunk az moDS-ekben függetlenül attól, hogy melyik baktériumból származó PG készítménnyel voltak aktiválva. Hasonlóképpen, az *L. casei* törzsekből származó PG fokozott T-sejt polarizáló IL-10, IL-12 és IL-23 szekréciót indukáltak moDS-ekben tekintet nélkül a PGH mutációra.

Továbbá a vad típusú és mutáns törzsből eredő PG fokozott CD83, HLA-DQ, CD80 és CD86 expressziót eredményezett, valamint növekedett IL-8 szekréciót okozott az moDS-ekben ugyanúgy, mint az élő baktériumokkal végzett kísérletek során. Összefoglalva ezek az

eredmények azt mutatják, hogy az Lc-p75 mutáció általi megváltozott PG szerkezet nem okoz különbségeket a tisztított PG moDS aktiváló képességében.

4.1.4. A módosult bakteriális morfológia az moDS-ek általi rendellenes fagocitózishoz vezet

Mivel a tisztított PG készítmények hasonló moDS aktiváló képességgel rendelkeztek, feltételeztük, hogy az élő mutáns baktérium által okozott csökkent moDS aktiváció a károsodott, moDS-ek általi felvétel következménye. Korábban kimutatták, hogy az moDS-ek képesek bekebelezni a lactobacillusokat. Ezzel egyetértésben az moDS-ek képesek voltak felvenni az mCherryt expresszáló vad típusú és Lc-p75 mutáns *L. casei*, amelyet konfokális mikroszkópiával mutattunk ki.

A fluoreszcens *L. casei* törzseket 3 órás és 24 órás fagocitózis esszéikben használtuk, amely során az moDS-eket együtt tenyésztettük velük. Az inkubációs időtartamok után az moDS-ek mindkét baktériumot internalizálták 37 °C-on, amelyek így mCherry pozitívvá váltak és így áramlási citometriával tudtuk vizsgálni őket. Jelentős különbségeket találtunk az moDS-ek fagocita képességében 37 °C-on és jégen, amely egy aktív, hőmérsékletfüggő baktérium felvételt jelent 3 és 24 óra elteltével. Fontos kiemelni, hogy szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a vad típusú és mutáns baktérium fagocitózisa közt; az moDS-ek nagyobb mértékben vették fel a vad típusú baktériumokat, mint a mutánsokat 3 és 24 óra elteltével is.

2007-ben Gogolák és mtsai kimutatták, hogy a CD1a⁺ és CD1a⁻ moDS populációk különböző hatékonysággal veszik fel az *Escherichia coli* baktériumot. Ezzel ellentétben a mi kísérleti rendszerünkben a CD1a molekula sejtfelszíni hiánya nem befolyásolta az moDS-ek fagocita képességét; a CD1a⁺ és CD1a⁻ moDS-ek hasonló mértékben vették fel az *L. casei* baktériumokat.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az *L. casei* Lc-p75 célzott mutációja megváltoztatja a baktériumok sorsát a gátolt, moDS-ek általi fagocitózisuk miatt, amely független a CD1a sejtfelszíni kifejeződésétől. Ez a megfigyelés összefüggést mutathat a mutáns baktérium hosszú láncú morfológiájával.

4.1.5. A vad típusú baktérium gátolt felvétele mérsékli az moDS-ek gyulladásos és T-sejt polarizáló válaszát

Hogy tovább vizsgáljuk a vad típusú baktériumok felvétele nélkülözhetetlen az moDS aktivációhoz, CyD-vel gátoltuk az aktin polimerizációt, amely a fagocitózis kezdő lépése. Elsőként áramlási citometriával és konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk az mCherryt expresszáló baktérium felvételét CyD-vel kezelt és nem kezelt moDS-ekben. Eredményeink

jelentős esést mutattak az mCherry pozitív, CyD-vel kezelt moDS-ek gyakoriságában. A montázs és az ortogonális nézetek egy Z-stack képben feltárta, hogy a CyD-vel nem kezelt moDS-ek képesek voltak a vad típusú baktérium felvételére, míg a CyD-vel előkezelt moDS-ek nem. Továbbá a CyD kezelés jelentős morfológiai változást okozott az moDS-ekben, amely egyetértést mutat egy korábbi, neutrofil granulocitákkal történt vizsgálattal.

A következőkben tanulmányoztuk, hogy a vad típusú baktérium akadályozott felvétele milyen hatást vált ki az moDS-ek funkcionális válaszában. Elsőként az moDS-ek általi gyulladásos TNF α , IL-1 β és IL-6 termelést vizsgáltuk, amely nagymértékben csökkent a CyD-vel előkezelt moDS-ekben. Hasonlóképpen a T-sejt polarizáló IL-10, IL-12 és IL-23 termelése is jelentősen mérséklődött CyD előkezelés hatására, amely következésképpen csökkent IFN γ és IL17A termelő segítő T-sejt választ eredményezett.

Ezek mellett vizsgáltuk a CyD előkezelés hatását az moDS-ek sejtfelszíni markereinek kifejeződésére valamint az IL-8 termelésre. Előzőleg nem találtunk különbségeket ezekben a funkciókban a vad típusú és Lc-p75 mutáns baktériumokkal kezelt moDS-ekben. Hasonlóképpen a CyD előkezelés sem változtatott a CD83, HLA-DQ, valamint a CD80 és CD86 kostimulátor molekulák kifejeződésén és az IL-8 szekréción vad típusú baktériummal aktivált moDS-ekben. Habár azt érdemes megjegyezni, hogy a CyD kezelés önállóan is szignifikánsan emelte az IL-8 termelést, amely összefügg korábbi, humán retina pigment epitelsejtekkel végzett eredményekkel.

