

F38347**„Dendritikus sejtek differenciálódásának szabályozása hormonreceptorok által” című OTKA pályázat záró jelentése.**

A kutatás időtartama: 2002-2005

Témavezető neve: Dr. Szatmári István

Jelen OTKA pályázatunkban azt szeretnénk volna kideríteni, hogy a PPAR γ (peroxisome-proliferator activated receptor gamma) magreceptornak mi lehet szerepe a dendritikus sejtek differenciálódásában.

A dendritikus sejtek (rövidítve DS-ek) az emlős szervezetekben előforduló legfontosabb hivatásos antigén bemutató sejtek. Ezen sejtcsoportnak kitüntetett szerepe van a celluláris és a humorális immunválasz beindításában és az immunfolyamatok szabályzásában. A DS-ek fő funkciója a szervezetben újonnan keletkező antigének felvétele, feldolgozása és a feldolgozott antigének prezentálása a T-limfocitáknak, ezzel együtt a limfociták aktiválása. Primer immunválasz csak DS-ek jelenlétében jön létre, ezért az immunválasz természetes adjuvánsainak tekinthetők. Ezen túlmenően, a DS bizonyos típusai, direkt vagy indirekt úton pl NKT sejtek aktiválása révén, részt vesznek az a perifériás immuntolerancia kialakításában is.

A pályázat írásakor megfogalmazott hipotézis:

Az eddig napvilágra került adatok alapján feltételezzük, hogy a PPAR γ receptornak elsősorban az éretlen DS sejt létrehozásában és ezen állapot fenntartásában lehet szerepe. Az éretlen dendritikus sejtekben a PPAR γ receptor szintje magasabb, mint az érett DS-ekben. Ezért feltételezhető, hogy ezen receptor részt vesz az éretlen DS-ekben a fagocitózis szabályzásában és ezen sejtek lipid anyagcseréjének modulálásában. Hipotézisünk szerint a PPAR γ specifikus ligandok ezen éretlen állapot fennmaradását segíthetik elő. Hipotézisünk alátámasztására a következő a célkitűzésekben megfogalmazott kísérleteket szeretnénk elvégezni:

A pályázat írásakor megfogalmazott célkitűzések:

1. Humán monocita sejtekből kiindulva éretlen és érett dendritikus sejteken szeretnénk előállítani. Meg kívánjuk határozni a differenciálódás különböző stádiumaiban lévő sejtek PPAR γ receptorainak és több ismert PPAR γ célgénnek (CD36, LXR α , ApoE) mRNS szintjeit kvantitatív RT-PCR segítségével.

2. Tanulmányozni kívánjuk a különböző PPAR receptor agonista és antagonisták hatásait a dendritikus sejtek differenciálódására és funkciójára. A kezelt sejteken áramlási citometriával kívánjuk detektálni a DS specifikus sejtfelszíni markerek változásait. Kvantitatív PCR segítségével szeretnénk megmérni a PPAR célgének mRNS szintjeit, továbbá monitorozni szeretnénk a sejtek fagocitáló, limfocita aktiváló képességét, és citokin termelését különböző ligand kezeléseket követően.

3. A receptor profil ismeretében retrovirális vagy adenovírus vektorokkal PPAR receptorokat szeretnénk bejuttatni és expresszálni a dendritikus sejtekbe, így tanulmányozhatnánk a receptorok hatását a sejtek differenciálódására, érésére extra mennyiségű receptor jelenlétében.

A pályázat során megvalósult kísérletek, eredményeink:

1. Optimalizáltuk a dendritikus sejteket monocitából történő előállítását: a monociták előállítása immunomágneses szelekcióval történt, egyetlen „buffy coat”-ból kb. $5-10 \times 10^7$ monocitát sikerült kinyernünk. Kísérleti rendszerünkben optimálisnak a kétszeri citokin kezelés (500 U IL-4 és 800 U GM-CSF) bizonyult, ekkor kaptuk a legtöbb éretlen dendritikus sejtet, és a sejtek viabilitása is megfelelő volt. Az érett DS-ek előállítása egy további citokin koktél kezeléssel történt (GM-CSF, IL-6, TNF α , IL-1 β , PGE $_2$).