Összességében elmondható, hogy a baktériumok felvétele kritikus lépés a vad típusú baktériumok által okozott moDS aktiváció során, alátámasztva, hogy az Lc-p75 hiányos *L. casei* baktérium mérsékelte, moDS-ek általi felvétele csökkent moDS aktivációt és következésképpen Th1 és Th17 választ eredményez.

4.2. II. rész. A különböző tumor sejtvonal eredetű oldott faktorok hatásainak tanulmányozása az moDS-ek differenciációs programjára és fagocita képességére

4.2.1. A tumor felülűszók megváltoztatják az moDS-ek fenotípusos megjelenését

Köztudott, hogy a különböző tumor típusok megváltoztathatják a mieloid sejtek, mint a DS-ek differenciációs programját és T-sejt polarizáló aktivitását. Emiatt vizsgáltuk az moDS-ekre jellemző differenciációs markerek beleértve a CD14-et, CD209-et, CD1a-t és CD1d-t, valamint a T-sejt aktivációban szerepet játszó molekulák úgy, mint HLA-ABC, HLA-DR, CD86 és PD-L1 kifejeződését a tumor felülűszók jelentlétében differenciáltatott moDS-ekben.

A CD14 kifejeződés folyamatosan csökken az moDS-ek differenciálódása során, míg a CD209/DC-SIGN nő. A kontroll moDS-ek esetén így is történt, viszont a dexDS-ek megtartották felszínükön a CD14-et, és CD209-t is expresszáltak. A tumor felülúszók emelték a CD14 expressziót, szignifikáns különbségeket találtunk a HT29 és WM278-felülúszókkal kezelt moDS-ek esetén összehasonlítva a kontroll moDS-sel. Érdekes módon a WM983A felülúszó jelentősen csökkentette a CD14 expressziót a dexDS-hez és a másik primer melanoma, a WM278 felülúszóhoz képest. Emellett a CD209 expresszió általánosan mérséklődött a tumor felülúszók hatására, bár nem szignifikánsan. Két kivételt találtunk: A WM983A és WM983B felülúszók szignifikánsan mérsékeltek a CD209 kifejeződését az moDS-ek felszínén.

A következőkben a CD1a és CD1d kifejeződését vizsgáltuk a tumor felülúszók hatására moDS-ekben és azt találtuk, hogy a felülúszók és a dexametazon is jelentősen mérsékeltek a CD1a expressziót. Ezzel ellentétben a CD1d expressziója nem változott a felülúszók hatására a kontrollhoz képest. Egyetlen szignifikáns különbséget találtunk a dexDS és a WM278 felülúszónak kitett moDS közt.

Az antigének T-sejteknek történő bemutatásához, az moDS-ek emelik az MHCI és MHCII expresszióját a sejtfelszínen. Ezért a következő lépésben vizsgáltuk a HLA-ABC és HLA-DR molekulák sejtfelszíni expresszióját tumor felülúszók hatására. Sem a HLA-ABC, sem a HLA-DR expressziója nem változott a kontrollhoz képest a tumor felülúszók hatására. Viszont szignifikáns különbséget figyeltünk meg a dexDS valamint a WM983A és WM983B felülúszókkal kezelt moDS-ek esetén a HLA-ABC expresszióban. Továbbá a dexametazon kezelés jelentősen emelte a HLA-DR moDS-ek általi expresszióját összehasonlítva a kontroll moDS-sel és az összes tumor felülúszóval, kivéve a HT29-et.

Az antigén prezentáló molekulák mellett a DS-ek fokozzák a kostimulátor és koinhibitor molekulák kifejezését a T-sej aktiváció során. Ezért a következő lépésben elemeztük a CD86 kostimulátor, valamint a PD-L1 koinhibitor molekula kifejeződését tumor felülúszóknak kitett moDS-ekben. A CD86 expresszió mérséklődött a dexametazon kezelés hatására. HT29 és HeLa adenokarcinóma sejtekből származó felülúszók, valamint a két primer melanoma, WM278 és WM983A sejtek oldott faktorai hatására fokozott CD86 expressziót detektáltunk az moDS-ekben mint a dexDS-ekben. Továbbá, a dexametazon kezelés teljesen megakadályozta a PD-L1 megjelenését az moDS-ek felszínén. Az adenokarcinómákból származó felülúszók ezzel ellentétben szignifikánsan növelték a PD-L1 expressziót a dexDS-ekhez viszonyítva. Érdekes módon a két primer melanoma sejtvonal különbözően viselkedett; a WM278 felülúszója jelentősen emelte a PD-L1 expressziót összehasonlítva a WM983A eredetű felülúszóval.

Metasztatikus párjaik hasonló mintázatot mutattak a PD-L1 expressziót tekintve, mint a primer melanomák.

4.2.2. A különböző tumor sejtvonalakból származó mediátorok befolyásolják az moDS-ek fagocita képességét

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a probiotikus hatású baktériumok, beleértve különböző lactobacillus fajokat előnyös hatással bírnak a tumoros állapotokban úgy, mint a humán papilloma vírus által okozott méhnyakrák, melanoma vagy bélrendszeri tumorok. Bár arról keveset tudunk, hogy a különböző tumor eredetű mediátorok hogyan befolyásolják a hivatásos fagociták, mint a DS-ek fagocita aktivitását. Áramlási citometriával kimutattuk, hogy az moDS-ek képesek felvenni a vad típusú *L. casei* baktériumot 37 °C-on, viszont a fagocitózis hatékonysága csökkent 4 °C-on. Legnagyobb mértékben a dexDS-ek internalizálták a baktériumokat, valamint szignifikáns különbségeket találtunk a kontroll, illetve két melanoma sejtvonal, a WM278 és metasztatikus párja a WM1617 közt. Ezzel ellentétben egyik adenokarcinóma sejtvonalból származó faktorok sem változtatták meg az moDS-ek *L. casei* felvevő képességét. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy néhány melanoma sejtvonal közvetetten képes megváltoztatni az moDS-ek fagocita hatékonyságát.