2. Áramlási citometriás mérésekkel részletesen jellemeztük a monocitákból származó dendritikus sejtek fenotípusos tulajdonságait: az éretlen dendritikus sejtek a monocitákra jellemző CD14 markert elveszítik, a DS-ekre specifikus markerek viszont megjelennek: CD1a és DC-SIGN az éretlen sejteken, továbbá CD83 az érett sejteken. Ezen túlmenően az érett (aktivált) sejteken fokozott CD80, CD86 és HLA-DR expresszió is megfigyelhető volt.

3. Meghatároztuk a PPAR magreceptorok (alfa, gamma, delta) mRNS szintjének változását a differenciálódás során. Eredményeink szerint a monocitákhoz képest a dendritikus sejteken a PPAR γ transzkript szintje jelentősen megemelkedett, viszont a PPAR α alig volt detektálható. A PPAR δ szintje szintén fokozódott a differenciálódás során, bár itt az indukció, sokkal kisebb mértékű volt. A DS differenciáció során nem csak a PPAR γ mRNS szintje növekedett de DS-ekben maga a protein is detektálható volt immuno-blot segítségével.

4. Tanulmányoztuk, hogy PPAR γ specifikus aktivátorok hatására az ismert PPAR γ célgének (FABP4, LXR α) expressziója miként változik. Méréseink szerint a FABP4 és az LXR α mRNS

szintje jelentősen fokozódott a PPAR γ specifikus agonistával (1-2.5 μ M rosiglitazone) kezelt dendritikus sejteken. Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy exogén liganddal a PPAR γ receptor ebben a rendszerben aktiválható. Továbbá a PPAR γ ligandokkal létrehozott gén indukciók egy PPAR γ specifikus antagonistával (GW9662) kivédhető volt ami azt támasztja alá, hogy ez valóban egy receptor dependens folyamat.

5. Áramlási citometriás mérésekkel részletesen összehasonlítottuk a PPAR γ aktivátorral kezelt és kezeletlen dendritikus sejtek fenotípusát. A PPAR γ agonistával kezelt éretlen dendritikus sejteknél a CD1a és a CD80 expresszió lecsökkent, a CD86 és CD1d viszont megemelkedett, a dendritikus sejtekre jellemző DC-SIGN és mannóz receptor expressziót a PPAR γ ligand nem befolyásolta. Az érett dendritikus sejteken a ligand kezelésnek csak mérsékelt hatása volt: az érett sejtekre jellemző CD83 expresszió nem változott, a CD80 szint csökkent, a CD86 kifejeződése viszont kis mértékben megemelkedett.

6. ELISA kit-ek segítségével megvizsgáltuk a dendritikus sejtek IL-12 (IL-12p70) és IL-18 termelését. Éretlen sejtek az IL-12 és IL-18 citokineket nem termeltek, érett dendritikus sejtek viszont szekretálták mindkét citokint, a ligand kezelés hatására az IL-12 szint lecsökkent, az IL-18 pedig megemelkedett. QPCR mérésekkel is megerősítettük, hogy az IL-12 mRNS szintje (IL-12p40 alegység) a PPAR γ specifikus liganddal kezelt mintákban csökken.

7. Összehasonlítottuk a liganddal kezelt és kezeletlen dendritikus sejtek endocitotikus kapacitását, megállapítottuk, hogy a PPAR γ aktivátorral kezelt minták latex bead felvétele sokkal nagyobb volt a kontroll sejtekhez képest. Ez arra utal, hogy a sejtek fagocitáló képessége fokozódott. A pinocitózis jellemzésére megvizsgáltuk a dendritikus sejtek „Lucifer- Yellow” felvételét, méréseink szerint a ligand kezelés nem befolyásolta a sejtek pinocitózisát.

8. Tanulmányoztuk, hogy PPAR γ specifikus aktivátorok befolyásolják-e az érett DS-ek T sejt aktiváló képességét. MLR reakció segítségével összehasonlítottuk a kontroll és liganddal kezelt sejtek által kiváltott limfocita proliferációt, továbbá áramlási citometriás mérésekkel (CD25 detektálása) jellemeztük a T limfociták aktiválhatóságát. Méréseink alapján megállapítható, hogy a PPAR γ agonistákkal kezelt dendritikus sejtek T sejt aktiváló képessége nem változott meg.

9. Az egyik legérdekesebb eredményünk az volt, hogy a PPAR γ agonistákkal kezelt dendritikus sejtek kevesebb CD1a-t, de több CD1d-t expresszálnak sejtfelszínén kontrol sejtekhez képest. Ezt az expressziós mintázatot mRNS szinten is detektálni tudtuk real-time kvantitatív PCR felhasználásával. Továbbá megállapítottuk, hogy ez a hatás nagy valószínűséggel PPAR γ receptor dependens, mivel PPAR γ antagonistával (GW9662) a ligand hatása bekövetkező CD1a expresszó csökkenés, illetve a fokozott CD1d kifejeződés kivédhető volt. Irodalmi adatok szerint a CD1d molekula nélkülözhetetlen az úgynevezett NKT (Natural Killer-T) sejtek aktiválásához. Mivel a PPAR γ aktivált dendritikus sejtek CD1d expressziója magasabb volt a kontroll dendritikus sejtekhez viszonyítva, ezért megvizsgáltuk ezen átprogramozott sejtek NKT aktiváló kapacitását. A liganddal kezelt, illetve kezeletlen dendritikus sejteket, melyekhez adtunk egy CD1d specifikus ligandot (alfa-galaktozil ceramid) is, együtt tenyésztettük 5 napon keresztül autológ limfocitákkal, majd meghatároztuk az NKT sejtek arányát. Az NKT sejtek kimutatása e sejtekre jellemző invariáns T sejt receptor detektálásával történt áramlási citometriával. Méréseink szerint, a PPAR γ aktivációval átprogramozott sejtek használatakor sokkal magasabb volt az NKT sejtek aránya a sejt kultúrában, ami jó összhangban ezen dendritikus sejtek fokozott CD1d expressziójával.

11. Eredményeink szerint a PPAR γ aktiváció koordinált módon befolyásolja a CD1 géncsalád expresszióját a CD1a szint lecsökkent a CD1d megemelkedik. További részletes vizsgálatokkal feltártuk, hogy ez a szabályozás valószínűleg indirekt mivel a ligand kezelést követően csak 12-24 órával később volt megfigyelhető a CD1d mRNS szintének emelkedése. Alapvető kérdés, hogy milyen mechanizmuson keresztül szabályozza a PPAR γ receptor a CD1d gént kifejeződését. Megfigyeléseink szerint CD1d indukció nem csak PPAR γ agonistákkal hanem természetes és mesterséges retinoidokkal is kiváltható volt (RARA agonistákkal). Ebben az esetben a CD1d indukció már 1-2 órával a ligand kezelést követően detektálható volt. Egy másik érdekes megfigyelésünk, hogy PPAR γ agonistákkal a DS-ekben több olyan génnek az expressziója is megemelkedett, melyről korábban ismert volt, hogy retinoidok által szabályozott (pl. TGM2, SDR1). Ezen eredmények felvetették annak a lehetőségét, hogy a PPAR γ indukált CD1d expresszió is retinoidok útján szabályozódik. DNS chip eredményeink arra utaltak, hogy számos gén indukálódott PPAR γ ligand hatására mely szerepet játszik transz-reténsav (angolul all-trans retinoic acid; röviden ATRA) szintézisében (pl. retinol dehidrogenáz 10, retinaldehid dehidrogenáz 2). Továbbá HPLC-MS módszerrel a PPAR γ liganddal kezelt sejtekben sikerült kimutatnunk az ATRA-t mely 3-5 nM

koncentrációban volt detektálható a sejtextraktumban. Ezt követően bizonyítottuk, hogy a fokozott CD1d expresszió is a retinoidokon keresztül szabályozódik mivel a PPARg ligand hatására létrejövő indukció blokkolható volt RAR antagonistával (AGN193109), illetve megakadályozható volt egy retinoid szintézis gátló vegyülettel (4-diethyl amino-benzaldehide). Mindezen eredményeink arra utalnak, hogy a PPARg ligand kezelte sejtek stimulálják az endogén retinoid képződést és ez idézi elő a CD1d fokozott expresszióját, mely génterméknek kitüntetett szerepe van a lipid antigének prezentálásában.

11. Vizsgálataink túlnyomó részét humán monocita eredetű dendritikus sejteken végeztük. Fontos kérdés annak eldöntése, hogy ez mennyire általános jelenség, ezért megvizsgáltuk a PPARg ligandok hatását vérből izolálható dendritikus sejteken is. Humán vérből izolálható mind mieloid, mind plazmacitoid dendritikus sejt, bár mindkettő aránya nagyon kicsi. Eredményeink szerint izolált majd 24 óráig tenyésztett mieloid dendritikus sejtek (CD1c pozitív DS-ek) expresszálták a PPARg magreceptort és PPARg specifikus ligandok hatására a sejteken az ismert PPARg célgén (FABP4), illetve az általunk részletesen tanulmányozott CD1d, fokozott mértékben expresszáldott, hasonlóan a monocita eredetű-dendritikus sejtekhez.