A heatmapok segítségével még részletesebb összefüggéseket tudtunk feltárni a markerek és a fagocitózis közötti kapcsolatban. A különféle tumor felülúszókkal kondicionált moDS-eket két csoportra osztottuk: adenokarcinómák és melanomák.

Az adenokarcinómák csoportjában a marker/fagocitózis kapcsolat változatos mintázatot mutatott, minden egyes sejtvonalnál egyedi profilt figyeltünk meg. Az MDA felülúszót kapott moDS-eknek pozitív kapcsolata volt a CD1a kifejeződéssel és a fagocitózissal, míg erős negatív korreláció volt a CD14, HLA-DR és CD86 expressziókkal. A HT29-ből származó felülúszóval kezelt moDS-ek pozitívan korreláltak a HLA-ABC, CD14 és a CD209 expressziókkal és erős negatív kapcsolatot mutattak a PD-L1-gyel és a fagocitózissal. A HeLa-felülúszó jelenlétében differenciáltatott moDS-ek pedig erős pozitív korrelációban voltak a HLA-DR expresszióval, míg negatívan korreláltak a CD1d expresszióval.

A melanoma sejtvonalak közül a WM278 felülúszóval kezelt moDS-ek különböző mértékű pozitív kapcsolatban álltak minden markerrel és a fagocitózissal, míg a másik primer melanoma sejtvonal a WM983A oldott faktorai jelenlétében differenciáltatott moDS-ek negatívan korreláltak minden markerrel és fagocitózissal, kivéve egy enyhe pozitív korrelációt a CD86-tal. Érdekes módon a WM278-ból és metasztatikus párjából a WM1617-ből származó felülúszók teljesen eltérően viselkedtek majdnem minden marker és a fagocitózis

viszonylatában; a legerőteljesebb különbség a CD1a és a CD86 kifejeződésben adódott. Ezzel ellentétben a másik melanoma pár, a WM983A és WM983B mediátorainak kitett moDS-ek hasonlóképpen viselkedtek minden marker és a fagocitózis tekintetében.

4.2.3. A korrelációs analízisek különböző irányú kapcsolatokat tárnak fel a különféle sejtfelszíni marker expressziók és a fagocitózis között az adenokarcinóma és a melanoma eredetű felülúszókban differenciáltatott moDS-ekben

A markerek és fagocita aktivitás közti korrelációk különböző mértékét korrelációs analízisekkel vizsgáltuk R Studio segítségével. Az adatokat a heatmaphez hasonlóan kétfelé osztottuk: adenokarcinóma és melanoma csoportokra.

Az adenokarcinóma felülúszóval kondicionált moDS csoportban erős korrelációt fedeztünk fel a fagocita aktivitás, valamint a CD1a és PD-L1 expressziók közt. Érdekes módon a fagocitózis negatívan korrelált a CD14, CD209, HLA-ABC és HLA-DR expressziókkal. Továbbá pozitív korrelációt találtunk a CD86 és CD14, a CD86, valamint a HLA-DR és HLA-ABC közt valamint a CD14, HLA-ABC és CD209 és végül a CD14 és a CD209 között. Ezzel ellentétben a PD-L1 negatívan viszonyult a CD1a-hoz, CD209-hez és a HLA-ABC-hez. A CD86 és a HLA-DR erősen negatívan korrelált a CD1a-val és a CD1d-vel. Továbbá a HLA-ABC antikorreálalt a CD1a-val, a CD1a pedig a CD14-gyel.

Meglepő módon a melanoma felülúszót kapott moDS-ek csoportjában csak pozitív korrelációt találtunk a fagocitózis és a sejtfelszíni marker expressziók közt. A korrelációk mértéke különböző volt, míg a CD86 és a CD1a közt nem figyeltünk meg korrelációt.

Összefoglalva elmondható, hogy eredményeink szerint a különböző tumor típusok közvetetten képesek megváltoztatni az moDS-ek fenotípusát és fagocita képességét. Eredményeink azt is kiemelik, hogy a primer és a metasztatikus melanoma sejtek másképp hatnak az moDS-ek differenciációjára, fenotípusára és fagocita aktivitására.

5. MEGBESZÉLÉS

Az emberi test folyamatosan ki van téve külső és belső stimulusoknak úgy, mint mikrobióta tagok és megváltozott saját sejtek, amelyek veszélyeztetik a homeosztázis épségét. Az immunsejtek fontos feladata, hogy a különböző behatásokra megfelelően reagáljanak. A dendritikus sejtek fő feladata az immunválasz megszervezése azáltal, hogy kapcsolatot létesítenek a természetes és szerzett immunitás közt. A DS-ek folyamatosan mintát vesznek a mikrokörnyezetből mikropinocitózissal, receptor-mediált endocitózissal és fagocitózissal. Ezáltal képesek gyulladásos vagy tolerogén válaszokat közvetíteni a mikrobióta tagok vagy a megváltozott sejtekből származó különböző faktorok felé.