12. Végezetül *in vivo* is tanulmányoztuk az általunk *in vitro* körülmények között leírt szabályzási útvonalat. E célból immunhisztokémiai módszerekkel próbáltuk detektálni a PPARg receptort illetve a receptor által szabályozott géneket. Humán limfoid szövetekben (mandulában, illetve Peyer plakkokban) az antigén prezentáló sejtek (melyek S-100 illetve DC-SIGN pozitívak voltak) egy jelentős része PPARg pozitivitást mutatott a sejtmagban. Ezen túlmenően, a PPARg pozitív sejtek egy része szintén expresszálta a CD1d molekulát ami arra utal, hogy ezen útvonal talán *in vivo* is működhet.

Fontos megemlíteni, hogy az itt felsorolt kísérletek, elvégzéséhez a jelen ifjúsági OTKA pályázat által nyújtott támogatás nem bizonyult elégségesnek, ezért más kutatási pályázat forrásait is felhasználtuk ezen projekt megvalósítására.

Összefoglalva eredményeinket, a pályázat írásakor abból a hipotézisből indultunk ki, hogy a PPARg receptor elsősorban a DS-ek antigén felvételét szabályozza. Témavezetőm, Dr. Nagy László korábbi munkáiból ismert volt, hogy a PPARg receptor makrofágokban pozitívan szabályozza CD36 expressziót és az is ismert volt, hogy ezen sejtfelszíni receptornak, nem csak lipidek felvételében, hanem apoptotikus testek felvételében is szerepe van dendritikus

sejtekben. Ezért feltételezhető volt, hogy a PPAR γ útvonal szabályzásának fontos szerepe lehet az antigén felvétel regulálásában. Eredményeink szerint PPAR γ ligand kezelt sejteken valóban megemelkedett a CD36 mRNS és sejt felszíni expresszió. Viszont nem volt kimutatható összefüggés a fokozott CD36 expresszió és a sejtek lipid antigén felvevő képessége között. Sikerült viszont azonosítanunk egy másik útvonalat mely a lipidek prezentálásban játszik nélkülözhetetlen szerepet. Eredményeink szerint a PPAR γ aktiváció koordinált módon szabályozza a CD1 gének kifejeződését. PPAR γ ligand hatására a CD1a szintje lecsökkent a CD1d szintje viszont megemelkedett. A CD1d sejt felszíni molekulának nagyon fontos szerepük van az immun folyamatok szabályzásában, mivel ezen molekulán keresztül aktiválódnak az úgynevezett NKT (natural killer T) sejtek. Az NKT sejtekről ismert, hogy többféle autoimmun folyamatot képesek gátolni. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a PPAR γ agonisták (ezen vegyületek egy részét a 2 típusú diabétesz kezelésében használják) talán ezen mechanizmuson keresztül befolyásolják kedvező módon az autoimmun folyamatokat. Munkánk során azonosítottuk azt a mechanizmust mely felelős a CD1d fokozott expresszójáért. Eredményeink szerint PPAR γ agonisták hatására a dendritikus sejtek képesek reténsavat termelni és ez vezet, a reténsav receptor (RAR) aktiválásán keresztül, a CD1d fokozott expressziójához. Természetesen ezen eredmények túlmutatnak a CD1d expresszió szabályzásán, a PPAR γ receptor által kiváltott retinoid termelés más fontos biokémiai és immunológiai folyamatban is szerepet játszhat és az is elképzelhető, hogy ez a szabályozás másféle sejt típusban is megfigyelhető lesz.

A pályázat eredményeiből az alábbi közlemények/kéziratok születtek:

Szatmari, I., P. Gogolak, J.S. Im, B. Dezső, E. Rajnavolgyi, and L. Nagy. 2004. Activation of PPAR γ specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. *Immunity* 21:95-106.

Szatmari, I., A. Pap, R. Ralph, J. Ma, E. Rajnavolgyi, B. Dezső, and L. Nagy. Regulated retinoic acid synthesis controls lipid antigen presentation capacity in human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* (bíráló alatt).