A PG, mint a baktériumok nélkülözhetetlen komponense meghatározó szerepet játszik a gazdaszervezet és a mikrobák közti kölcsönhatásokban. A gazdaszervezet sejtjei különbözőképpen képesek kapcsolatba kerülni a PG-vel vagy a komponenseivel és válaszolni rájuk. A PG fragmentumok a PGH-k által képződhetnek, amelyek a PG-t meghatározott helyeken hasítják. A különböző PGH-k hiányában a PG szerkezetében bekövetkezett változások megváltoztathatják a gazdaszervezet PG-re adott válaszát. Munkánk során létrehoztunk egy olyan *L. casei* BL23 törzset, amelyben inaktiváltuk az Lc-p75 PGH-t és vizsgáltuk az moDS és következésképpen a T-sejt aktiváló képességét.

Kiemelkedő probiotikus hatásuk mellett a tejsavbaktériumok mint pl. a lactobacillusok és különböző anyagcseretermékeik/komponenseik képesek a DS-ek aktiválására bár a végkifejlet változó a tanulmányok közt. Foligne és mtsai kimutatták, hogy az *L. salivarius*, *L. rhamnosus* és *L. acidophilus* különbözőképpen stimulálta a csontvelői eredetű DS-eket. Egy másik tanulmányban a VSL#3 probiotikus koktél (összetevői: *Bifidobacterium [B.] longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum* és *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) hatásait vizsgálták csontvelői eredetű DS-eken különböző baktériumszámok mellett. Növekvő VSL#3 baktériumszámok érettebb csontvelői DS-eket indukáltak, amelyet a fokozottabb MHCII, valamint CD80, CD86 és CD40 kostimulátor molekulák expressziója jelzett. Christensen és mtsai szintén megfigyelték, hogy az *L. casei* subsp. *alactus* által aktivált csontvelői DS-ek nem termeltek IL-10-et, de szekretáltak IL-12-t, IL-6-ot és TNF α -t, valamint kifejeztek MHCII-t és CD86-ot. Ezzel összhangban a vad típusú *L. casei* BL23 az moDS-ek aktivációját okozta, amelyet az emelkedett expressziójú CD83, MHCII és kostimulátor molekulák jeleztek. Továbbá a vad típusú baktérium által aktivált moDS-ek gyulladásos és T-sejt polarizáló citokineket és kemokineket is termeltek. Ezen felül a vad típusú baktériumoknak kitett moDS-ek az IFN γ és IL-17A termelő T-sejtek aktivációját eredményezték. Ezek a megfigyelések kiemelik a törzs- és kondíciófüggő

immunmoduláló sajátosságait a különböző tejsavbaktériumoknak és bizonyítja a mikrobióta kutatás nehézségeit.

A tejsavbaktériumok egyik előnyös tulajdonsága, hogy megakadályozzák a patogének és patobionták megtapadását, kolonizációját és biofilm képzését. A kolonizációs rezisztencia sokféleképpen valósulhat meg, beleértve a versenyzést a tápanyagokért és energiaforrásokért, mint különböző szolubilis faktorok pl. epesavak, antimikrobiális peptidek és fehérjék által. Továbbá előzőleg megfigyelték, hogy néhány *Lactobacillus* törzs magas adhézión és aggregációs képességgel rendelkezik, amely hatékony lehet a patogének biofilm képzése ellen. Az *L. casei* Lc-p75 inaktivációja hosszú láncú, aggregált fenotípushoz vezetett összehasonlítva a vad típusú baktériumokkal. Továbbá az Lc-p75 hiányos baktériumok csökkent Th1 és Th17 választ eredményeztek az mDS-ek mérsékelt T-sejt polarizáló citokin termelése következtében. Érdekes módon a CD83, HLA-DQ, CD80 és CD86 molekulák kifejeződését az Lc-p75 mutáció nem érintette. Egy korábbi tanulmányban kimutatták, hogy Crohn betegekben a Nod2fs mutáció nem befolyásolta a DS-ek érését, mivel TLR stimulációt követően emelkedett CD80 és CD86 expressziót mutattak. Emellett, a DS-ek általi IL-12p70, TNF α és IL-10 termelés sem volt érintett. Ezzel ellentétben a NOD2 ligandnak, az MDP-nek kitett DS-ek nem voltak képesek kostimulátor molekula kifejezésére és citokin szekrécióra. Egy másik tanulmányban, amelyben a vad típusú *L. reuteri* ATCC PTA 6475-nek és annak CmbA, egy nyák kötő fehérje mutánsának mDS moduláló hatásait vizsgálták ellentétes eredményt kaptak. Mind a vad típusú, mind a mutáns *L. reuteri* fokozott CD83, CD80, CD86 és HLA-DR kifejeződést okozott, míg a vad típusú baktérium nagyobb mértékű TNF α , IL-12 és IL-1 β termelést eredményezett az mDS-ekben, mint a mutáns baktérium. Hasonlóan a sejtfelszíni molekulákhoz, az *L. casei* Lc-p75 mutáció nem érintette az mDS-ek IL-8 termelését. Ezzel egyetértésben humán makrofágokkal végzett kísérletekben feltárták, hogy a sejtmagi I κ B α gátolta a TNF α , IL-1 β és IL-6 felszabadulását LPS stimuláció során, míg az IL-8 termelés érintetlen volt. Egy másik tanulmány kimutatta, hogy az IL-8 gén kifejeződésének szabályozása különbözik a gyulladásos citokinek szabályozásától. Egy vizsgálat során megfigyelték, hogy az ERK3 szabályozza az IL-8 termelést bél hámsejtekben, míg a citokintermelés szabályozásában az ERK3 szerepe nem ismert.

Hogy tovább tanulmányozzuk a vad típusú és Lc-p75 mutáns baktériumok gyulladás indukáló képességének különbségét mDS-ekben, tisztított PG komponenseket alkalmaztunk. Eredményeink alapján azt a megállapítást tettük, hogy a mutáns bakteriális PG ugyanolyan hatásokkal aktiválta a receptorait, mint a vad típusú baktériumból származó PG. Valójában korábban már kimutatták, hogy a patogén baktériumból és az *L. acidophilus*-ból származó

diszacharid egységek függetlenül a peptid egységek számától képes természetes immunválaszt indukálni.

A PG szerkezeti változásain kívül, az Lc-p75 hiányos *L. casei* jelentős morfológiai különbségekkel rendelkezik, amely hosszú láncok képzésében nyilvánul meg. Ezért úgy gondoltuk, hogy a mutáns baktériumok alacsony/közepes DS aktiváló képessége összefüggésben áll a károsodott moDS általi felvételükkel.

Számos tanulmány kimutatta, hogy a DS-ek különféle lactobacillus törzseket képesek felvenni. Sertés APS-ekkel végzett tanulmányban kimutatták, hogy az *L. jensenii* TL2937 hatékonyan felvételre került az moDS-ek által, amely IL-1 β , IL-12p70 és IL-10 termelődést váltott ki a sejtekből. Egy másik vizsgálat során az *L. rhamnosus* JB-1 baktériumot internalizálták a humán moDS-ek gyenge kostimulátor molekula expressziót és citokin szekréciót okozva. Összefüggésben ezekkel az eredményekkel az moDS-ek képesek voltak felvenni az *L. casei* BL23-at, habár a hosszú láncokat formáló, Lc-p75 mutáns törzset jelentősen kisebb mértékben. Hasonlóan ehhez, egy másik vizsgálatban használt vad típusú *L. reuteri* ATCC PTA 6475 és ATCC 53608 törzseket aktívan kebelezték be az moDS-ek, viszont ezek nyák kötő fehérjékben hiányos megfelelőiket csak kisebb hatékonysággal.

A fagocitózis folyamata számos faktortól függ, beleértve a résztvevő receptorokat, az időtartamot, a kötés erősségét és a célpont fizikai tulajdonságait úgy, mint méret és alak. Emiatt, a fagocitózis folyamata meghatározhatja a kialakuló immunválaszokat. A kísérleti rendszerünkben a hosszú láncú mutáns baktériumok korlátozott gyulladásos és T-sejt polarizáló citokin termelést váltottak ki az moDS-ekből a vad típusú *L. casei* baktériumokhoz képest. A fagocitózis fontosságát az is alátámasztotta, hogy a CyD általi gátlás erőteljes visszaesést eredményezett az moDS-ekben, hasonlóan az Lc-p75 hiányos baktériumokkal aktivált moDS-ekhez. Ez a megfigyelés összhangban van egy humán monocitákkal végzett kísérlettel, amelyeket *Candida albicans*-szal és *Saccharomyces cerevisiae*-vel aktiváltak. A CyD ebben a kísérletben is a gyulladásos citokinek és az IL-10 erőteljes csökkenését okozta a monociták által.

Eredményeink és az elérhető irodalom alapján, megfigyeléseinket a következőképpen értelmezhetjük, amelyek *in vivo* helyzetekben is relevánsak: 1) Az moDS-ek és az *L. casei* közvetlen kölcsönhatása gyulladásos választ eredményez, amely elegendő az adaptív, memória Th1 és Th17 válaszok elősegítéséhez. Ezzel párhuzamosan a baktériumok jelenléte IL-10 szekréciót is kivált az moDS-ekből, amely központi szerepet játszik a mutualista mikrobák elleni tolerancia fenntartásában. 2) Az aggregálódott, fonalas szerkezetű *L. casei* BL23 az moDS-ek általi fagocitózisának sikeres kivédése következtében mérsékelt gyulladást és szerzett

immunválaszokat eredményezett, elkerülve a nagymértékű immun sejt aktivációt és így az egészséges szövetekkel szembeni ártalmas reakciókat.

Összefoglalva, ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *L. casei* BL23 által kiváltott immunmoduláló mechanizmusok nagymértékben függenek az moDS-ek általi felvételtől. Az internalizáció meghatározza az moDS-ek citokin termelését, amely a gyulladásos válaszban és a Th1/Th17 sejtek által vezérelt szerzett immunválaszban nyilvánul meg. A hosszú láncú Lc-p75 mutáns *L. casei* baktériumok, amelyek kevésbé fagocitálódnak az moDS-ek által, mérsékelt moDS és T-sejt választ okoznak, hasonlóan a CyD-vel előkezelt, fagocitózisra képtelen moDS-ekhez.

A mikrobióta – gazdaszervezet kölcsönhatásában játszott sokrétű szerepe mellett, a DS alpopulációk a tumor mikrokozmosznak is fontos részét képezik és jelentősen hozzájárulnak a tumorelles vagy tumor növekedést elősegítő válaszokhoz, mivel APS-eként a T-sejtek aktivitását vezérik. Munkánk során a monocitákat különböző tumor sejtvonalból származó felülúszók jelenlétében differenciáltattuk és összehasonlítottuk az moDS-ek sejtfelszíni marker expressziójára és fagocita képességére kifejtett hatásaikat.

A CD14⁺ monocitákból történő differenciációs program során a DS-ek elkezdnek CD209-et/DC-SIGN-t expresszálni, miközben elvesztik a CD14-et a sejtfelszínről epigenetikai változásokon keresztül. Ennek ellenére CD14⁺ DS-ek megtalálhatók a dermisben normál körülmények közt is, illetve különböző betegségekben beleértve a reumatoid és psoriasisos artritist és számos tumor típust. Ezzel összhangban a melanoma és adenokarcinóma eredetű szolubilis faktorok CD14 expressziót indukáltak különböző mértékben, míg a CD209 érintetlen maradt kivéve a WM983A és metasztatikus párja a WM983B felülúszókban differenciáltatott moDS-ek esetében.

A CD209 mellett a CD1a expressziója is folyamatosan nő az moDS-ek felszínén a differenciáció során. Mivel a CD1a lipid és glikolipid antigéneket mutat be a T-sejteknek, a tumor sejtek előszeretettel csökkentik a DS-ek általi CD1a expressziót kikerülve a tumor antigének bemutatását. Mindegyik vizsgált tumor kondicionált médium korlátozta a CD1a moDS-ek általi kifejeződését.

Ismert, hogy a tumorok és a tumor eredetű molekulák gátolják a peptid antigének bemutatását és a kostimulációt a DS-ekben. *In vitro* kísérleti rendszerünkben sem a HLA-ABC, sem a HLA-DR, sem pedig a CD86 expresszió nem változott szignifikánsan a tumor eredetű faktorokra összehasonlítva a nem kezelt kontroll sejtekkel jelezve, hogy az moDS-ek megtartották T-sejt aktiváló képességüket.

Az antigének APS-ek általi feldolgozásához szükséges az antigének felvétele valamilyen endocitotikus útvonalon keresztül. A nagymértékben kifejeződő „ne egyél meg” szignáloknak köszönhetően a tumorsejtek sikeresen kivédik a fagocitózist és következésképpen a tumor antigének bemutatását az APS-ek által. Klinikai megközelítésben ezek a fagocitózis gátló jelek, mint a CD47/SIRP α és a PD-1/PD-L1 fagocitózis „checkpoint” terápiaként szolgál különféle tumor típusok ellen beleértve a szolid tumorokat és limfómákat. Kísérleti rendszerünkben az *L. casei* BL23 felvételét nem gátolták az adenokarcinóma és melanoma sejtvonalakból származó faktorok és párhuzamosan emelték a PD-L1^{high} moDS-ek gyakoriságát, kivételt képezett a WM983A. Annak ellenére, hogy a PD-L1 negatívan befolyásolja a fagocitózist, pozitív korrelációt találtunk az moDS általi fagocitózis és a PD-L1 kifejeződése közt mind az adenokarcinoma, mind a melanoma sejtvonalakból származó oldott faktorok hatására.

Sok tanulmány szemléltette már, hogy számos mikrobiotához tartozó baktérium törzs beleértve a *B. longum*, *Enterococcus faecium*, *Faecalibacterium* fajok, valamint az *Akkermansia muciniphila* összeköttetésben állt az anti-PD-1-PD-L1 terápia fokozott hatékonyságával melanomában szenvedő betegekben és egér kísérletekben is. Továbbá mostanában derült fény arra is, hogy négy *Bifidobacterium* faj, a *B. bifidum*, *B. longum*, *B. lactis* és *B. breve* megtalálható volt a vastagbél tumoros szöveteiben és fokozta az anti-CD47 immunterápia hatékonyságát. Mindkét esetben a DS-ek voltak a mikrobióta tagok célpontjai, bár a pontos kölcsönhatások még rejtve maradtak.

Összefoglalva, egy olyan átfogó elemzést sikerült véghez vinni a tumor eredetű szolubilis faktoroknak kitett moDS-ek differenciációjáról és funkcióiról, amely segítheti a tumorok által kondicionált moDS-ek differenciációját laboratóriumi körülmények közt. A korrelációs analízisek tumor típus specifikus, az moDS-ek differenciációjára és fagocita képességére gyakorolt hatást mutattak. A kiváltott immunmoduláló folyamatok függetlenek bizonyultak a szöveti eredettől és a tumor növekedés fázisától.

6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

“Minden betegség a belekben kezdődik” mondta több mint 2000 évvel ezelőtt Hippokratész. A kijelentés igaza mostanában kezd tisztázódni köszönhetően annak a rengeteg tanulmánynak, amelyek a számos előnyös tulajdonsággal rendelkező mikrobióta és a gazdaszervezet kölcsönhatásaival foglalkoznak. A mikrobióta és a gazdaszervezet kényes egyensúlyának felbomlása súlyos állapotok kialakulásának kedvez úgy, mint gyulladásos megbetegedések, autoimmun betegségek és tumoros állapotok.

Tekintve a különféle dendritikus sejt (DS) alpopulációk komplex szabályozó szerepét, ezek a sejtek kitűnő jelöltek arra, hogy nyomon kövessük a különféle mikrobióta tagok által kiváltott immunmoduláló hatásokat, amelyek nem egyszer környezet- és fajspecifikusak. Munkánk során célul tűztük ki, hogy beállítsunk egy olyan *in vitro* rendszert, amelyben a vad típusú és PG-módosított *L. casei* BL23 baktériumnak a monocita-eredetű DS-eket (moDS) szabályozó hatásait tudjuk vizsgálni. Eredményeink azt mutatták, hogy a vad típusú *L. casei*-vel kezelt moDS-ek gyulladásos, valamint Th1 és Th17 polarizáló válaszai sokkal kifejezettebbek voltak, mint a mutáns baktériumoknak kitett moDS-eké. Ennek hátterében a baktériumok közötti morfológiai különbségek állnak. A hosszú láncokat alkotó mutáns baktériumokat a moDS-ek nem képesek hatékonyan felvenni, hasonlóan ahhoz, ahogy az aktin polimerizációban gátolt moDS-ek sem tudják hatékonyan bekebelezni a vad típusú *L. casei* sejteket.

A fagocitózis folyamata nélkülözhetetlen szerepet játszik a megváltozott tumoros sejtek és immunsejtek közötti kölcsönhatásban is. A tumoros sejtek sikeresen képesek kivédeni az immunsejtek általi felismerést és felvételt, amelyet közvetlen és közvetett immunmodulációval érnek el tumor- és környezetspecifikus módon. A megváltozott sejtek képesek befolyásolni a DS-ek differenciációját és funkcióit, azért, hogy olyan sejtípust hozzanak létre, amely támogatja a szuppresszív mikrokörnyezet kialakulását és fenntartását. Munkánk során összehasonlítottunk azokat a szabályozó folyamatokat, amelyeket adenokarcinóma és melanoma sejtvonalakból származó faktorok okoztak az moDS-ek differenciációjában és fagocitózis képességében. Eredményeink szerint, a tumorok közvetett hatásai nagyon heterogének, függetlenek a szöveti eredettől és a metasztatikus állapottól.

Összefoglalva elmondható, hogy az olyan külső faktorok, mint megváltozott mikrobióta tagok, illetve különböző tumor típusokból származó faktorok alapjaiban véve változtatják meg az moDS-ek által kiváltott immunválaszokat. Remélhetőleg a megfigyeléseink hozzájárulnak azon komplex kölcsönhatások jobb megismeréséhez, amelyek az ártalmatlan mikrobióta tagok és a DS-ek, valamint a veszélyes transzformálódott sejtek és a DS-ek között zajlanak.

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/2/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Márta
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10059109

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Burai, S., Kovács, R., Molnár, T., **Tóth, M.**, Szendi-Szatmári, T., Jenei, V., Bíró-Debreceni, Z., Brisco, S., Balázs, M., Bácsi, A., Koncz, G., Türk-Mázló, A.: Comprehensive analysis of different tumor cell-line produced soluble mediators on the differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells.
PLoS One. 17 (10), 1-23, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0274056>
IF: 3.752 (2021)
2. **Tóth, M.**, Muzsai, S., Regulski, K., Szendi-Szatmári, T., Czimmerer, Z., Rajnavölgyi, É., Chapot-Chartier, M. P., Bácsi, A.: The phagocytosis of *Lactocaseibacillus casei* and its immunomodulatory properties on human monocyte-derived dendritic cells depend on the expression of Lc-p75, a bacterial peptidoglycan-hydrolase.
Int. J. Mol. Sci. 23 (14), 1-19, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23147620>
IF: 6.208 (2021)

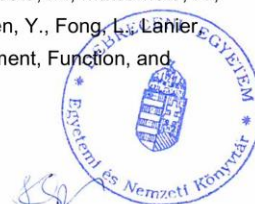
További közlemények

3. Jenei, V., Burai, S., Molnár, T., Kardos, B., Mácsik, R., **Tóth, M.**, Debreceni, Z., Bácsi, A., Türk-Mázló, A., Koncz, G.: Comparison of the immunomodulatory potential of platinum-based anticancer drugs and anthracyclins on human monocyte-derived cells.
Cancer Chemother. Pharmacol. 91 (1), 53-66, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-022-04497-1>
IF: 3.288 (2021)
4. Szénási, T., Varga, A., Hajas, G., **Tóth, M.**, Czimmerer, Z., Bácsi, A.: "Trained" immunitás memória kialakulása a veleszületett immunválaszok során.
Immunol. Szle. 14 (1), 15-21, 2022.





5. Szénási, T., Varga, A., **Tóth, M.**, Hajas, G., Muzsai, S., Czimmerer, Z., Bácsi, A.: A BCG-oltás és a koronavírus-fertőzés immunológiai kapcsolata.
Immunol. Szle. 14 (1), 23-29, 2022.
6. **Tóth, M.**, Bácsi, A.: A súlyos eozinofil asztma biológiai terápiás lehetőségei és az eozinofil sejtek fiziológiás szerepe.
Orvostovábbk. szle. 29 (3), 47-52, 2022.
7. **Tóth, M.**, Dajnoki, Z., Szegedi, A., Bácsi, A.: "Harmadik típusú találkozás" a 2-es típusú gyulladásal.
Immunol. Szle. 13 (4), 41-49, 2021.
8. Ivanovics, B., Gazsi, G., Reining, M., Berta, I., Pólska, S., **Tóth, M.**, Domokos, A., Nagy, B. J., Staszny, Á., Cserhádi, M., Csősz, É., Bácsi, A., Csenki-Bakos, Z., Ács, A., Urbányi, B., Czimmerer, Z.: Embryonic exposure to low concentrations of aflatoxin B1 triggers global transcriptomic changes, defective yolk lipid mobilization, abnormal gastrointestinal tract development and inflammation in zebrafish.
J. Hazard. Mater. 416, 1-15, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125788>
IF: 14.224
9. Türk-Mázló, A., Kovács, R., Miltner, N., **Tóth, M.**, Veréb, Z., Szabó, K., Bacskai, I., Pázmándi, K. L., Apáti, Á., Bíró, T., Bene, K., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: MSC-like cells increase ability of monocyte-derived dendritic cells to polarize IL-17-/IL-10-producing T cells via CTLA-4.
iScience. 24 (4), 1-25, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2021.102312>
IF: 6.107
10. Majai, G., Gogolák, P., **Tóth, M.**, Hodrea, J., Horváth, D., Fésüs, L., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Autologous apoptotic neutrophils inhibit inflammatory cytokine secretion by human dendritic cells, but enhance Th1 responses.
FEBS Open Bio. 10 (8), 1492-1502, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.12904>
IF: 2.693
11. Dogra, P., Rancan, C., Ma, W., **Tóth, M.**, Senda, T., Carpenter, D. J., Kubota, M., Matsumoto, R., Thapa, P., Szabó, P. A., Li Poon, M. M., Li, J., Arakawa-Hoyt, J., Shen, Y., Fong, L., Lahier, L. L., Farber, D. L.: Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence.
Cell. 180 (4), 749-763, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.022>
IF: 41.582
12. Bene, K., **Tóth, M.**, Al-Taani, S., Tóth, L., Türk-Mázló, A., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: A humán bélmikrobiom szerepe fiziológiás és patológias immunológiai folyamatokban.
Immunol. Szle. 11 (2), 14-24, 2019.





13. Kalló, G., Chatterjee, A., **Tóth, M.**, Rajnavölgyi, É., Csutak, A., Tőzsér, J., Csősz, É.: Relative quantification of human [béta]-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 29 (18), 1623-1631, 2015.
IF: 2.226

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 80,08

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,96**

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, 2023.01.09.



8. KULCSSZAVAK

Mikrobióta, Lactobacillus, peptidoglikán, peptidoglikán-hidroláz, monocita-eredetű dendritikus sejt, gyulladás, fagocitózis, T-sejt, adenokarcinóma, melanóma, tumor sejtvonal-eredetű oldott faktorok, differenciáció

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Egy oldal nem elég arra, hogy köszönetet mondjak mindazoknak, akik segítettek az életem ezen periódusában.

Elsőként a témavezetőmnek, *Prof. Dr. Bácsi Attilának* szeretném megköszönni a folyamatos és nélkülözhetetlen támogatását abban, hogy befejezzem a PhD éveimet. Kiemelkedő szakmai tudásával és briliáns meglátásaival minden felmerülő problémán átsegített. Az ajtaja mindig nyitva állt még a legkisebb tudományos és személyes probléma előtt is.

Nagyon hálás vagyok előző témavezetőmnek is, *Prof. Dr. Rajnavölgyi Évának*, aki előmozdította MSc és PhD tanulmányaimat. Ő vezetett be a tudományos életbe és megtanította a tudományos prezentációk csínyját-bínyját.

Köszönetet szeretnék mondani az Intézet korábbi vezetőjének *Prof. Dr. Bíró Tamásnak*, hogy támogatta az amerikai rövid tanulmányúton való részvételemet.

Hálás vagyok *Dr. Donna L. Farbernek* a Columbia Egyetemről, hogy megengedte, hogy dolgozzam a laboratóriumában és *Dr. Pranay Dogrának*, aki megtanította, hogy az RStudióban megjelenő hibák nem szükségszerűen rosszak.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni a jelenlegi (és örök) szobatársamnak és barátomnak, *Dr. Türk-Mázló Anettnek*, hogy otthonossá tette a munkanapokat. Szeretném megköszönni másik barátomnak *Dr. Bene Krisztiánnak* is a nevetéseket és a közös élményeket.

Köszönettel tartozom a Bácsi labor korábbi tagjának, barátomnak, *Dr. Brahma V. Kumarnak*, aki az amerikai kapcsolatom. Továbbá hálás vagyok a labor mostani tagjainak, *Dr. Varga Aliznak*, *Dr. Hajas Györgynek*, *Muzsai Szabolcsnak* és a tiszteletbeli tagnak *Dr. Gyöngyösi Adrienn-nek* a beszélgetéseket tudományos (és nem tudományos) kérdésekben.

Szeretném megköszönni minden kollégámnak, hallgatóimnak és kollaborátorainknak főként *Dr. Marie-Pierre Chapot-Chartier-nek* és *Dr. Krzysztof Regulskinak*, hogy minden problémámat, amely valaha is felmerült, megoldották. Külön szeretném megköszönni *Orosz-Tóth Katalinnak*, hogy megtanított a precíz labormunkára, illetve a folyamatos támogatását és bátorítását, hogy kezdjem el a doktori tanulmányokat. Nagyon hálás vagyok *Nagyné Kovács Erzsikének*, *Bíró-Debreceni Zsuzsannának* és *Justyákné Tóth Andreának* segítségüket és tanácsaikat a labormunkában.

A köszönetnyilvánítás nem lenne teljes, ha nem köszönném meg párom, *Dr. Czimmerer Zsolt* folyamatos támogatását és hogy megtanított arra, hogy minden a génekkel kezdődik. Minden nap inspirál és a teljesen eltérő tudományos nézeteivel ösztönöz, hogy fejlesszem magam.

Végül szeretném megköszönni a „nem-munka” barátaimnak és a támogató családomnak, édesanyámnak, *Mártának*, édesapámnak, *Istvánnak*, testvéremnek, *Istvánnak* és nagynénémnek, *Katinak* türelmüket és szeretetüket, valamint kutyusunknak *Nettinek*, hogy segített csökkenteni (és néha fokozni) a stresszt.

A munka megszületését támogató projektek:

- TAMOP-4.2.2.A-11/1 / KONV-2012 0023 projekt
- Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH PD132570, NK 101538, NN 114423, K 125337, K 125224 és K 142930)
- GINOP-2.3.2-15-2016-00050
- Az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával